

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 938 708**

51 Int. Cl.:

C07K 14/56 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

A61K 38/21 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 35/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.04.2013 E 19213030 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.12.2022 EP 3677591**

54 Título: **Anticuerpos anti-CD38 y fusiones con interferón alfa-2b atenuado**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
14.04.2023

73 Titular/es:

**TEVA PHARMACEUTICALS AUSTRALIA PTY LTD
(100.0%)
Level 2 37 Epping Road
Macquarie Park, NSW 2113, AU**

72 Inventor/es:

**CLARKE, ADAM;
POLLARD, MATTHEW;
DOYLE, ANTHONY, GERARD;
BEHRENS, COLLETTE;
YAMAGISHI, TETSUO;
WILSON, DAVID, S. JR.;
POGUE, SARAH, L. y
TAURA, TETSUYA**

74 Agente/Representante:

GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 938 708 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 y fusiones con interferón alfa-2b atenuado

Campo de la divulgación

5 La presente divulgación se refiere en general al campo de la ingeniería de anticuerpos. De manera más específica, la presente divulgación se refiere a anticuerpos que se unen específicamente con CD38, así como construcciones que comprenden dichos anticuerpos y ligandos de interferón alfa atenuados y procedimientos de tratamiento que usan estas construcciones. En estas construcciones, los anticuerpos dirigen los ligandos a células que expresan tanto CD38 como receptores para los ligandos y el interferón alfa atenuado reduce la señalización de interferón en células que no expresan CD38.

10 Antecedentes de la divulgación

Diversas publicaciones, incluyendo patentes, solicitudes publicadas, artículos técnicos, artículos académicos y números de referencia de genes o proteínas se citan a lo largo de la memoria descriptiva.

15 CD38 es una glucoproteína transmembrana de tipo II de 46 kDa. Tiene una cola citoplasmática N-terminal corta de 20 aminoácidos, una única hélice transmembrana y un dominio extracelular largo de 256 aminoácidos. Se expresa en la superficie de muchas células inmunitarias, incluyendo linfocitos T CD4 y CD8 positivos, linfocitos B, linfocitos NK, monocitos, células plasmáticas y en una proporción significativa de células precursoras de médula ósea normales. En algunos casos, la expresión de CD38 en linfocitos puede depender de la diferenciación y el estado de activación de la célula, por ejemplo, los linfocitos T y B en reposo pueden ser negativos, mientras que los linfocitos inmaduros y activados pueden ser predominantemente positivos para expresión de CD38. La expresión de ARNm de CD38 se ha detectado en órganos no hematopoyéticos tales como el páncreas, cerebro, bazo e hígado (Koguma, T. (1994) Biochim. Biophys. Acta 1223:160).

20 CD38 es una ectoenzima multifuncional que está implicada en señalización transmembrana y adhesión celular. También se conoce como ADP ribosa hidrolasa cíclica debido a que puede transformar NAD⁺ y NADP⁺ en cADPR, ADPR y NAADP, dependiendo del pH extracelular. Estos productos inducen movilización de Ca²⁺ dentro de la célula, que puede conducir a fosforilación de tirosina y activación de la célula. CD38 también es un receptor que puede interactuar con un ligando, CD31. La activación del receptor a través de CD31 conduce a acontecimientos intracelulares que incluyen movilización de Ca²⁺, activación celular, proliferación, diferenciación y migración.

25 CD38 se expresa a altos niveles en células de mieloma múltiple, en la mayoría de los casos de leucemias linfoblásticas agudas de linaje T y B, algunas leucemias mielocíticas agudas, linfomas de células del centro folicular y linfomas linfoblásticos T. CD38 también se expresa en las células de leucemia linfoblástica crónica de linaje B (LLC-B). En algunos casos, los pacientes con LLC-B que presentan un clon CD38⁺ se caracterizan por una evolución clínica desfavorable con un estadio más avanzado de la enfermedad, mala respuesta a la quimioterapia y tiempo de supervivencia más corto. Se ha propuesto el uso de anticuerpos contra CD38 para el tratamiento de cánceres que expresan CD38 y neoplasias hematológicas. Por lo tanto, puede ser ventajoso proporcionar anticuerpos alternativos contra CD38 que tengan propiedades de fabricación, estabilidad e inmunogénicas deseables.

30 Se ha descrito que numerosos ligandos peptídicos y polipeptídicos actúan interactuando con un receptor en una superficie celular y de este modo estimulando, inhibiendo o modulando de otro modo una respuesta biológica, que implica habitualmente rutas de transducción de señales dentro de la célula que porta dicho receptor. Los ejemplos de dichos ligandos incluyen hormonas peptídicas y polipeptídicas, citocinas, quimiocinas, factores de crecimiento y factores inductores de apoptosis.

35 Debido a las actividades biológicas de dichos ligandos, muchos tienen usos potenciales como productos terapéuticos. Los organismos reguladores han aprobado varios ligandos peptídicos o polipeptídicos como productos terapéuticos incluyendo, por ejemplo, hormona del crecimiento humano, insulina, interferón (IFN)-alfa2b, IFN-alfa2a, IFNβ, eritropoyetina, G-CSF y GM-CSF.

40 Aunque estos y otros ligandos han demostrado potencial en aplicaciones terapéuticas, también pueden presentar toxicidad cuando se administran a pacientes humanos. Una razón para la toxicidad es que la mayoría de estos ligandos desencadenan receptores en diversas células, incluyendo células distintas de las que median en el efecto terapéutico deseado. Una consecuencia de dicha actividad "fuera de diana" de los ligandos es que muchos ligandos actualmente no son adecuados para su uso como agentes terapéuticos debido a que los ligandos no pueden administrarse a dosis suficientemente altas para producir efectos terapéuticos máximos u óptimos en las células diana que median en el efecto terapéutico.

45 Por ejemplo, se sabe desde mediados de la década de 1980 que los interferones, en particular IFN-alfa, son capaces de aumentar la apoptosis y disminuir la proliferación de determinadas células cancerosas. La FDA ha aprobado el IFN-alfa para el tratamiento de varios tipos de cáncer, incluyendo melanoma, carcinoma de células renales, linfoma de linfocitos B, mieloma múltiple, leucemia mielógena crónica (LMC) y tricoleucemia. Un efecto directo del IFN-alfa en las células tumorales está mediado por la unión de IFN-alfa directamente con el receptor de IFN de tipo I en esas células

y la estimulación de la apoptosis, diferenciación terminal o reducción de la proliferación. Un efecto indirecto adicional del IFN-alfa en células no cancerosas es estimular el sistema inmunitario, lo que puede producir un efecto antineoplásico adicional al provocar que el sistema inmunitario rechace el tumor.

5 Estas actividades biológicas están mediadas por receptores de interferón de tipo I en la superficie de las células cancerosas que, cuando se estimulan, inician diversas rutas de transducción de señales que conducen a reducción de la proliferación y/o la inducción de diferenciación terminal o apoptosis. El receptor de interferón de tipo I, sin embargo, también está presente en la mayoría de las células no cancerosas. La activación de este receptor en células no cancerosas por IFN-alfa provoca la expresión de numerosas citocinas y quimiocinas proinflamatorias, lo que conduce a toxicidad y efectos adversos. Dicha toxicidad puede provocar síntomas de tipo gripal graves, lo que evita la dosificación de IFN-alfa a un sujeto a niveles que ejerzan la máxima actividad antiproliferativa y proapoptótica en las células cancerosas.

10 Cuando se usa IFN-alfa2b para tratar el mieloma múltiple, su utilidad reside, al menos en parte, en su unión con receptores de interferón de tipo I en las células de mieloma, que a su vez desencadena apoptosis y/o reducción de la proliferación y, por lo tanto, limita la progresión de la enfermedad. Desafortunadamente, sin embargo, este IFN también se une a células sanas dentro del cuerpo, desencadenando diversas respuestas celulares adicionales, algunas de las cuales son perjudiciales.

15 Una publicación de Ozzello (Breast Cancer Research and Treatment 25: 265-76, 1993) describe la conjugación química de IFN-alfa humano con un anticuerpo dirigido a tumor, localizando de este modo la actividad inhibidora directa de IFN-alfa en el tumor como una forma de reducir las velocidades de crecimiento tumoral, y demostró que dichos conjugados tienen actividad antitumoral en un modelo de xenoinjerto de un cáncer humano. El mecanismo de la actividad antineoplásica observada se atribuyó a un efecto directo de IFN-alfa en las células cancerosas, ya que el IFN-alfa humano usado en los experimentos no interactuó de forma apreciable con el receptor de IFN de tipo I murino, lo que podría haber conducido a un efecto antineoplásico indirecto. Debido a esta falta de unión del IFN-alfa humano con las células murinas, no se evaluó la toxicidad del conjugado de anticuerpo-IFN-alfa con respecto al IFN-alfa libre.

20 También pueden conectarse entre sí anticuerpos e IFN-alfa en forma de una proteína de fusión. Por ejemplo, el documento WO 01/97844 describe una fusión directa de IFN-alfa humano con el extremo C de la cadena pesada de una IgG específica para el antígeno tumoral CD20.

25 En general, el IFN puede dirigirse a células cancerosas. Aunque este enfoque puede dar como resultado un aumento de la actividad del IFN contra células cancerosas, no aborda por completo el problema de la actividad no deseada del IFN en células sanas. La fusión de IFN-alfa con el extremo C de la cadena pesada de una IgG puede prolongar la semivida del IFN-alfa, lo que conduce a acontecimientos adversos indeseables. En consecuencia, existe la necesidad de disminuir la actividad fuera de diana de los fármacos basados en ligandos, conservando al mismo tiempo el efecto terapéutico "en diana" de dichos ligandos.

30 En la técnica anterior, el documento WO 2011/154453 desvela anticuerpos humanos anti CD38 adecuados para el tratamiento, usados también en combinación con interferón alfa 2b, el documento WO 2012/092612 desvela anticuerpos monoclonales anti CD38, que presentan una afinidad en el intervalo nanomolar y median en CDC y ADCC, el documento US 2002/164788 desvela un anticuerpo humanizado específico para CD38 humano, el documento WO 2007/042309 desvela anticuerpos murinos, quiméricos y completamente humanos contra CD38 y el documento WO 2005/103083 desvela anticuerpos antagonistas humanos contra CD38 que median en ADCC y CDC y reducen el crecimiento de xenoinjertos de mieloma humano en un modelo murino.

Sumario de la divulgación

35 El primer aspecto de la presente invención proporciona un polinucleótido que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un anticuerpo que se une específicamente con CD38, el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 156 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 185.

La secuencia de ácido nucleico puede codificar un anticuerpo que comprende una región constante IgG1 humana.

40 La secuencia de ácido nucleico puede codificar un anticuerpo que comprende una región constante IgG4 humana. La región constante de cadena pesada de IgG4 humana puede comprender una prolina en la posición 228 según el sistema de numeración EU. La región constante de la cadena pesada de IgG4 humana puede comprender una tirosina en la posición 252, una treonina en la posición 254 y un ácido glutámico en la posición 256 de la región constante de acuerdo con el sistema de numeración EU.

El polinucleótido puede comprender la secuencia de ácido nucleico de las SEC ID NO: 685, que codifica una región variable de cadena ligera, y una secuencia de ácido nucleico de la SEC ID NO: 691, que codifica una región variable de la cadena ligera.

55 La secuencia de ácido nucleico puede codificar también una fusión de interferón alfa-2b al anticuerpo, en la que un interferón alfa-2b comprende una sustitución de alanina a ácido aspártico o de alanina a glicina en la posición

correspondiente a la posición 168 de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 7. La secuencia de ácido nucleico puede codificar un interferón alfa-2b que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 647 o la SEC ID NO: 650.

5 La secuencia de ácido nucleico también puede codificar un interferón alfa-2b que es un interferón alfa-2b truncado N-terminalmente. El interferón alfa-2b truncado N-terminalmente puede no tener los veintitrés aminoácidos N-terminales.

La secuencia de ácido nucleico puede codificar un interferón alfa-2b que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 649 o la SEC ID NO: 651.

En un segundo aspecto, la presente invención proporciona un vector que comprende el polinucleótido de acuerdo con el primer aspecto.

10 En un tercer aspecto, la presente invención proporciona una célula de mamífero transformada *in vitro* que comprende el vector del segundo aspecto.

La divulgación presenta nuevos anticuerpos anti-CD38 y construcciones que comprenden un anticuerpo anti-CD38 e IFN-alfa atenuado. Los anticuerpos, que comprenden una o una pluralidad de mutaciones en sus regiones variables de cadena pesada y/o ligera conservan la capacidad de unirse específicamente con CD38, incluyendo CD38 expresado en la superficie de células. Los anticuerpos se pueden fusionar, por ejemplo, con una forma atenuada de interferón alfa para formar una construcción de fusión de anticuerpo anti-CD38 e interferón atenuado.

Se desvela en el presente documento un anticuerpo aislado que se une específicamente con CD38 que comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 559 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 664. También se desvela un anticuerpo aislado que se une específicamente con CD38 que comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 665 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 666. También se desvela un anticuerpo aislado que se une específicamente con CD38 que comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 739 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 664. La secuencia de aminoácidos de región variable de cadena pesada de la SEC ID NO: 559 excluye la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 13. La secuencia de aminoácidos de región variable de cadena ligera de la SEC ID NO: 664 excluye la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 14. También se desvela un anticuerpo aislado que se une específicamente con CD38 que comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de las SEC ID NO: 200, SEC ID NO: 514 o la SEC ID NO: 697, una CDR2 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de las SEC ID NO: 202, SEC ID NO: 516, SEC ID NO: 544, SEC ID NO: 698 o la SEC ID NO: 737 y una CDR3 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de las SEC ID NO: 204, SEC ID NO: 222, SEC ID NO: 518, SEC ID NO: 534, SEC ID NO: 535, SEC ID NO: 536, SEC ID NO: 699 o la SEC ID NO: 738, y puede comprender además una CDR1 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de las SEC ID NO: 233, SEC ID NO: 319, SEC ID NO: 583, SEC ID NO: 590 o la SEC ID NO: 696, una CDR2 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de las SEC ID NO: 235, SEC ID NO: 307, SEC ID NO: 311, SEC ID NO: 585, SEC ID NO: 591 o la SEC ID NO: 605, una CDR3 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de las SEC ID NO: 237, SEC ID NO: 321, SEC ID NO: 324, SEC ID NO: 587 o la SEC ID NO: 594.

40 La región variable de cadena pesada que se describe en la presente memoria puede comprender la secuencia de aminoácidos de las SEC ID NO: 34, SEC ID NO: 18, SEC ID NO: 665, SEC ID NO: 165, SEC ID NO: 166, SEC ID NO: 167, SEC ID NO: 179, SEC ID NO: 180, SEC ID NO: 156, SEC ID NO: 197, SEC ID NO: 152, SEC ID NO: 720, SEC ID NO: 721, SEC ID NO: 722, SEC ID NO: 723, SEC ID NO: 739, SEC ID NO: 740, SEC ID NO: 741, SEC ID NO: 742, SEC ID NO: 728, SEC ID NO: 730, SEC ID NO: 731. La región variable de cadena ligera que se describe en la presente memoria puede comprender la secuencia de aminoácidos de las SEC ID NO: 65, SEC ID NO: 68, SEC ID NO: 86, SEC ID NO: 88, SEC ID NO: 92, SEC ID NO: 93, SEC ID NO: 660, SEC ID NO: 661, SEC ID NO: 662, SEC ID NO: 663, SEC ID NO: 161, SEC ID NO: 184, SEC ID NO: 185, SEC ID NO: 188, SEC ID NO: 198 o la SEC ID NO: 700, SEC ID NO: 701, SEC ID NO: 704, SEC ID NO: 705, SEC ID NO: 706, SEC ID NO: 707, SEC ID NO: 708, SEC ID NO: 709, SEC ID NO: 710, SEC ID NO: 711.

50 El anticuerpo preferentemente es capaz de unirse con células CD38 positivas. El anticuerpo puede unirse con una célula CD38 positiva con un valor de CE₅₀ de menos de aproximadamente 100 nM. El anticuerpo puede unirse con una célula CD38 positiva con un valor de CE₅₀ de menos de aproximadamente 75 nM. El anticuerpo puede unirse con una célula CD38 positiva con un valor de CE₅₀ de menos de aproximadamente 50 nM. El anticuerpo puede unirse con una célula CD38 positiva con un valor de CE₅₀ de menos de aproximadamente 30 nM. El anticuerpo puede unirse con una célula CD38 positiva con un valor de CE₅₀ de menos de aproximadamente 25 nM. El anticuerpo puede unirse con una célula CD38 positiva con un valor de CE₅₀ de menos de aproximadamente 20 nM. El anticuerpo puede unirse con una célula CD38 positiva con un valor de CE₅₀ de menos de aproximadamente 15 nM. El anticuerpo puede unirse con una célula CD38 positiva con un valor de CE₅₀ de menos de aproximadamente 13 nM. El anticuerpo puede unirse con una célula CD38 positiva con un valor de CE₅₀ de menos de aproximadamente 10 nM.

El anticuerpo puede ser un anticuerpo monoclonal y es preferentemente un anticuerpo completamente humano. El anticuerpo puede comprender un FAb. El anticuerpo puede comprender una región constante de IgG1 humana o una región constante de IgG4 humana. La región constante de IgG1 o IgG4 puede comprender una tirosina en la posición 252, una treonina en la posición 254 y un ácido glutámico en la posición 256 según el sistema de numeración EU. La región constante de IgG4 puede comprender una prolina en la posición 228 según el sistema de numeración EU, y la prolina en la posición 228 puede ser además de una tirosina en la posición 252, una treonina en la posición 254 y un ácido glutámico en la posición 256.

El anticuerpo se puede fusionar con una proteína de interferón alfa-2b atenuado. El interferón alfa-2b puede comprender una sustitución de la alanina en la posición 145 por glicina o ácido aspártico, incluyendo un interferón alfa-2b que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 649 o la SEC ID NO: 651. El interferón alfa-2b atenuado puede fusionarse directamente con el extremo C de la región constante de IgG1 o IgG4 y el anticuerpo puede comprender la secuencia de aminoácidos de las SEC ID NO: 9, SEC ID NO: 10, SEC ID NO: 652, SEC ID NO: 653, SEC ID NO: 654, SEC ID NO: 655, SEC ID NO: 656, SEC ID NO: 657, SEC ID NO: 658 o SEC ID NO: 694. El anticuerpo, incluyendo el anticuerpo fusionado con un interferón alfa-2b atenuado puede estar comprendido en una composición que comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Se desvelan en el presente documento polinucleótidos aislados que codifican el anticuerpo y el anticuerpo fusionado con un interferón alfa-2b atenuado. El polinucleótido puede comprender la secuencia de ácido nucleico de las SEC ID NO: 667, SEC ID NO: 670, SEC ID NO: 671, SEC ID NO: 672, SEC ID NO: 673, SEC ID NO: 674, SEC ID NO: 668, SEC ID NO: 669, SEC ID NO: 675, SEC ID NO: 676 o SEC ID NO: 677, SEC ID NO: 678, SEC ID NO: 679, SEC ID NO: 680, SEC ID NO: 681, SEC ID NO: 682, SEC ID NO: 683, SEC ID NO: 684, SEC ID NO: 686, SEC ID NO: 687, SEC ID NO: 688, SEC ID NO: 689, SEC ID NO: 690, SEC ID NO: 692, SEC ID NO: 693, SEC ID NO: 695, SEC ID NO: 702, SEC ID NO: 703, SEC ID NO: 712, SEC ID NO: 713, SEC ID NO: 714, SEC ID NO: 715, SEC ID NO: 716, SEC ID NO: 717, SEC ID NO: 718, SEC ID NO: 719, SEC ID NO: 724, SEC ID NO: 725, SEC ID NO: 726, SEC ID NO: 727, SEC ID NO: 732, SEC ID NO: 733, SEC ID NO: 734, SEC ID NO: 735, SEC ID NO: 743, SEC ID NO: 744, SEC ID NO: 745, SEC ID NO: 746. Los polinucleótidos pueden comprender un vector. El vector puede usarse, por ejemplo, para transformar una célula. También se desvelan en el presente documento una célula transformada que comprende dichos polinucleótidos. La célula transformada puede comprender una célula de mamífero, una célula de levadura o una célula de insecto.

También se desvelan en el presente documento células estables que expresan los anticuerpos. Las células que expresan anticuerpos pueden ser células de mamífero. Son células preferidas las células de ovario de hámster chino (CHO).

Se desvelan en el presente documento equipos que comprenden anticuerpos fusionados con interferón alfa-2b atenuado. Los equipos comprenden la construcción de fusión de anti-CD38-interferón alfa-2b atenuado e instrucciones para usar la construcción en un procedimiento para inhibir la proliferación de una célula tumoral que expresa CD38 y un receptor para interferón alfa-2b en su superficie, instrucciones para usar la construcción en un procedimiento para inducir apoptosis en una célula tumoral que expresa CD38 y un receptor para interferón alfa-2b en su superficie, instrucciones para usar la construcción en un procedimiento para tratar un tumor que comprende células que expresan CD38 y un receptor para interferón alfa-2b en su superficie en un sujeto que lo necesite y, opcionalmente, un vehículo farmacéuticamente aceptable. Se desvelan en el presente documento equipos que comprenden anticuerpos anti-CD38 y dichos equipos comprenden el anticuerpo anti-CD38 e instrucciones para usar el anticuerpo en un procedimiento para detectar una célula tumoral CD38-positiva en una muestra tisular aislada de un sujeto, el anticuerpo puede fusionarse opcionalmente con una proteína de interferón alfa-2b atenuado. Cualquier referencia a un procedimiento de tratamiento practicado en el cuerpo humano o animal se debe interpretar como sustancias y composiciones para su uso en dicho tratamiento.

Las construcciones de fusión de anticuerpo anti-CD38-interferón alfa-2b atenuado se pueden usar como terapia en el tratamiento de un tumor que comprende células que expresan CD38 y un receptor para interferón alfa-2b en su superficie. En general, un procedimiento de tratamiento comprende administrar a un sujeto que tiene el tumor una construcción de fusión de anticuerpo anti-CD38-interferón alfa-2b atenuado con en una cantidad eficaz para tratar el tumor. La construcción puede comprender cualquier construcción descrita o ejemplificada en el presente documento. El sujeto es preferentemente un mamífero, más preferentemente un primate no humano y lo más preferentemente un ser humano. El tumor puede comprender un linfoma de células β , mieloma múltiple, linfoma no Hodgkin, leucemia mielógena crónica, leucemia linfocítica crónica o leucemia mielógena aguda.

Los anticuerpos anti-CD38, opcionalmente fusionados con una proteína de interferón alfa-2b atenuado, se pueden usar en un procedimiento para detectar CD38 o una célula tumoral positiva para CD38 en una muestra tisular aislada de un sujeto. En general, el procedimiento comprende poner en contacto un anticuerpo que se une específicamente con CD38 con una muestra tisular aislada de un sujeto y detectar un complejo del anticuerpo y CD38 o una célula CD38 positiva en la muestra tisular. Se puede saber que la muestra tisular tiene o se sospecha que tiene células tumorales CD38 positivas. El tejido puede comprender sangre o médula ósea. La célula tumoral CD38 positiva puede ser una célula de linfoma de células β CD38 positivas, célula de mieloma múltiple, célula de linfoma no Hodgkin, célula de leucemia mielógena crónica, célula de leucemia linfocítica crónica o célula de leucemia mielógena aguda. El sujeto es preferentemente un mamífero, más preferentemente un primate no humano y lo más preferentemente un ser

humano. El procedimiento puede incluir la etapa de aislar la muestra tisular del sujeto. El procedimiento puede comprender además poner en contacto el anticuerpo con una muestra tisular que no incluye ninguna célula CD38 positiva, por ejemplo, para que actúe como control negativo.

Breve descripción de los dibujos

- 5 La figura 1 muestra un ejemplo de una construcción de fusión de anti-CD38-interferón atenuado. Las figuras 2A y 2B muestran secuencias de regiones variables de cadena pesada de X02.1, construcciones relacionadas y la secuencia de anticuerpo de línea germinal más homóloga. Las CDR definidas por el sistema de numeración de Kabat están subrayadas.
- 10 Las figuras 3A y 3B muestran secuencias de regiones variables de cadena ligera de X02.1, construcciones relacionadas y la secuencia de anticuerpo de línea germinal más homóloga. Las CDR definidas por el sistema de numeración de Kabat están subrayadas.
- Las figuras 4A-4D muestran las secuencias de regiones variables de cadena ligera de A02.1 y construcciones relacionadas. Las CDR definidas por el sistema de numeración de Kabat están subrayadas.
- 15 La figura 5 muestra la secuencia de cadena pesada variable consenso de A02.1 y construcciones relacionadas. Las regiones en cajas contienen CDR (como se indica) según lo definido por el sistema de numeración de Kabat y el sistema de numeración de Chothia mejorado. Las CDR definidas por el sistema de numeración de Kabat se muestran en negrita. Las CDR definidas por el sistema de numeración de Chothia potenciado están subrayadas.
- La Figura 6 muestra la secuencia de cadena ligera variable consenso de A02.1 y construcciones relacionadas. Las regiones en cajas contienen CDR (como se indica) según lo definido por el sistema de numeración de Kabat y el sistema de numeración de Chothia mejorado. Las CDR definidas por el sistema de numeración de Kabat se muestran en negrita. Las CDR definidas por el sistema de numeración de Chothia están subrayadas.
- 20 Las figuras 7A-7C muestran secuencias de regiones variables de cadena pesada de regiones variables de cadena pesada humanizadas. Las CDR definidas por el sistema de numeración de Kabat están subrayadas.
- Las figuras 8A-8C muestran secuencias de regiones variables de cadena pesada de regiones variables de cadena ligera humanizadas. Las CDR definidas por el sistema de numeración de Kabat están subrayadas.
- 25 Las figuras 9A y 9B muestran la cadena pesada variable de A10.0 y construcciones relacionadas. Las CDR definidas por el sistema de numeración de Kabat están subrayadas.
- Las figuras 10A y 10B muestran la cadena ligera variable de A10.0 y construcciones relacionadas. Las CDR definidas por el sistema de numeración de Kabat están subrayadas.
- 30 La figura 11 muestra la secuencia consenso de cadena pesada variable de A10.0 y construcciones relacionadas. Las regiones en cajas contienen CDR (como se indica) según lo definido por el sistema de numeración de Kabat y el sistema de numeración de Chothia mejorado. Las CDR definidas por el sistema de numeración de Kabat se muestran en negrita. Las CDR definidas por el sistema de numeración de Chothia potenciado están subrayadas.
- La figura 12 muestra la secuencia consenso de cadena ligera variable de A10.0 y construcciones relacionadas. Las regiones en cajas contienen CDR (como se indica) según lo definido por el sistema de numeración de Kabat y el sistema de numeración de Chothia mejorado. Las CDR definidas por el sistema de numeración de Kabat se muestran en negrita. Las CDR definidas por el sistema de numeración de Chothia potenciado están subrayadas.
- 35 La figura 13 muestra la actividad de unión de variantes de A02.1 con la línea celular de mieloma múltiple ARP-1 que expresa CD38, medida por citometría de flujo. Los detalles del ensayo se describen en los ejemplos de la presente memoria descriptiva.
- 40 La figura 14 muestra la actividad de unión de variantes de A02.1 con la línea celular de mieloma múltiple NCI-H929 que expresa CD38, medida por citometría de flujo. Los detalles del ensayo se describen en los ejemplos de la presente memoria descriptiva.
- Las figuras 15 y 16 muestran la actividad antiproliferativa de variantes de A02.1 en la línea celular de mieloma múltiple ARP-1. El isotipo A es un anticuerpo de especificidad irrelevante fusionado con el interferón atenuado como control. Los detalles del ensayo se describen en los ejemplos (ensayo de proliferación celular).
- 45 La figura 17 muestra la actividad antiproliferativa de IFN-alfa2b (Intrón A) en comparación con A02.1 y A10.0 y sus anticuerpos no fusionados X02.1 y X10.0 correspondientes en la línea celular de mieloma múltiple ARP-1. El isotipo A es un anticuerpo de especificidad irrelevante fusionado con el interferón atenuado como control. Los detalles del ensayo se describen en los ejemplos (ensayo de proliferación celular).
- 50 La figura 18 muestra el factor de cambio relativo de la producción de anexina V en la línea celular de mieloma múltiple NCI-H929 que expresa CD38 cuando se trata con A02.1 y A10.0 y sus anticuerpos no fusionados X02.1 y X10.0 correspondientes durante 24 horas en comparación con un control no tratado. El isotipo A es un anticuerpo de especificidad irrelevante fusionado con el interferón atenuado como control. Los detalles del ensayo se describen en los ejemplos (ensayo de anexina V).
- 55 La figura 19 muestra el factor de cambio relativo de la activación de caspasa en la línea celular de mieloma múltiple H929 que expresa CD38 de IFN-alfa2b (Intrón A) frente a A02.1 y construcciones relacionadas en comparación con células no tratadas. El isotipo 145D es un anticuerpo de especificidad irrelevante fusionado con el interferón atenuado como control. Los detalles del ensayo se describen en los ejemplos (ensayo de caspasa).
- 60 La Figura 20 muestra la actividad fuera de diana de IFN-alfa2b (Intrón A) frente a A02.6 y A02.6 fusionados con IFN-alfa2b de tipo silvestre (A02.6 (IFN ts)) en las células CD38 negativas. Los detalles del ensayo se describen en los ejemplos (HEK-BLUE™).
- La figura 21 muestra el factor de cambio relativo de la producción de anexina V en la línea celular de mieloma múltiple H929 que expresa CD38 entre los subtipos IgG1 e IgG4 de construcciones de proteína de fusión de anti-

CD38-IFN-alfa atenuado. El isotipo A es un anticuerpo IgG4 inespecífico fusionado con el interferón atenuado como control. Los anticuerpos, A02.12 y A10.0 contienen regiones constantes de IgG4 fusionadas con IFN-alfa atenuado, mientras que A02.112 y A10.59 contienen regiones constantes de IgG1 fusionadas con IFN-alfa atenuado. Los detalles del ensayo se describen en los ejemplos (ensayo de anexina V/7AAD).

La figura 22 muestra la actividad de unión de variantes de A10.0 con la línea celular de mieloma múltiple NCI-H929 que expresa CD38, medida por citometría de flujo. Los detalles del ensayo se describen en los ejemplos de la presente memoria descriptiva.

La figura 23 muestra la activación de caspasa en la línea celular de mieloma múltiple H929 que expresa CD38 de A10.0 y A10.38 en comparación con células no tratadas. El isotipo A es un anticuerpo de especificidad irrelevante fusionado con el IFN atenuado como control. Los detalles del ensayo se describen en los ejemplos (ensayo de caspasa).

La figura 24 muestra el factor de cambio relativo de la activación de caspasa en la línea celular de mieloma múltiple H929 que expresa CD38 por variantes A10.0 en comparación con células no tratadas. Los detalles del ensayo se describen en los ejemplos (ensayo de caspasa).

La figura 25 muestra el factor de cambio relativo de producción de anexina V en la línea celular de mieloma múltiple H929 que expresa CD38 por variantes A10.0. Los detalles del ensayo se describen en los ejemplos (ensayo de anexina V/7AAD).

La figura 26 muestra la actividad antiproliferativa de IFN-alfa2b (Intrón A) en comparación con construcciones de anticuerpos quiméricos A02.6, A10.0, A10.38 y A10A2.0 original en la línea celular de linfoma de Burkitt Daudi. El isotipo A es un anticuerpo de especificidad irrelevante fusionado con el IFN atenuado como control. Los detalles del ensayo se describen en los ejemplos (ensayo de proliferación celular).

La figura 27 muestra los efectos de A10.0 humanizado frente a la construcción de interferón atenuado con anticuerpo quimérico A10A2.0 original sobre el crecimiento de tumores de mieloma H929 subcutáneo en ratones SCID. La barra etiquetada "fase de tratamiento" muestra la duración del tratamiento con los compuestos.

La figura 28 muestra la actividad de IFN dirigido a antígeno distinta de anticuerpo de variantes A10.0 fusionadas con la misma proteína de IFN-alfa2b atenuado. Los detalles del ensayo se describen en los ejemplos ("Ensayos fuera de diana" - ensayo indicador de genes iLite).

La figura 29 muestra la actividad "fuera de diana" de IFN-alfa2b (Intrón A) en comparación con variantes A10.0 y el anticuerpo quimérico A10A2.0 original fusionado con IFN-alfa2b de tipo silvestre (quimérico A10A2.0 (IFN ts)). Los detalles del ensayo se describen en los Ejemplos ("Ensayos fuera de diana" - HEK-BLUE™).

La figura 30 muestra secuencias consenso de cadena pesada variable de IgG4 de X910/12-HC-L0-Interferón-alfa (A145D) y secuencias relacionadas. Las regiones en cajas contienen CDR (como se indica) según lo definido por el sistema de numeración de Kabat y el sistema de numeración de Chothia mejorado. Las CDR definidas por el sistema de numeración de Kabat se muestran en negrita. Las CDR definidas por el sistema de numeración de Chothia potenciado están subrayadas.

Descripción detallada de la divulgación

A lo largo de la memoria descriptiva y las reivindicaciones se usan diversos términos relacionados con aspectos de la divulgación. Dichos términos van a tener su significado habitual en la técnica, a menos que se indique otra cosa. Otros términos definidos de manera específica deben interpretarse de un modo coherente con la definición proporcionada en el presente documento.

Los términos individuo y paciente se usan indistintamente e incluyen cualquier animal. Se prefieren los mamíferos, incluyendo mamíferos de compañía y de granja, así como roedores, incluyendo ratones, conejos y ratas, y otros roedores. Se prefieren más primates no humanos, tales como monos *Cynomolgus*, y se prefieren en gran medida seres humanos.

Una molécula tal como un anticuerpo se ha "aislado" si se ha alterado y/o eliminado de su ambiente natural por la mano de un ser humano.

Como se usa en el presente documento, las formas singulares "un", "uno/a" y "el/la" incluyen referentes plurales a menos que se indique expresamente otra cosa.

Una construcción de fusión de anticuerpo anti-CD38-interferón alfa-2b atenuado incluye, pero sin limitación, cualquier anticuerpo descrito o ejemplificado en el presente documento que se une específicamente con CD38 que se fusiona con una proteína de interferón alfa-2b atenuado, incluyendo un interferón alfa-2b de las SEC ID NO: 647, SEC ID NO: 648, SEC ID NO: 649, SEC ID NO: 650 o SEC ID NO: 651. La fusión de una proteína de interferón alfa-2b no mutado, tal como la SEC ID NO: 7, con un anticuerpo anti-CD38 atenúa las actividades biológicas de la molécula de interferón. En la presente divulgación, interferón atenuado, interferón alfa-2b atenuado, IFN-alfa2b A145D e IFN-alfa2b A145G se usan indistintamente.

La especificidad no es necesariamente una designación absoluta, pero puede constituir un término relativo que significa el grado de selectividad de una construcción de proteína de fusión de IFN-alfa con anticuerpo para una célula positiva para antígeno en comparación con una célula negativa para antígeno. La especificidad de una construcción de proteína de fusión de IFN-alfa de anticuerpo para una célula positiva para antígeno está mediada por las regiones variables del anticuerpo y habitualmente por las regiones determinantes de complementariedad (CDR) del anticuerpo.

Una construcción puede tener una especificidad de 100 veces para células positivas para antígeno en comparación con células negativas para antígeno.

CD38 humano comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 1 y CD38 de mono cynomolgus comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 2.

5 Se ha observado además que el interferón alfa2b se puede atenuar con respecto a su actividad biológica que está mediada a través de la unión del interferón con un receptor de interferón en una superficie celular por medio de la introducción de determinados cambios de aminoácidos en la secuencia proteica. Una molécula de interferón atenuado puede fusionarse con anticuerpos que se unen específicamente con CD38, de manera que el anticuerpo puede actuar como un vehículo de suministro para el interferón atenuado a células CD38 positivas con una disminución resultante de la actividad de interferón fuera de diana provocada por la molécula de interferón atenuado. Se ha observado además que la fusión del interferón atenuado con los anticuerpos de CD38 no afecta significativamente a la capacidad del anticuerpo para unirse específicamente con CD38 en células que expresan CD38, incluyendo células en el cuerpo de los animales. Se ha observado además que pueden obtenerse por ingeniería genética variantes de los anticuerpos de CD38 y expresarse de modo que los anticuerpos tengan inmunogenicidad reducida y estabilidad y semivida mejoradas sin una pérdida significativa de especificidad o afinidad del anticuerpo por el antígeno CD38. Estas variantes de anticuerpos pueden fusionarse con un interferón atenuado.

En consecuencia, se presentan anticuerpos que se unen específicamente con CD38. También se ha observado que dichos anticuerpos anti-CD38 pueden emplearse como vehículos de suministro para ligandos atenuados tales como interferón alfa. Sin pretender limitarse a ninguna teoría o mecanismo de acción particular, se cree que los anticuerpos dirigen el interferón alfa con el que están unidos a células CD38 positivas, donde el interferón puede interactuar con su receptor. Se cree que el anticuerpo, como vehículo de suministro, compensa la capacidad disminuida de la molécula de interferón para unirse con su receptor. En este sentido, el interferón atenuado tiene capacidad reducida para interactuar con su receptor en células sanas y en particular células que no expresan CD38. Se cree que aproximando el interferón atenuado a su receptor en células CD38 positivas, los anticuerpos pueden mejorar la capacidad del interferón atenuado para unirse con su receptor relevante e inducir un efecto terapéutico, presentando al mismo tiempo una capacidad disminuida para inducir efectos indeseables en células sanas que no expresan CD38.

Los anticuerpos pueden ser policlonales, pero, en algunos aspectos, no son policlonales. Los anticuerpos son preferentemente monoclonales. Los anticuerpos son preferentemente anticuerpos de longitud completa. Los anticuerpos de longitud completa comprenden en general una cadena pesada de región variable y una cadena ligera de región variable. Los anticuerpos pueden comprender derivados o fragmentos o partes de anticuerpos que conservan la especificidad de unión a antígeno y también preferentemente conservan la mayor parte o la totalidad de la afinidad, de la molécula de anticuerpo original (p. ej., para CD38). Por ejemplo, los derivados pueden comprender al menos una región variable (bien una región variable de cadena pesada o de cadena ligera). Otros ejemplos de derivados y fragmentos de anticuerpos adecuados incluyen, sin limitación, anticuerpos con especificidad poliepitópica, anticuerpos biespecíficos, anticuerpos multiespecíficos, diacuerpos, moléculas monocatenarias, así como moléculas FAb, F(ab)², Fd, Fabc y Fv, anticuerpos de cadena sencilla (Sc), anticuerpos Fv de cadena sencilla (scFv), cadenas ligeras de anticuerpos individuales, cadenas pesadas de anticuerpos individuales, fusiones entre cadenas de anticuerpos y otras moléculas, monómeros o dímeros de cadena pesada, monómeros o dímeros de cadena ligera, dímeros que consisten en una cadena pesada y una ligera y otros multímeros. Los anticuerpos Fv de cadena sencilla pueden ser multivalentes. Todos los isotipos de anticuerpos pueden usarse para producir derivados, fragmentos y partes de anticuerpos. Pueden producirse derivados, fragmentos y/o partes de anticuerpos de manera recombinante y ser expresados por cualquier tipo celular, procariota o eucariota.

Se describen en la presente memoria un anticuerpo aislado que se puede referir a un anticuerpo monoclonal con el que se ha fusionado IFN-alfa o un IFN-alfa atenuado, con el extremo C de la región constante de IgG de cadena pesada. Cuando el anticuerpo monoclonal tiene una especificidad de unión con CD38 y el IFN-alfa es IFN-alfa 2b atenuado, el anticuerpo aislado también se denomina proteína de fusión de IFN-alfa atenuado con anti-CD38 o una construcción de fusión de IFN-alfa atenuado con anti-CD38 en el presente documento.

En un anticuerpo de longitud completa, cada cadena pesada está compuesta por una región variable de cadena pesada (abreviada en el presente documento como HCVR o VH) y una región constante de cadena pesada. La región constante de la cadena pesada está compuesta por tres dominios, CH1, CH2 y CH3. Cada cadena ligera está compuesta por una región variable de cadena ligera (abreviada en el presente documento como LCVR o VL) y una región constante de cadena ligera. La región constante de cadena ligera está compuesta por un dominio, CL. Las regiones VH y VL pueden subdividirse adicionalmente en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas regiones marco conservadas (FWR o FR). Cada VH y VL está compuesta por tres CDR y cuatro FWR, dispuestas desde el extremo amino hasta el extremo carboxilo en el siguiente orden: FWR1, CDR1, FWR2, CDR2, FWR3, CDR3, FWR4. Normalmente, es menos probable que las propiedades de unión a antígeno de un anticuerpo sean alteradas por cambios en las secuencias de FWR que por cambios en las secuencias de CDR. Las moléculas de inmunoglobulina pueden ser de cualquier tipo (p. ej., IgG, IgE, IgM, IgD, IgA e IgY), clase (p. ej., IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2) o subclase.

Los anticuerpos se pueden obtener de cualquier especie. Por ejemplo, los anticuerpos pueden ser anticuerpos de ratón, rata, cabra, caballo, cerdo, bovino, camello, pollo, conejo, burro, llama, dromedario, tiburón o humanos, así como anticuerpos de cualquier otra especie animal. Para su uso en el tratamiento de seres humanos, los anticuerpos no obtenidos de seres humanos pueden alterarse estructuralmente para que sean menos antigénicos tras su administración a un paciente humano, incluso por quimerización o humanización o sobrehumanización.

Los anticuerpos que se describen en la presente memoria pueden ser anticuerpos humanizados. Los anticuerpos humanizados son aquellos en los que los aminoácidos implicados directamente en la unión a antígeno, p. ej., las regiones determinantes de complementariedad (CDR) y, en algunos casos, las regiones marco conservadas (FWR), o porciones de las mismas, de las cadenas pesadas y/o ligeras no son de origen humano, mientras que el resto de los aminoácidos en el anticuerpo son humanos o de otro modo de origen humano, p. ej., un armazón de anticuerpos humanos. Los anticuerpos humanizados también incluyen anticuerpos en los que uno o más restos de la proteína humana se modifican mediante una o más sustituciones de aminoácidos y/o uno o más restos de FWR de la proteína humana se reemplazan por restos no humanos correspondientes. Los anticuerpos humanizados también pueden comprender residuos que no se encuentran ni en el anticuerpo humano ni en el anticuerpo no humano. Un anticuerpo humanizado puede ser un anticuerpo sobrehumanizado, p. ej., como se describe en la patente de los Estados Unidos n.º 7.732.578. N.º 7.732.578. Los anticuerpos pueden ser anticuerpos quiméricos humanizados.

Los anticuerpos divulgados en la presente memoria pueden ser totalmente humanos. Los anticuerpos completamente humanos son aquellos en los que la molécula completa es humana o de otro modo de origen humano o incluye una secuencia de aminoácidos idéntica a una forma humana del anticuerpo. Los anticuerpos completamente humanos incluyen los obtenidos de una biblioteca de genes V humanos, por ejemplo, donde los genes humanos que codifican regiones variables de anticuerpos se expresan de manera recombinante. Se pueden expresar anticuerpos completamente humanos en otros organismos (p. ej., ratones y tecnología xenomouse) o células de otros organismos transformados con genes que codifican anticuerpos humanos. No obstante, los anticuerpos completamente humanos pueden incluir restos de aminoácidos no codificados por secuencias humanas, p. ej., mutaciones introducidas por mutaciones aleatorias o dirigidas.

Los anticuerpos pueden ser anticuerpos de longitud completa de cualquier clase, por ejemplo, IgG1, IgG2 o IgG4. Los dominios constantes de dichos anticuerpos son preferentemente humanos. Las regiones variables de dichos anticuerpos pueden ser de origen no humano o preferentemente son de origen humano o están humanizadas. También pueden usarse fragmentos de anticuerpos en lugar de los anticuerpos de longitud completa.

Los anticuerpos pueden ser minicuerpos. Los minicuerpos comprenden versiones pequeñas de anticuerpos completos, que codifican en una sola cadena los elementos esenciales de un anticuerpo completo. Por ejemplo, el minicuerpo puede estar compuesto por los dominios VH y VL de un anticuerpo nativo fusionado con la región bisagra y el dominio CH3 de una molécula de inmunoglobulina.

El anticuerpo que se desvela en la presente memoria puede comprender marcos de proteínas no derivadas de inmunoglobulina. Por ejemplo, se puede hacer referencia a (Ku y Schutz, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 6552-6556, 1995) que describe un citocromo b562 de proteína de haz de cuatro hélices que tiene dos bucles aleatorizados para crear CDR, que se han seleccionado para unión a antígeno.

Pueden existir variaciones de secuencia natural entre las cadenas pesadas y ligeras y los genes que las codifican y, por lo tanto, se esperaría que los expertos habituales en la técnica encontrarán algún nivel de variación dentro de las secuencias de aminoácidos, o los genes que las codifican, de los anticuerpos descritos y ejemplificados en el presente documento. Estas variantes mantienen preferentemente las propiedades de unión únicas (p. ej., especificidad y afinidad) del anticuerpo original. Dicha expectativa se debe en parte a la degeneración del código genético, así como al éxito evolutivo conocido de variaciones de secuencias de aminoácidos conservativas, que no alteran de forma apreciable la naturaleza de la proteína codificada. En consecuencia, dichas variantes y homólogos se consideran sustancialmente iguales entre sí y se incluyen dentro del alcance de la divulgación. Los anticuerpos incluyen por tanto variantes que tienen sustituciones, supresiones, adiciones o reemplazos de aminoácidos individuales o múltiples que conservan las propiedades biológicas (p. ej., especificidad de unión y afinidad de unión) de los anticuerpos originales. Las variantes son preferentemente conservadoras, pero pueden no ser conservadoras.

Las posiciones de aminoácidos asignadas a CDR y FWR se pueden definir de acuerdo con Kabat Sequences of Proteins of Immunological Interest, National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1987 y 1991 (también denominado en la presente memoria sistema de numeración de Kabat). Además, las posiciones de aminoácidos asignadas a CDR y FWR pueden definirse según el esquema de numeración de Chothia mejorado (<http://www.bioinfo.org.uk/mdex.html>). La región constante de cadena pesada de un anticuerpo puede ser definida por el sistema de numeración EU (Edelman, GM et al. (1969), Proc. Natl. Acad. USA, 63, 78-85).

De acuerdo con el sistema de numeración de Kabat, las FWR y CDR de VH se pueden colocar de la siguiente manera: restos 1-30 (FWR1), 31-35 (CDR1), 36-49 (FWR2), 50-65 (CDR2), 66-94 (FWR3), 95-102 (CDR3) y 103-113 (FWR4), y las FWR y CDR de VL se colocan de la siguiente manera: restos 1-23 (FWR1), 24-34 (CDR1), 35-49 (FWR2), 50-56 (CDR2), 57-88 (FWR3), 89-97 (CDR3) y 98-107 (FWR4). En algunos casos, las regiones variables pueden aumentar en longitud y, según el sistema de numeración de Kabat, algunos aminoácidos pueden designarse por un número

seguido de una letra. Esta especificación no se limita a las FWR y CDR definidas por el sistema de numeración de Kabat, sino que incluye todos los sistemas de numeración, incluyendo el sistema de numeración canónico o de Chothia *et al.* (1987) *J. Mol. Biol.* 196: 901-17; Chothia *et al.* (1989) *Nature* 342: 877-83; y/o Al-Lazikani *et al.* (1997) *J. Mol. Biol.* 273: 927-48; el sistema de numeración de Honnegher *et al.* (2001) *J. Mol. Biol.*, 309: 657-70; o el sistema IMGT analizado en Giudicelli *et al.*, (1997) *Nucleic Acids Res.* 25: 206-11. Las CDR pueden definirse según el sistema de numeración de Kabat.

Para cualquiera de los subdominios de CDR2 de cadena pesada descritos en el presente documento, de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat, los cinco aminoácidos C-terminales pueden no participar directamente en la unión a antígeno y, en consecuencia, se entenderá que uno o más de estos cinco aminoácidos C-terminales se pueden sustituir con otro aminoácido de origen natural sin afectar sustancialmente de manera adversa a la unión a antígeno. Para cualquiera de los subdominios de CDR1 de cadena ligera descritos en el presente documento, según el sistema de numeración de Kabat, los cuatro aminoácidos N-terminales pueden no participar directamente en la unión a antígeno y, en consecuencia, se entenderá que uno o más de estos cuatro aminoácidos pueden sustituirse con otro aminoácido de origen natural sin afectar sustancialmente de manera adversa a la unión a antígeno. Por ejemplo, según lo descrito por Padlan *et al.* (1995) *FASEB J.* 9: 133-139, los cinco aminoácidos C terminales de CDR2 de cadena pesada y/o los cuatro aminoácidos N terminales de CDR1 de cadena ligera pueden no participar en la unión a antígeno. Tanto la CDR2 de cadena pesada como la CDR1 de cadena ligera pueden no participar directamente en la unión a antígeno.

Se pueden usar análogos químicos de aminoácidos en los anticuerpos descritos y/o ejemplificados en el presente documento. El uso de análogos químicos de aminoácidos es útil, por ejemplo, para estabilizar las moléculas, tal como si es necesario administrarlas a un sujeto. Los análogos de los aminoácidos contemplados en el presente documento incluyen, pero sin limitación, modificaciones de cadenas laterales, incorporación de aminoácidos no naturales y/o sus derivados durante la síntesis de péptidos, polipéptidos o proteínas y el uso de reticuladores y otros procedimientos que imponen restricciones conformacionales a la molécula proteica o sus análogos.

Los anticuerpos pueden comprender modificaciones o restos postraduccionales, que puede influir en la actividad o estabilidad del anticuerpo. Estas modificaciones o restos incluyen, pero sin limitación, restos metilados, acetilados, glucosilados, sulfatados, fosforilados, carboxilados y amidados y otros restos que son bien conocidos en la técnica. Los restos incluyen cualquier grupo químico o combinaciones de grupos que se encuentran habitualmente en moléculas de inmunoglobulina en la naturaleza o que se añaden de otro modo a anticuerpos mediante sistemas de expresión recombinantes, incluyendo sistemas de expresión procariotas y eucariotas.

Los ejemplos de modificaciones de las cadenas laterales contempladas por la divulgación incluyen modificaciones de grupos amino tales como por alquilación reductora por medio de la reacción con un aldehído seguido de reducción con NaBH₄; amidación con metilacetimidato; acilación con anhídrido acético; carbamoilación de grupos amino con cianato; trinitrobenzilación de grupos amino con ácido 2,4,6-trinitrobenzenosulfónico (TNBS); acilación de grupos amino con anhídrido succínico y anhídrido tetrahidroftálico; y piridoxilación de lisina con piridoxal-5-fosfato seguido de reducción con NaBH₄.

El grupo de guanidina de restos de arginina se puede modificar por medio de la formación de productos de condensación heterocíclicos con reactivos tales como 2,3-butanodiona, fenilgloxal y glixal.

El grupo carboxilo se puede modificar por medio de la activación de carbodiimida a través de la formación de O-acilisourea seguido de una derivación posterior, por ejemplo, a una amida correspondiente.

Los grupos sulfhidrilo se pueden modificar por medio de procedimientos tales como carboximetilación con ácido yodoacético o yodoacetamida; oxidación de ácido per fórmico a ácido cisteico; formación de disulfuros mixtos con otros compuestos de tiol; reacción con maleimida, anhídrido maleico u otra maleimida sustituida; formación de derivados mercuriales mediante el uso de 4-cloromercuribenzoato, ácido 4-cloromercurifenilsulfónico, cloruro de fenilmercurio, 2-cloromercuri-4-nitrofenol y otros mercuriales; carbamoilación con cianato a pH alcalino.

Los restos de triptófano se pueden modificar por medio de, por ejemplo, oxidación con N-bromosuccinimida o alquilación del anillo de indol con bromuro de 2-hidroxi-5-nitrobenzilo o haluros de sulfenilo. Los restos de tirosina, por otro lado, pueden alterarse mediante nitración con tetranitrometano para formar un derivado de 3-nitrotirosina.

Se puede llevar a cabo la modificación del anillo de imidazol de un resto de histidina por medio de la alquilación con derivados de ácido yodoacético o N-carbetoxilación con dietilpirocarbonato.

Se pueden usar reticuladores, por ejemplo, para estabilizar las conformaciones 3D de los anticuerpos y las construcciones, mediante el uso de reticuladores homobifuncionales tales como los imidoésteres bifuncionales que tienen grupos espaciadores (CH₂)_n con n=1 a n=6, glutaraldehído, ésteres de N-hidroxisuccinimida y reactivos heterobifuncionales que habitualmente contienen un resto reactivo a amino tal como N-hidroxisuccinimida y otro resto reactivo específico de grupo tal como resto de maleimido o ditio (SH) o carbodiimida (COOH).

Los anticuerpos pueden madurar por afinidad o pueden comprender cambios de aminoácidos que disminuyen la inmunogenicidad, por ejemplo, eliminando motivos de unión al MHC de clase II predichos. La utilidad terapéutica de

los anticuerpos descritos en el presente documento puede mejorarse adicionalmente modulando sus características funcionales, tales como citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC), citotoxicidad dependiente del complemento (CDC), semivida en suero, biodistribución y unión a receptores de Fc o la combinación de cualquiera de estos. Esta modulación puede lograrse mediante ingeniería de proteínas, glucoingeniería o procedimientos químicos. Dependiendo de la aplicación terapéutica necesaria, podría ser ventajoso aumentar o disminuir cualquiera de estas actividades. Un ejemplo de glucoingeniería usó el procedimiento Potelligent® como se describe en Shinkawa T. *et al.* (2003) *J. Biol. Chem.* 278: 3466-73.

Los anticuerpos pueden incluir modificaciones que modulan su semivida y biodistribución en suero, incluyendo modificaciones que modulan la interacción del anticuerpo con el receptor de Fc neonatal (FcRn), un receptor con un papel clave en la protección de la IgG del catabolismo y el mantenimiento de alta concentración de anticuerpo en suero. Se pueden producir modificaciones moduladoras de la semivida en suero en la región Fc de IgG1 o IgG4, incluyendo la triple sustitución de M252Y/S254T/T256E (numeración de acuerdo con el sistema de numeración EU (Edelman, G.M. *et al.* (1969) *Proc. Natl. Acad. USA* 63, 78-85)), (p. ej., SEC ID NO: 656, SEC ID NO: 657, SEC ID NO: 658, SEC ID NO: 694), como se describe en la patente de los Estados Unidos N° 7.083.784. Se pueden producir otras sustituciones en las posiciones 250 y 428, véase p. ej., U.S. Pat. No 7.217.797 así como en las posiciones 307, 380 y 434, véase, p. ej., WO 00/42072. Se describen ejemplos de sustituciones de aminoácidos de dominio constante que modulan la unión con receptores de Fc y la función posterior mediada por estos receptores, incluyendo unión a FcRn y semivida en suero, en las publicaciones de los Estados Unidos Nros. 2009/0142340, 2009/0068175, and 2009/0092599. Los anticuerpos desnudos pueden tener la lisina C-terminal de la cadena pesada omitida o eliminada para reducir la heterogeneidad. La sustitución de S228P (numeración EU) en la IgG4 humana puede estabilizar el intercambio de la rama de Fab de anticuerpos *in vivo* (Labrin *et al.* (2009) *Nature Biotechnology* 27: 8; 767-773).

Se sabe que los glucanos unidos con moléculas de anticuerpos influyen en las interacciones del anticuerpo con receptores de Fc y receptores de glucanos y, de este modo, influyen en la actividad de los anticuerpos, incluyendo la semivida en suero. Por tanto, determinadas glucoformas que modulan las actividades de anticuerpos deseadas pueden conferir una ventaja terapéutica. Los procedimientos para generar glicoformas de ingeniería incluyen, entre otros, los descritos en U.S. Pat. Nos. 6.602.684, 7,326,681 y 7,388,081 y PCT Publ. No. WO 08/006554. Como alternativa, las secuencias de anticuerpos pueden modificarse para eliminar sitios de unión a glucoforma relevantes.

Los anticuerpos se pueden marcar o conjugar con cualquier resto químico o biomolecular. Los anticuerpos marcados pueden encontrar uso en aplicaciones terapéuticas, de diagnóstico o de investigación básica. Dichos marcadores/conjugados pueden ser detectables, tales como fluorocromos, radiomarcadores, enzimas, proteínas fluorescentes y biotina. Los marcadores/conjugados pueden ser agentes quimioterapéuticos, toxinas, isótopos y otros agentes usados para tratar afecciones tales como la destrucción de células cancerosas. Los agentes quimioterapéuticos pueden ser cualquiera que sea adecuado para el fin para el que se usa el anticuerpo.

Los anticuerpos se pueden derivatizar por medio de grupos protectores/bloqueadores conocidos para evitar la escisión proteolítica o mejorar la actividad o la estabilidad.

Los anticuerpos tienen preferentemente una afinidad de unión por un epítipo en CD38 que incluye una constante de disociación (Kd) de menos de aproximadamente 1×10^{-2} M. En algunas realizaciones, la Kd es menos de aproximadamente 1×10^{-3} M. En otras realizaciones, la Kd es menos de aproximadamente 1×10^{-4} M. En algunas realizaciones, la Kd es menos de aproximadamente 1×10^{-5} M. En otras realizaciones más, la Kd es menos de aproximadamente 1×10^{-6} M. En otras realizaciones, la Kd es menos de aproximadamente 1×10^{-7} M. En otras realizaciones, la Kd es menos de aproximadamente 1×10^{-8} M. En otras realizaciones, la Kd es menos de aproximadamente 1×10^{-9} M. En otras realizaciones, la Kd es menos de aproximadamente 1×10^{-10} M. En otras realizaciones más, la Kd es menos de aproximadamente 1×10^{-11} M. En algunas realizaciones, la Kd es menos de aproximadamente 1×10^{-12} M. En otras realizaciones, la Kd es menos de aproximadamente 1×10^{-13} M. En otras realizaciones, la Kd es menos de aproximadamente 1×10^{-14} M. En otras realizaciones más, la Kd es menos de aproximadamente 1×10^{-15} M. Los valores de afinidad se refieren a los obtenidos por medio de procedimientos convencionales, incluyendo resonancia de plasmón superficial, tales como análisis de Biacore™ o análisis mediante el uso de un sistema Dip-and-Read Octet® Red 96 (Forte Bio).

Los anticuerpos pueden comprender una molécula Fv de cadena sencilla (scFv), Fab o IgG completa. El anticuerpo puede comprender una cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 85 %, al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente 97 %, al menos aproximadamente 98 %, al menos aproximadamente 99 % o al menos aproximadamente 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de las SEC ID NO: 659 o la SEC ID NO: 665 o la SEC ID NO: 736, siempre que una cadena pesada que comprenda la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 659 o una variante de la misma excluya la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 13. Se entenderá que los anticuerpos que comprenden cambios de aminoácidos en su cadena pesada conservan la capacidad de unirse específicamente con CD38. La actividad de unión específica de CD38 conservada (incluyendo afinidad) es preferentemente aproximadamente igual que la actividad de unión (incluyendo afinidad) de un anticuerpo sin ningún cambio de aminoácidos en la cadena pesada, aunque la actividad de unión (incluyendo afinidad) puede ser menor o mayor que un anticuerpo sin ningún cambio de aminoácidos en la cadena pesada. El anticuerpo puede

comprender una cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 85 %, al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente 97 %, al menos aproximadamente 98 %, al menos aproximadamente 99 % o al menos aproximadamente 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de las SEC ID NO: 664 o la SEC ID NO: 666, siempre que una cadena ligera que comprenda la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 664 o una variante de la misma excluya la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 14. Se entenderá que los anticuerpos que comprenden cambios de aminoácidos en su cadena ligera conservan la capacidad de unirse específicamente con CD38. La actividad de unión específica de CD38 conservada (incluyendo afinidad) es preferentemente aproximadamente igual que la actividad de unión (incluyendo afinidad) de un anticuerpo sin ningún cambio de aminoácidos en la cadena ligera, aunque la actividad de unión (incluyendo afinidad) puede ser menor o mayor que un anticuerpo sin ningún cambio de aminoácidos en la cadena ligera.

Se describe en la presente memoria la FWR1 de cadena pesada puede comprender la secuencia de aminoácidos de las SEC ID NO: 199, SEC ID NO: 206, SEC ID NO: 214, SEC ID NO: 215, SEC ID NO: 217, SEC ID NO: 219, SEC ID NO: 389, SEC ID NO: 396, SEC ID NO: 400, SEC ID NO: 404, SEC ID NO: 408, SEC ID NO: 412, SEC ID NO: 416, SEC ID NO: 420, SEC ID NO: 424, SEC ID NO: 428, SEC ID NO: 432, SEC ID NO: 466, SEC ID NO: 470, SEC ID NO: 472, SEC ID NO: 474, SEC ID NO: 476, SEC ID NO: 478, SEC ID NO: 480, SEC ID NO: 482, SEC ID NO: 486, SEC ID NO: 488, SEC ID NO: 513, SEC ID NO: 537, SEC ID NO: 542, SEC ID NO: 547, SEC ID NO: 552, SEC ID NO: 557, SEC ID NO: 562, SEC ID NO: 567, SEC ID NO: 572, SEC ID NO: 577 o la SEC ID NO: 748, y la FWR1 de cadena pesada puede comprender una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 85 %, al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 92 %, al menos aproximadamente 93 %, al menos aproximadamente 94 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente 97 %, al menos aproximadamente 98 % o al menos aproximadamente 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de las SEC ID NO: 199, SEC ID NO: 214, SEC ID NO: 215, SEC ID NO: 217, SEC ID NO: 219, SEC ID NO: 389, SEC ID NO: 396, SEC ID NO: 400, SEC ID NO: 404, SEC ID NO: 408, SEC ID NO: 412, SEC ID NO: 416, SEC ID NO: 420, SEC ID NO: 424, SEC ID NO: 428, SEC ID NO: 432, SEC ID NO: 466, SEC ID NO: 470, SEC ID NO: 472, SEC ID NO: 474, SEC ID NO: 476, SEC ID NO: 478, SEC ID NO: 480, SEC ID NO: 482, SEC ID NO: 486, SEC ID NO: 488, SEC ID NO: 513, SEC ID NO: 537, SEC ID NO: 542, SEC ID NO: 547, SEC ID NO: 552, SEC ID NO: 557, SEC ID NO: 562, SEC ID NO: 567, SEC ID NO: 572, SEC ID NO: 577 o la SEC ID NO: 748. La FWR2 de cadena pesada puede comprender la secuencia de aminoácidos de las SEC ID NO: 201, SEC ID NO: 211, SEC ID NO: 229, SEC ID NO: 391, SEC ID NO: 397, SEC ID NO: 401, SEC ID NO: 405, SEC ID NO: 409, SEC ID NO: 413, SEC ID NO: 417, SEC ID NO: 421, SEC ID NO: 425, SEC ID NO: 429, SEC ID NO: 433, SEC ID NO: 515, SEC ID NO: 520, SEC ID NO: 521, SEC ID NO: 522, SEC ID NO: 523, SEC ID NO: 524, SEC ID NO: 525, SEC ID NO: 538, SEC ID NO: 543, SEC ID NO: 548, SEC ID NO: 553, SEC ID NO: 558, SEC ID NO: 563, SEC ID NO: 568, SEC ID NO: 573, SEC ID NO: 578, SEC ID NO: 749 o la SEC ID NO: 750, y la FWR2 de cadena pesada puede comprender una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 85 %, al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 92 %, al menos aproximadamente 93 %, al menos aproximadamente 94 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente 97 %, al menos aproximadamente 98 % o al menos aproximadamente 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de las SEC ID NO: 201, SEC ID NO: 211, SEC ID NO: 229, SEC ID NO: 391, SEC ID NO: 397, SEC ID NO: 401, SEC ID NO: 405, SEC ID NO: 409, SEC ID NO: 413, SEC ID NO: 417, SEC ID NO: 421, SEC ID NO: 425, SEC ID NO: 429, SEC ID NO: 433, SEC ID NO: 515, SEC ID NO: 520, SEC ID NO: 521, SEC ID NO: 522, SEC ID NO: 523, SEC ID NO: 524, SEC ID NO: 525, SEC ID NO: 538, SEC ID NO: 543, SEC ID NO: 548, SEC ID NO: 553, SEC ID NO: 558, SEC ID NO: 563, SEC ID NO: 568, SEC ID NO: 573, SEC ID NO: 578, SEC ID NO: 749 o la SEC ID NO: 750. La FWR3 de cadena pesada puede comprender la secuencia de aminoácidos de las SEC ID NO: 203, SEC ID NO: 210, SEC ID NO: 212, SEC ID NO: 213, SEC ID NO: 216, SEC ID NO: 218, SEC ID NO: 221, SEC ID NO: 226, SEC ID NO: 227, SEC ID NO: 230, SEC ID NO: 393, SEC ID NO: 399, SEC ID NO: 403, SEC ID NO: 407, SEC ID NO: 411, SEC ID NO: 415, SEC ID NO: 419, SEC ID NO: 423, SEC ID NO: 427, SEC ID NO: 431, SEC ID NO: 435, SEC ID NO: 468, SEC ID NO: 517, SEC ID NO: 530, SEC ID NO: 531, SEC ID NO: 532, SEC ID NO: 533, SEC ID NO: 540, SEC ID NO: 545, SEC ID NO: 550, SEC ID NO: 555, SEC ID NO: 560, SEC ID NO: 565, SEC ID NO: 570, SEC ID NO: 575, SEC ID NO: 580, SEC ID NO: 751 o la SEC ID NO: 752 y la FWR3 de cadena pesada puede comprender una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 85 %, al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 92 %, al menos aproximadamente 93 %, al menos aproximadamente 94 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente 97 %, al menos aproximadamente 98 % o al menos aproximadamente 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de las SEC ID NO: 203, SEC ID NO: 210, SEC ID NO: 212, SEC ID NO: 213, SEC ID NO: 216, SEC ID NO: 218, SEC ID NO: 221, SEC ID NO: 226, SEC ID NO: 227, SEC ID NO: 230, SEC ID NO: 393, SEC ID NO: 399, SEC ID NO: 403, SEC ID NO: 407, SEC ID NO: 411, SEC ID NO: 415, SEC ID NO: 419, SEC ID NO: 423, SEC ID NO: 427, SEC ID NO: 431, SEC ID NO: 435, SEC ID NO: 468, SEC ID NO: 517, SEC ID NO: 530, SEC ID NO: 531, SEC ID NO: 532, SEC ID NO: 533, SEC ID NO: 540, SEC ID NO: 545, SEC ID NO: 550, SEC ID NO: 555, SEC ID NO: 560, SEC ID NO: 565, SEC ID NO: 570, SEC ID NO: 575, SEC ID NO: 580, SEC ID NO: 751 o la SEC ID NO: 752. La FWR4 de cadena pesada puede comprender la secuencia de aminoácidos de las SEC ID NO: 205, SEC ID NO: 395, SEC ID NO: 519, SEC ID NO: 541, SEC ID NO: 546, SEC ID NO: 551, SEC ID NO: 556, SEC ID NO: 561, SEC ID NO: 566, SEC ID NO: 571, SEC ID NO: 576, SEC ID NO: 581 o la SEC ID NO: 753, y la FWR4 de cadena pesada puede comprender una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 85 %, al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 92 %, al menos

aproximadamente 93 %, al menos aproximadamente 94 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente 97 %, al menos aproximadamente 98 % o al menos aproximadamente 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de las SEC ID NO: 205, SEC ID NO: 395, SEC ID NO: 519, SEC ID NO: 541, SEC ID NO: 546, SEC ID NO: 551, SEC ID NO: 556, SEC ID NO: 561, SEC ID NO: 566, SEC ID NO: 571, SEC ID NO: 576, SEC ID NO: 581 o la SEC ID NO: 753. Se entenderá que los anticuerpos que comprenden cambios de aminoácidos en la región o las regiones marco conservadas de cadena pesada (FWR1, FWR2, FWR3 y/o FWR4) conservan la capacidad de unirse específicamente con CD38. La actividad de unión específica de CD38 conservada (incluyendo afinidad) es preferentemente aproximadamente igual que la actividad de unión (incluyendo afinidad) de un anticuerpo sin ningún cambio de aminoácidos en ninguna región o regiones marco conservadas de cadena pesada, aunque la actividad de unión (incluyendo afinidad) puede ser menor o mayor que un anticuerpo sin ningún cambio de aminoácidos en ninguna región o regiones marco conservadas de cadena pesada.

La CDR1 de cadena pesada puede comprender la secuencia de aminoácidos de las SEC ID NO: 200, SEC ID NO: 224, SEC ID NO: 390, SEC ID NO: 514, SEC ID NO: 526, SEC ID NO: 527, SEC ID NO: 528, SEC ID NO: 529 o SEC ID NO: 697 y la CDR1 de cadena pesada puede comprender una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 85 %, al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 92 %, al menos aproximadamente 93 %, al menos aproximadamente 94 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente 97 %, al menos aproximadamente 98 % o al menos aproximadamente 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de las SEC ID NO: 200, SEC ID NO: 224, SEC ID NO: 390, SEC ID NO: 514, SEC ID NO: 526, SEC ID NO: 527, SEC ID NO: 528, SEC ID NO: 529 o SEC ID NO: 697. La CDR2 de cadena pesada puede comprender la secuencia de aminoácidos de las SEC ID NO: 202, SEC ID NO: 392, SEC ID NO: 398, SEC ID NO: 402, SEC ID NO: 406, SEC ID NO: 410, SEC ID NO: 414, SEC ID NO: 418, SEC ID NO: 422, SEC ID NO: 426, SEC ID NO: 430, SEC ID NO: 434, SEC ID NO: 467, SEC ID NO: 471, SEC ID NO: 473, SEC ID NO: 475, SEC ID NO: 477, SEC ID NO: 479, SEC ID NO: 481, SEC ID NO: 483, SEC ID NO: 485, SEC ID NO: 487, SEC ID NO: 489, SEC ID NO: 516, SEC ID NO: 539, SEC ID NO: 544, SEC ID NO: 549, SEC ID NO: 554, SEC ID NO: 559, SEC ID NO: 564, SEC ID NO: 569, SEC ID NO: 574, SEC ID NO: 579, SEC ID NO: 698 o la SEC ID NO: 737 y la CDR2 de cadena pesada puede comprender una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 85 %, al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 92 %, al menos aproximadamente 93 %, al menos aproximadamente 94 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente 97 %, al menos aproximadamente 98 % o al menos aproximadamente 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de las SEC ID NO: 202, SEC ID NO: 392, SEC ID NO: 398, SEC ID NO: 402, SEC ID NO: 406, SEC ID NO: 410, SEC ID NO: 414, SEC ID NO: 418, SEC ID NO: 422, SEC ID NO: 426, SEC ID NO: 430, SEC ID NO: 434, SEC ID NO: 467, SEC ID NO: 471, SEC ID NO: 473, SEC ID NO: 475, SEC ID NO: 477, SEC ID NO: 479, SEC ID NO: 481, SEC ID NO: 483, SEC ID NO: 485, SEC ID NO: 487, SEC ID NO: 489, SEC ID NO: 516, SEC ID NO: 539, SEC ID NO: 544, SEC ID NO: 549, SEC ID NO: 554, SEC ID NO: 559, SEC ID NO: 564, SEC ID NO: 569, SEC ID NO: 574, SEC ID NO: 579, SEC ID NO: 698 o la SEC ID NO: 737. La CDR3 de cadena pesada puede comprender la secuencia de aminoácidos de las SEC ID NO: 204, SEC ID NO: 220, SEC ID NO: 222, SEC ID NO: 223, SEC ID NO: 228, SEC ID NO: 231, SEC ID NO: 394, SEC ID NO: 469, SEC ID NO: 518, SEC ID NO: 534, SEC ID NO: 535, SEC ID NO: 536, SEC ID NO: 699 o la SEC ID NO: 738 y la CDR3 de cadena pesada puede comprender una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 85 %, al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 92 %, al menos aproximadamente 93 %, al menos aproximadamente 94 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente 97 %, al menos aproximadamente 98 % o al menos aproximadamente 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de las SEC ID NO: 204, SEC ID NO: 220, SEC ID NO: 222, SEC ID NO: 223, SEC ID NO: 228, SEC ID NO: 231, SEC ID NO: 394, SEC ID NO: 469, SEC ID NO: 518, SEC ID NO: 534, SEC ID NO: 535, SEC ID NO: 536, SEC ID NO: 699 o la SEC ID NO: 738. Se entenderá que los anticuerpos que comprenden cambios de aminoácidos en la región o las regiones determinantes de complementariedad de cadena pesada (CDR1, CDR2 y/o CDR3) conservan la capacidad de unirse específicamente con CD38. La actividad de unión específica de CD38 conservada (incluyendo afinidad) es preferentemente aproximadamente igual que la actividad de unión (incluyendo afinidad) de un anticuerpo sin ningún cambio de aminoácidos en ninguna región o regiones determinantes de complementariedad de cadena pesada, aunque la actividad de unión (incluyendo afinidad) puede ser menor o mayor que un anticuerpo sin ningún cambio de aminoácidos en ninguna región o regiones determinantes de complementariedad de cadena pesada.

La FWR1 de cadena ligera puede comprender la secuencia de aminoácidos de las SEC ID NO: 232, SEC ID NO: 247, SEC ID NO: 259, SEC ID NO: 260, SEC ID NO: 261, SEC ID NO: 436, SEC ID NO: 443, SEC ID NO: 447, SEC ID NO: 451, SEC ID NO: 455, SEC ID NO: 459, SEC ID NO: 463, SEC ID NO: 490, SEC ID NO: 497, SEC ID NO: 501, SEC ID NO: 509, SEC ID NO: 582, SEC ID NO: 607, SEC ID NO: 614, SEC ID NO: 618, SEC ID NO: 622, SEC ID NO: 626, SEC ID NO: 630, SEC ID NO: 634 o la SEC ID NO: 638 y la FWR1 de cadena ligera puede comprender una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 85 %, al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 92 %, al menos aproximadamente 93 %, al menos aproximadamente 94 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente 97 %, al menos aproximadamente 98 % o al menos aproximadamente 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de las SEC ID NO: 232, SEC ID NO: 247, SEC ID NO: 259, SEC ID NO: 260, SEC ID NO: 261, SEC ID NO: 436, SEC ID NO: 443, SEC ID NO: 447, SEC ID NO: 451, SEC ID NO: 455, SEC ID NO: 459, SEC ID NO: 463,

SEC ID NO: 490, SEC ID NO: 497, SEC ID NO: 501, SEC ID NO: 509, SEC ID NO: 582, SEC ID NO: 607, SEC ID NO: 614, SEC ID NO: 618, SEC ID NO: 622, SEC ID NO: 626, SEC ID NO: 630, SEC ID NO: 634 o la SEC ID NO: 638. La FWR2 de cadena ligera puede comprender la secuencia de aminoácidos de las SEC ID NO: 234, SEC ID NO: 246, SEC ID NO: 248, SEC ID NO: 281, SEC ID NO: 283, SEC ID NO: 285, SEC ID NO: 287, SEC ID NO: 289, SEC ID NO: 291, SEC ID NO: 293, SEC ID NO: 295, SEC ID NO: 297, SEC ID NO: 438, SEC ID NO: 444, SEC ID NO: 448, SEC ID NO: 452, SEC ID NO: 456, SEC ID NO: 460, SEC ID NO: 464, SEC ID NO: 492, SEC ID NO: 498, SEC ID NO: 502, SEC ID NO: 506, SEC ID NO: 510, SEC ID NO: 584, SEC ID NO: 592, SEC ID NO: 593, SEC ID NO: 609, SEC ID NO: 615, SEC ID NO: 619, SEC ID NO: 623, SEC ID NO: 627, SEC ID NO: 631, SEC ID NO: 635 o la SEC ID NO: 639 y la FWR2 de cadena ligera puede comprender una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 85 %, al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 92 %, al menos aproximadamente 93 %, al menos aproximadamente 94 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente 97 %, al menos aproximadamente 98 % o al menos aproximadamente 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de las SEC ID NO: 234, SEC ID NO: 246, SEC ID NO: 248, SEC ID NO: 281, SEC ID NO: 283, SEC ID NO: 285, SEC ID NO: 287, SEC ID NO: 289, SEC ID NO: 291, SEC ID NO: 293, SEC ID NO: 295, SEC ID NO: 297, SEC ID NO: 438, SEC ID NO: 444, SEC ID NO: 448, SEC ID NO: 452, SEC ID NO: 456, SEC ID NO: 460, SEC ID NO: 464, SEC ID NO: 492, SEC ID NO: 498, SEC ID NO: 502, SEC ID NO: 506, SEC ID NO: 510, SEC ID NO: 584, SEC ID NO: 592, SEC ID NO: 593, SEC ID NO: 609, SEC ID NO: 615, SEC ID NO: 619, SEC ID NO: 623, SEC ID NO: 627, SEC ID NO: 631, SEC ID NO: 635 o la SEC ID NO: 639. La FWR3 de cadena ligera puede comprender la secuencia de aminoácidos de las SEC ID NO: 236, SEC ID NO: 245, SEC ID NO: 265, SEC ID NO: 266, SEC ID NO: 267, SEC ID NO: 271, SEC ID NO: 272, SEC ID NO: 274, SEC ID NO: 276, SEC ID NO: 277, SEC ID NO: 278, SEC ID NO: 279, SEC ID NO: 280, SEC ID NO: 282, SEC ID NO: 284, SEC ID NO: 286, SEC ID NO: 288, SEC ID NO: 290, SEC ID NO: 292, SEC ID NO: 294, SEC ID NO: 296, SEC ID NO: 298, SEC ID NO: 300, SEC ID NO: 302, SEC ID NO: 304, SEC ID NO: 306, SEC ID NO: 308, SEC ID NO: 310, SEC ID NO: 312, SEC ID NO: 314, SEC ID NO: 316, SEC ID NO: 318, SEC ID NO: 320, SEC ID NO: 323, SEC ID NO: 327, SEC ID NO: 331, SEC ID NO: 335, SEC ID NO: 339, SEC ID NO: 343, SEC ID NO: 347, SEC ID NO: 351, SEC ID NO: 355, SEC ID NO: 359, SEC ID NO: 363, SEC ID NO: 367, SEC ID NO: 371, SEC ID NO: 375, SEC ID NO: 379, SEC ID NO: 383, SEC ID NO: 387, SEC ID NO: 440, SEC ID NO: 445, SEC ID NO: 449, SEC ID NO: 453, SEC ID NO: 457, SEC ID NO: 461, SEC ID NO: 465, SEC ID NO: 494, SEC ID NO: 499, SEC ID NO: 503, SEC ID NO: 507, SEC ID NO: 511, SEC ID NO: 586, SEC ID NO: 611, SEC ID NO: 616, SEC ID NO: 620, SEC ID NO: 624, SEC ID NO: 628, SEC ID NO: 632, SEC ID NO: 636 o la SEC ID NO: 640 y la FWR3 de cadena ligera puede comprender una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 85 %, al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 92 %, al menos aproximadamente 93 %, al menos aproximadamente 94 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente 97 %, al menos aproximadamente 98 % o al menos aproximadamente 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de las SEC ID NO: 236, SEC ID NO: 245, SEC ID NO: 265, SEC ID NO: 266, SEC ID NO: 267, SEC ID NO: 271, SEC ID NO: 272, SEC ID NO: 274, SEC ID NO: 276, SEC ID NO: 277, SEC ID NO: 278, SEC ID NO: 279, SEC ID NO: 280, SEC ID NO: 282, SEC ID NO: 284, SEC ID NO: 286, SEC ID NO: 288, SEC ID NO: 290, SEC ID NO: 292, SEC ID NO: 294, SEC ID NO: 296, SEC ID NO: 298, SEC ID NO: 300, SEC ID NO: 302, SEC ID NO: 304, SEC ID NO: 306, SEC ID NO: 308, SEC ID NO: 310, SEC ID NO: 312, SEC ID NO: 314, SEC ID NO: 316, SEC ID NO: 318, SEC ID NO: 320, SEC ID NO: 323, SEC ID NO: 327, SEC ID NO: 331, SEC ID NO: 335, SEC ID NO: 339, SEC ID NO: 343, SEC ID NO: 347, SEC ID NO: 351, SEC ID NO: 355, SEC ID NO: 359, SEC ID NO: 363, SEC ID NO: 367, SEC ID NO: 371, SEC ID NO: 375, SEC ID NO: 379, SEC ID NO: 383, SEC ID NO: 387, SEC ID NO: 440, SEC ID NO: 445, SEC ID NO: 449, SEC ID NO: 453, SEC ID NO: 457, SEC ID NO: 461, SEC ID NO: 465, SEC ID NO: 494, SEC ID NO: 499, SEC ID NO: 503, SEC ID NO: 507, SEC ID NO: 511, SEC ID NO: 586, SEC ID NO: 611, SEC ID NO: 616, SEC ID NO: 620, SEC ID NO: 624, SEC ID NO: 628, SEC ID NO: 632, SEC ID NO: 636 o la SEC ID NO: 640. La FWR4 de cadena ligera puede comprender la secuencia de aminoácidos de las SEC ID NO: 238, SEC ID NO: 442, SEC ID NO: 446, SEC ID NO: 450, SEC ID NO: 454, SEC ID NO: 458, SEC ID NO: 462, SEC ID NO: 496, SEC ID NO: 500, SEC ID NO: 504, SEC ID NO: 508, SEC ID NO: 512, SEC ID NO: 588, SEC ID NO: 613, SEC ID NO: 617, SEC ID NO: 621, SEC ID NO: 625, SEC ID NO: 629, SEC ID NO: 633, SEC ID NO: 637 o la SEC ID NO: 641 y la FWR4 de cadena ligera puede comprender una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 85 %, al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 92 %, al menos aproximadamente 93 %, al menos aproximadamente 94 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente 97 %, al menos aproximadamente 98 % o al menos aproximadamente 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de las SEC ID NO: 238, SEC ID NO: 442, SEC ID NO: 446, SEC ID NO: 450, SEC ID NO: 454, SEC ID NO: 458, SEC ID NO: 462, SEC ID NO: 496, SEC ID NO: 500, SEC ID NO: 504, SEC ID NO: 508, SEC ID NO: 512, SEC ID NO: 588, SEC ID NO: 613, SEC ID NO: 617, SEC ID NO: 621, SEC ID NO: 625, SEC ID NO: 629, SEC ID NO: 633, SEC ID NO: 637 o la SEC ID NO: 641. Se entenderá que los anticuerpos que comprenden cambios de aminoácidos en la región o las regiones marco conservadas de cadena ligera (FWR1, FWR2, FWR3 y/o FWR4) conservan la capacidad de unirse específicamente con CD38. La actividad de unión específica de CD38 conservada (incluyendo afinidad) es preferentemente aproximadamente igual que la actividad de unión (incluyendo afinidad) de un anticuerpo sin ningún cambio de aminoácidos en ninguna región o regiones marco conservadas de cadena ligera, aunque la actividad de unión (incluyendo afinidad) puede ser menor o mayor que un anticuerpo sin ningún cambio de aminoácidos en ninguna región o regiones marco conservadas de cadena ligera.

La CDR1 de cadena ligera puede comprender la secuencia de aminoácidos de las SEC ID NO: 233, SEC ID NO: 250,

SEC ID NO: 525, SEC ID NO: 255, SEC ID NO: 262, SEC ID NO: 263, SEC ID NO: 319, SEC ID NO: 322, SEC ID NO: 325, SEC ID NO: 329, SEC ID NO: 333, SEC ID NO: 337, SEC ID NO: 341, SEC ID NO: 345, SEC ID NO: 349, SEC ID NO: 353, SEC ID NO: 357, SEC ID NO: 361, SEC ID NO: 365, SEC ID NO: 369, SEC ID NO: 373, SEC ID NO: 377, SEC ID NO: 381, SEC ID NO: 385, SEC ID NO: 437, SEC ID NO: 491, SEC ID NO: 583, SEC ID NO: 589, SEC ID NO: 590, SEC ID NO: 608 o SEC ID NO: 696, y la CDR1 de cadena ligera puede comprender una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 85 %, al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 92 %, al menos aproximadamente 93 %, al menos aproximadamente 94 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente 97 %, al menos aproximadamente 98 % o al menos aproximadamente 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de las SEC ID NO: 233, SEC ID NO: 250, SEC ID NO: 525, SEC ID NO: 255, SEC ID NO: 262, SEC ID NO: 263, SEC ID NO: 319, SEC ID NO: 322, SEC ID NO: 325, SEC ID NO: 329, SEC ID NO: 333, SEC ID NO: 337, SEC ID NO: 341, SEC ID NO: 345, SEC ID NO: 349, SEC ID NO: 353, SEC ID NO: 357, SEC ID NO: 361, SEC ID NO: 365, SEC ID NO: 369, SEC ID NO: 373, SEC ID NO: 377, SEC ID NO: 381, SEC ID NO: 385, SEC ID NO: 437, SEC ID NO: 491, SEC ID NO: 583, SEC ID NO: 589, SEC ID NO: 590, SEC ID NO: 608 o SEC ID NO: 696. La CDR2 de cadena ligera puede comprender la secuencia de aminoácidos de las SEC ID NO: 235, SEC ID NO: 249, SEC ID NO: 253, SEC ID NO: 264, SEC ID NO: 299, SEC ID NO: 301, SEC ID NO: 303, SEC ID NO: 305, SEC ID NO: 307, SEC ID NO: 309, SEC ID NO: 311, SEC ID NO: 313, SEC ID NO: 315, SEC ID NO: 317, SEC ID NO: 326, SEC ID NO: 330, SEC ID NO: 334, SEC ID NO: 338, SEC ID NO: 342, SEC ID NO: 346, SEC ID NO: 350, SEC ID NO: 354, SEC ID NO: 358, SEC ID NO: 362, SEC ID NO: 366, SEC ID NO: 370, SEC ID NO: 374, SEC ID NO: 378, SEC ID NO: 382, SEC ID NO: 386, SEC ID NO: 439, SEC ID NO: 493, SEC ID NO: 585, SEC ID NO: 591, SEC ID NO: 605, SEC ID NO: 610 o la SEC ID NO: 747, y la CDR2 de cadena ligera puede comprender una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 85 %, al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 92 %, al menos aproximadamente 93 %, al menos aproximadamente 94 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente 97 %, al menos aproximadamente 98 % o al menos aproximadamente 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de las SEC ID NO: 235, SEC ID NO: 249, SEC ID NO: 253, SEC ID NO: 264, SEC ID NO: 299, SEC ID NO: 301, SEC ID NO: 303, SEC ID NO: 305, SEC ID NO: 307, SEC ID NO: 309, SEC ID NO: 311, SEC ID NO: 313, SEC ID NO: 315, SEC ID NO: 317, SEC ID NO: 326, SEC ID NO: 330, SEC ID NO: 334, SEC ID NO: 338, SEC ID NO: 342, SEC ID NO: 346, SEC ID NO: 350, SEC ID NO: 354, SEC ID NO: 358, SEC ID NO: 362, SEC ID NO: 366, SEC ID NO: 370, SEC ID NO: 374, SEC ID NO: 378, SEC ID NO: 382, SEC ID NO: 386, SEC ID NO: 439, SEC ID NO: 493, SEC ID NO: 585, SEC ID NO: 591, SEC ID NO: 605, SEC ID NO: 610 o la SEC ID NO: 747. La CDR3 de cadena ligera puede comprender la secuencia de aminoácidos de las SEC ID NO: 237, SEC ID NO: 244, SEC ID NO: 251, SEC ID NO: 254, SEC ID NO: 256, SEC ID NO: 257, SEC ID NO: 258, SEC ID NO: 268, SEC ID NO: 269, SEC ID NO: 270, SEC ID NO: 273, SEC ID NO: 275, SEC ID NO: 321, SEC ID NO: 324, SEC ID NO: 328, SEC ID NO: 332, SEC ID NO: 336, SEC ID NO: 340, SEC ID NO: 344, SEC ID NO: 348, SEC ID NO: 352, SEC ID NO: 356, SEC ID NO: 360, SEC ID NO: 364, SEC ID NO: 368, SEC ID NO: 372, SEC ID NO: 376, SEC ID NO: 380, SEC ID NO: 384, SEC ID NO: 388, SEC ID NO: 441, SEC ID NO: 495, SEC ID NO: 587, SEC ID NO: 594, SEC ID NO: 595, SEC ID NO: 596, SEC ID NO: 597, SEC ID NO: 598, SEC ID NO: 599, SEC ID NO: 600, SEC ID NO: 601, SEC ID NO: 602, SEC ID NO: 603, SEC ID NO: 604, SEC ID NO: 606 o la SEC ID NO: 612, y la CDR3 de cadena ligera puede comprender una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 85 %, al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 92 %, al menos aproximadamente 93 %, al menos aproximadamente 94 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente 97 %, al menos aproximadamente 98 % o al menos aproximadamente 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de las SEC ID NO: 237, SEC ID NO: 244, SEC ID NO: 251, SEC ID NO: 254, SEC ID NO: 256, SEC ID NO: 257, SEC ID NO: 258, SEC ID NO: 268, SEC ID NO: 269, SEC ID NO: 270, SEC ID NO: 273, SEC ID NO: 275, SEC ID NO: 321, SEC ID NO: 324, SEC ID NO: 328, SEC ID NO: 332, SEC ID NO: 336, SEC ID NO: 340, SEC ID NO: 344, SEC ID NO: 348, SEC ID NO: 352, SEC ID NO: 356, SEC ID NO: 360, SEC ID NO: 364, SEC ID NO: 368, SEC ID NO: 372, SEC ID NO: 376, SEC ID NO: 380, SEC ID NO: 384, SEC ID NO: 388, SEC ID NO: 441, SEC ID NO: 495, SEC ID NO: 587, SEC ID NO: 594, SEC ID NO: 595, SEC ID NO: 596, SEC ID NO: 597, SEC ID NO: 598, SEC ID NO: 599, SEC ID NO: 600, SEC ID NO: 601, SEC ID NO: 602, SEC ID NO: 603, SEC ID NO: 604, SEC ID NO: 606 o la SEC ID NO: 612. Se entenderá que los anticuerpos que comprenden cambios de aminoácidos en la región o las regiones determinantes de complementariedad de cadena ligera (CDR1, CDR2 y/o CDR3) conservan la capacidad de unirse específicamente con CD38. La actividad de unión específica de CD38 conservada (incluyendo afinidad) es preferentemente aproximadamente igual que la actividad de unión (incluyendo afinidad) de un anticuerpo sin ningún cambio de aminoácidos en ninguna región o regiones determinantes de complementariedad de cadena ligera, aunque la actividad de unión (incluyendo afinidad) puede ser menor o mayor que un anticuerpo sin ningún cambio de aminoácidos en ninguna región o regiones determinantes de complementariedad de cadena ligera.

El anticuerpo puede comprender pares de cadenas pesadas y ligeras particulares. Las cadenas pesadas que tienen las secuencias de aminoácidos de la SEC ID NO: 659 se pueden emparejar con cualquier cadena ligera que tenga las secuencias de aminoácidos de la SEC ID NO: 664, o las cadenas pesadas que tienen las secuencias de aminoácidos de la SEC ID NO: 665 se pueden emparejar con cualquier cadena ligera que tenga las secuencias de aminoácidos de la SEC ID NO: 666, o la cadena pesada que tiene las secuencias de aminoácidos de la SEC ID NO: 736 se pueden emparejar con cualquier cadena ligera que tenga las secuencias de aminoácidos de la SEC ID NO: 664.

Los pares de cadenas variables pesadas y variables ligeras que se describen en la presente memoria pueden

ES 2 938 708 T3

comprender pares de la siguiente tabla:

Nombre del anticuerpo	Variable pesada SEC ID NO: (aminoácido)	Variable ligera SEC ID NO: (aminoácido)
A02.10	19	14
A02.11	20	14
A02.112	34	65
A02.12	34	65
A02.13	35	65
A02.16	34	92
A02.17	34	93
A02.18	34	73
A02.19	34	74
A02.2	13	65
A02.20	34	75
A02.21	34	76
A02.22	34	77
A02.23	34	78
A02.24	34	79
A02.25	34	80
A02.26	34	81
A02.27	34	82
A02.28	34	83
A02.29	34	84
A02.3	17	65
A02.30	34	85
A02.31	34	86
A02.32	34	87
A02.33	34	88
A02.34	34	89
A02.35	34	90
A02.36	34	91
A02.37	34	66
A02.38	34	113
A02.39	34	112
A02.4	18	65
A02.40	111	65

ES 2 938 708 T3

A02.41	110	65
A02.43	110	113
A02.44	111	112
A02.46	34	67
A02.47	34	68
A02.48	34	69
A02.49	34	70
A02.5	19	65
A02.50	34	71
A02.51	34	72
A02.52	34	94
A02.53	34	95
A02.54	34	96
A02.55	34	97
A02.56	34	98
A02.57	34	99
A02.58	34	100
A02.59	34	101
A02.6	20	65
A02.60	34	102
A02.61	34	103
A02.62	34	104
A02.63	34	105
A02.64	34	106
A02.65	34	107
A02.66	34	108
A02.67	34	109
A02.8	17	14
A02.9	18	14
A10.1	165	161
A10.10	174	161
A10.11	175	161
A10.12	176	161
A10.13	177	161
A10.14	178	161

ES 2 938 708 T3

A10.15	179	161
A10.16	180	161
A10.17	156	181
A10.18	156	182
A10.19	156	183
A10.2	166	161
A10.20	156	184
A10.21	156	185
A10.22	156	186
A10.23	156	187
A10.24	156	188
A10.25	156	189
A10.26	156	190
A10.27	156	191
A10.28	156	192
A10.29	156	193
A10.3	167	161
A10.30	156	194
A10.31	156	195
A10.32	156	196
A10.35	197	161
A10.36	156	198
A10.38	152	161
A10.39	152	181
A10.4	168	161
A10.40	152	182
A10.41	152	183
A10.42	152	184
A10.43	152	185
A10.44	152	186
A10.45	152	187
A10.46	152	188
A10.47	152	189
A10.48	152	190
A10.49	152	191

ES 2 938 708 T3

A10.5	169	161
A10.50	152	192
A10.51	152	193
A10.52	152	194
A10.53	152	195
A10.54	152	196
A10.57	152	198
A10.59	156	161
A10.6	170	161
A10.7	171	161
A10.8	172	161
A10.9	173	161
A10A2.0 (quimérico)	148	157
A10A2.1	149	158
A10A2.10	150	160
A10A2.11	150	161
A10A2.12	150	162
A10A2.13	150	163
A10A2.14	150	164
A10A2.15	151	158
A10A2.16	151	159
A10A2.17	151	160
A10A2.18	151	161
A10A2.19	151	162
A10A2.2	149	159
A10A2.20	151	163
A10A2.21	151	164
A10A2.22	152	158
A10A2.23	152	159
A10A2.24	152	160
A10A2.25	152	161
A10A2.26	152	162
A10A2.27	152	163
A10A2.28	152	164
A10A2.29	153	158

ES 2 938 708 T3

A10A2.3	149	160
A10A2.30	153	159
A10A2.31	153	160
A10A2.32	153	161
A10A2.33	153	162
A10A2.34	153	163
A10A2.35	153	164
A10A2.36	154	158
A10A2.37	154	159
A10A2.38	154	160
A10A2.39	154	161
A10A2.4	149	161
A10A2.40	154	162
A10A2.41	154	163
A10A2.42	154	164
A10A2.43	154	158
A10A2.44	155	159
A10A2.45	155	160
A10A2.46	155	161
A10A2.47	155	162
A10A2.48	155	163
A10A2.49	155	164
A10A2.5	149	162
A10A2.50	156	158
A10A2.51	156	159
A10A2.52	156	160
A10A2.53	156	161
A10A2.54	156	162
A10A2.55	156	163
A10A2.56	156	164
A10A2.6	149	163
A10A2.7	149	164
A10A2.8	150	158
A10A2.9	150	159
A5D1.0 (quimérico)	114	125

ES 2 938 708 T3

A5D1.1	115	126
A5D1.10	116	129
A5D1.11	116	130
A5D1.12	116	131
A5D1.13	117	126
A5D1.14	117	127
A5D1.15	117	128
A5D1.16	117	129
A5D1.17	117	130
A5D1.18	117	131
A5D1.19	118	126
A5D1.2	115	127
A5D1.20	118	127
A5D1.21	118	128
A5D1.22	118	129
A5D1.23	118	130
A5D1.24	118	131
A5D1.25	119	126
A5D1.26	119	127
A5D1.27	119	128
A5D1.28	119	129
A5D1.29	119	130
A5D1.3	115	128
A5D1.30	119	131
A5D1.31	120	126
A5D1.32	120	127
A5D1.33	120	128
A5D1.34	120	129
A5D1.35	120	130
A5D1.36	120	131
A5D1.37	121	126
A5D1.38	121	127
A5D1.39	121	128
A5D1.4	115	129
A5D1.40	121	129

ES 2 938 708 T3

A5D1.41	121	130
A5D1.42	121	131
A5D1.43	122	126
A5D1.44	122	127
A5D1.45	122	128
A5D1.46	122	129
A5D1.47	122	130
A5D1.48	122	131
A5D1.49	123	126
A5D1.5	115	130
A5D1.50	123	127
A5D1.51	123	128
A5D1.52	123	129
A5D1.53	123	130
A5D1.54	123	131
A5D1.55	124	126
A5D1.56	124	127
A5D1.57	124	128
A5D1.58	124	129
A5D1.59	124	130
A5D1.6	115	131
A5D1.60	124	131
A5D1.7	116	126
A5D1.8	116	127
A5D1.9	116	128
A5E8.0 (quimérico)	132	143
A5E8.1	133	144
A5E8.10	135	145
A5E8.11	135	146
A5E8.12	135	147
A5E8.13	136	144
A5E8.14	136	145
A5E8.15	136	146
A5E8.16	136	147
A5E8.17	137	144

ES 2 938 708 T3

A5E8.18	137	145
A5E8.19	137	146
A5E8.2	133	145
A5E8.20	137	147
A5E8.21	138	144
A5E8.22	138	145
A5E8.23	138	146
A5E8.24	138	147
A5E8.25	139	144
A5E8.26	139	145
A5E8.27	139	146
A5E8.28	139	147
A5E8.29	140	144
A5E8.3	133	146
A5E8.30	140	145
A5E8.31	140	146
A5E8.32	140	147
A5E8.33	141	144
A5E8.34	141	145
A5E8.35	141	146
A5E8.36	141	147
A5E8.37	142	144
A5E8.38	142	145
A5E8.39	142	146
A5E8.4	133	147
A5E8.40	142	147
A5E8.5	134	144
A5E8.6	134	145
A5 E8.7	134	146
A5E8.8	134	147
A5E8.9	135	144
X02.10	19	14
X02.100	13	58
X02.101	13	59
X02.102	13	60

ES 2 938 708 T3

X02.103	13	61
X02.104	13	62
X02.105	13	63
X02.106	13	64
X02.107	13	65
X02.108	32	14
X02.11	20	14
X02.110	33	14
X02.114	13	660
X02.115	13	661
X02.116	13	662
X02.117	13	663
X02.118	34	700
X02.119	34	701
X02.120	728	700
X02.121	729	700
X02.122	730	700
X02.123	731	700
X02.124	728	701
X02.125	729	701
X02.126	730	701
X02.127	731	701
X02.68	21	14
X02.69	22	14
X02.70	23	14
X02.71	24	14
X02.72	25	14
X02.73	26	14
X02.74	27	14
X02.75	28	14
X02.76	29	14
X02.77	30	14
X02.78	31	14
X02.8	17	14
X02.80	13	38

ES 2 938 708 T3

X02.81	13	39
X02.82	13	40
X02.83	13	41
X02.84	13	42
X02.85	13	43
X02.86	13	44
X02.87	13	45
X02.88	13	46
X02.89	13	47
X02.9	18	14
X02.90	13	48
X02.91	13	49
X02.92	13	50
X02.93	13	51
X02.94	13	52
X02.95	13	53
X02.96	13	54
X02.97	13	55
X02.98	13	56
X02.99	13	57
X10.100	720	706
X10.101	721	706
X10.102	722	706
X10.103	723	706
X10.104	739	706
X10.105	740	706
X10.106	741	706
X10.107	742	706
X10.108	720	707
X10.109	721	707
X10.110	722	707
X10.111	723	707
X10.112	739	707
X10.113	740	707
X10.114	741	707

ES 2 938 708 T3

X10.115	742	707
X10.116	720	708
X10.117	721	708
X10.118	722	708
X10.119	723	708
X10.120	739	708
X10.121	740	708
X10.122	741	708
X10.123	742	708
X10.124	720	709
X10.125	721	709
X10.126	722	709
X10.127	723	709
X10.128	739	709
X10.129	740	709
X10.130	741	709
X10.131	742	709
X10.132	720	710
X10.133	721	710
X10.134	722	710
X10.135	723	710
X10.136	739	710
X10.137	740	710
X10.138	741	710
X10.139	742	710
X10.140	720	711
X10.141	721	711
X10.142	722	711
X10.143	723	711
X10.144	739	711
X10.145	740	711
X10.146	741	711
X10.147	742	711
X10.60	156	704
X10.61	156	705

ES 2 938 708 T3

X10.62	156	706
X10.63	156	707
X10.64	156	708
X10.65	156	709
X10.66	156	710
X10.67	156	711
X10.68	720	161
X10.69	721	161
X10.70	722	161
X10.71	723	161
X10.72	739	161
X10.73	740	161
X10.74	741	161
X10.75	742	161
X10.76	152	704
X10.77	152	705
X10.78	152	706
X10.79	152	707
X10.80	152	708
X10.81	152	709
X10.82	152	710
X10.83	152	711
X10.84	720	704
X10.85	721	704
X10.86	722	704
X10.87	723	704
X10.88	739	704
X10.89	740	704
X10.90	741	704
X10.91	742	704
X10.92	720	705
X10.93	721	705
X10.94	722	705
X10.95	723	705
X10.96	739	705

X10.97	740	705
X10.98	741	705
X10.99	742	705
IgG4 X910/12-HC-L0-IFN-alfa (A145D)	110	112
IgG4 X913/15-HC-L0-IFN-alfa (A145D)	111	113

Los anticuerpos se pueden fusionar con ligandos atenuados, por ejemplo, para formar construcciones de anticuerpo-ligando atenuado, que muestran un índice de especificidad de antígeno elevado con respecto a la activación de rutas de señalización debido a la acción del ligando atenuado en un receptor de superficie celular. Estas construcciones se basan en la observación de que, en el contexto de una construcción de anticuerpo-ligando, la parte de ligando se puede mutar de tal manera que la actividad del ligando en células negativas para antígeno se atenúe drásticamente, mientras que la actividad del ligando en células positivas para antígeno solo se atenúa moderadamente, o no se atenúa. Dichas construcciones presentan potencia uno, dos, tres, cuatro o cinco órdenes de magnitud mayor en células positivas para antígeno en comparación con células negativas para antígeno que el ligando libre. La construcción de anticuerpo-ligando atenuado puede conservar al menos 1 %, al menos 10 %, al menos 20 %, al menos 30 %, al menos 40 % o al menos 50 % de la potencia en células positivas para antígeno como el ligando libre no atenuado (es decir, no unido a un anticuerpo). La construcción de anticuerpo-ligando atenuado puede conservar al menos 30 %, al menos 50 %, al menos 75 % o al menos 90 % de la actividad máxima del ligando libre no atenuado (es decir, no unido a un anticuerpo). La actividad máxima incluye la cantidad de actividad de señalización (o efecto corriente abajo de la misma) en la parte de meseta alta de una curva de dosis-respuesta, donde aumentos adicionales en el agente no aumentan adicionalmente la cantidad de respuesta.

La fusión de anticuerpo con y la inclusión de una mutación o mutaciones atenuantes en el ligando de interferón aumenta el índice de especificidad de antígeno (IEA) en más de 10 veces, preferentemente más de 50 veces, preferentemente más de 100 veces, preferentemente más de 1000 veces o preferentemente más de 10.000 veces, en relación con un anticuerpo sin fusión. El IEA comprende la potencia con factor de aumento en la actividad de señalización de la construcción de anticuerpo-ligando de IFN en relación con el ligando de polipéptido libre no mutado en células positivas para antígeno diana, multiplicado por la potencia con factor de reducción en la actividad de señalización en relación con el ligando polipeptídico libre no mutado en células negativas para antígeno diana. La potencia puede estar representada cuantitativamente por el valor de CE_{50} , que es el punto medio matemático de una curva de dosis-respuesta, en el que la dosis se refiere a la concentración de ligando o construcción de anticuerpo-ligando en un ensayo y la respuesta se refiere a la respuesta cuantitativa de las células a la actividad de señalización del ligando a una dosis particular. Por tanto, por ejemplo, cuando se muestra que un primer compuesto posee una CE_{50} (expresada, por ejemplo, en unidades molares) que es 10 veces menor que la CE_{50} de un segundo compuesto en las mismas células, normalmente cuando se mide por el mismo procedimiento, se dice que el primer compuesto tiene una potencia 10 veces mayor. Por el contrario, cuando se muestra que un primer compuesto posee una CE_{50} que es 10 veces mayor que la CE_{50} de un segundo compuesto en las mismas células, normalmente cuando se mide por el mismo procedimiento, se dice que el primer compuesto tiene una potencia 10 veces menor.

Los anticuerpos son preferentemente capaces de unirse con células CD38 positivas. El anticuerpo puede unirse con una célula CD38 positiva con un valor de CE_{50} de menos de aproximadamente 100 nM. El anticuerpo puede unirse con una célula CD38 positiva con un valor de CE_{50} de menos de aproximadamente 75 nM. El anticuerpo puede unirse con una célula CD38 positiva con un valor de CE_{50} de menos de aproximadamente 50 nM. El anticuerpo puede unirse con una célula CD38 positiva con un valor de CE_{50} de menos de aproximadamente 30 nM. El anticuerpo puede unirse con una célula CD38 positiva con un valor de CE_{50} de menos de aproximadamente 25 nM. El anticuerpo puede unirse con una célula CD38 positiva con un valor de CE_{50} de menos de aproximadamente 20 nM. El anticuerpo puede unirse con una célula CD38 positiva con un valor de CE_{50} de menos de aproximadamente 18 nM. El anticuerpo puede unirse con una célula CD38 positiva con un valor de CE_{50} de menos de aproximadamente 15 nM. El anticuerpo puede unirse con una célula CD38 positiva con un valor de CE_{50} de menos de aproximadamente 13 nM. El anticuerpo puede unirse con una célula CD38 positiva con un valor de CE_{50} de menos de aproximadamente 10 nM.

El interferón unido al anticuerpo comprende preferentemente alteraciones en su secuencia de aminoácidos, incluyendo mutaciones puntuales y/o supresiones que hacen que el interferón sea menos activo en la estimulación de sus respectivos receptores en las células que carecen de la expresión de la superficie celular del antígeno CD38 con el que se une el anticuerpo. Una variante muy preferida de interferón alfa comprende un cambio de aminoácido en la posición 168 de la molécula de interferón alfa 2b de la SEC ID NO: 7. Por ejemplo, el aminoácido en la posición 168, que es una alanina en la molécula de IFN-alfa2b original, preferentemente se cambia a una glicina (Gly/G) (SEC ID NO: 650) o ácido aspártico (Asp/D) (SEC ID NO: 647). El IFN-alfa2b se trunca en su extremo N cuando el IFN-alfa2b se fusiona con un dominio constante de cadena pesada de IgG tal como el dominio constante de cadena pesada de IgG1 humana o IgG4 humana. El IFN-alfa2b truncado no tiene los veintitrés aminoácidos N-terminales de la SEC ID

NO: 7 (se suprimen de Met 1 a Gly 23) y el IFN-alfa2b truncado comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 648. El IFN-alfa2b truncado también puede comprender el cambio de aminoácidos en lo que anteriormente era la posición 168, pero que se convierte en la posición 145 en la proteína truncada (p. ej., la alanina 168 se convierte en alanina 145). En el IFN-alfa2b truncado, la alanina preferentemente se cambia a una glicina (Gly/G) (SEC ID NO: 651) o ácido aspártico (Asp/D) (SEC ID NO: 649). Se prefiere en particular interferón con alteración A145D (SEC ID NO: 647 o la SEC ID NO: 649) como el ligando atenuado fusionado con los anticuerpos de la divulgación. Cualquiera de estas versiones atenuadas, mutadas puntualmente, de IFN-alfa puede unirse con cualquier anticuerpo descrito en el presente documento, por ejemplo, como una construcción de anticuerpo-interferón atenuado.

El enlace entre el anticuerpo y el interferón comprende preferentemente una fusión, por ejemplo, un enlace peptídico entre el extremo N o el C del interferón y el extremo N o C de la cadena pesada o ligera del anticuerpo. No hay ningún conector presente entre el anticuerpo y el interferón, y por tanto el anticuerpo y el interferón se fusionan directamente. Se cree que la fusión directa, sin un péptido conector intermedio, proporciona al menos un grado medible de atenuación de la proteína de interferón y también se cree que esta atenuación es aditiva con la atenuación de la proteína de interferón que surge de las mutaciones introducidas en la proteína de interferón, incluyendo las descritas o ejemplificadas en el presente documento.

Se presentan secuencias polinucleotídicas que codifican anticuerpos y sus subdominios (p. ej., FWR y CDR) en la divulgación. Los polinucleótidos incluyen, pero sin limitación, ARN, ADN, ADNc, híbridos de ARN y ADN y cadenas mono, bi o tricatenarias de ARN, ADN o híbridos de los mismos.

El polinucleótido de la invención comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un anticuerpo que se une específicamente con CD38, comprendiendo el anticuerpo una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 156 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 185.

Los polinucleótidos pueden codificar la cadena pesada de un anticuerpo que se une específicamente con un epítipo en CD38. Los polinucleótidos que se desvelan en la presente memoria pueden codificar una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEC ID NO: 667, SEC ID NO: 668, SEC ID NO: 679, SEC ID NO: 680, SEC ID NO: 681, SEC ID NO: 682, SEC ID NO: 683, SEC ID NO: 684, SEC ID NO: 686, SEC ID NO: 695, SEC ID NO: 724, SEC ID NO: 725, SEC ID NO: 726, SEC ID NO: 727, SEC ID NO: 732, SEC ID NO: 733, SEC ID NO: 734, SEC ID NO: 735, SEC ID NO: 743, SEC ID NO: 744, SEC ID NO: 745 o la SEC ID NO: 746. Los polinucleótidos que se desvelan en la presente memoria pueden codificar una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEC ID NO: 669, SEC ID NO: 670, SEC ID NO: 671, SEC ID NO: 672, SEC ID NO: 673, SEC ID NO: 674, SEC ID NO: 675, SEC ID NO: 676, SEC ID NO: 677, SEC ID NO: 678, SEC ID NO: 688, SEC ID NO: 689, SEC ID NO: 690, SEC ID NO: 692, SEC ID NO: 693, SEC ID NO: 702, SEC ID NO: 703, SEC ID NO: 712, SEC ID NO: 713, SEC ID NO: 714, SEC ID NO: 715, SEC ID NO: 716, SEC ID NO: 717, SEC ID NO: 718 o la SEC ID NO: 719. Los polinucleótidos que se desvelan en la presente memoria pueden comprender la secuencia de ácido nucleico de cualquiera de las SEC ID NO: 667, SEC ID NO: 668, SEC ID NO: 679, SEC ID NO: 680, SEC ID NO: 681, SEC ID NO: 682, SEC ID NO: 683, SEC ID NO: 684, SEC ID NO: 686, SEC ID NO: 695, SEC ID NO: 724, SEC ID NO: 725, SEC ID NO: 726, SEC ID NO: 727, SEC ID NO: 732, SEC ID NO: 733, SEC ID NO: 734, SEC ID NO: 735, SEC ID NO: 743, SEC ID NO: 744, SEC ID NO: 745, SEC ID NO: 746, SEC ID NO: 669, SEC ID NO: 670, SEC ID NO: 671, SEC ID NO: 672, SEC ID NO: 673, SEC ID NO: 674, SEC ID NO: 675, SEC ID NO: 676, SEC ID NO: 677, SEC ID NO: 678, SEC ID NO: 688, SEC ID NO: 689, SEC ID NO: 690, SEC ID NO: 692, SEC ID NO: 693, SEC ID NO: 702, SEC ID NO: 703, SEC ID NO: 712, SEC ID NO: 713, SEC ID NO: 714, SEC ID NO: 715, SEC ID NO: 716, SEC ID NO: 717, SEC ID NO: 718 o la SEC ID NO: 719. El polinucleótido puede comprender una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos aproximadamente 80 %, al menos aproximadamente 85 %, al menos aproximadamente 86 %, al menos aproximadamente 87 %, al menos aproximadamente 88 %, al menos aproximadamente 89 %, al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 91 %, al menos aproximadamente 92 %, al menos aproximadamente 93 %, al menos aproximadamente 94 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente 97 %, al menos aproximadamente 98 % o al menos aproximadamente 99 % de identidad de secuencia con cualquiera de las SEC ID NO: 667, SEC ID NO: 668, SEC ID NO: 679, SEC ID NO: 680, SEC ID NO: 681, SEC ID NO: 682, SEC ID NO: 683, SEC ID NO: 684, SEC ID NO: 686, SEC ID NO: 695, SEC ID NO: 724, SEC ID NO: 725, SEC ID NO: 726, SEC ID NO: 727, SEC ID NO: 732, SEC ID NO: 733, SEC ID NO: 734, SEC ID NO: 735, SEC ID NO: 743, SEC ID NO: 744, SEC ID NO: 745, SEC ID NO: 746, SEC ID NO: 669, SEC ID NO: 670, SEC ID NO: 671, SEC ID NO: 672, SEC ID NO: 673, SEC ID NO: 674, SEC ID NO: 675, SEC ID NO: 676, SEC ID NO: 677, SEC ID NO: 678, SEC ID NO: 688, SEC ID NO: 689, SEC ID NO: 690, SEC ID NO: 692, SEC ID NO: 693, SEC ID NO: 702, SEC ID NO: 703, SEC ID NO: 712, SEC ID NO: 713, SEC ID NO: 714, SEC ID NO: 715, SEC ID NO: 716, SEC ID NO: 717, SEC ID NO: 718 o la SEC ID NO: 719, y dichas variantes codifican preferentemente los mismos aminoácidos codificados por la secuencia polinucleotídica de las SEC ID NO: 667, SEC ID NO: 668, SEC ID NO: 679, SEC ID NO: 680, SEC ID NO: 681, SEC ID NO: 682, SEC ID NO: 683, SEC ID NO: 684, SEC ID NO: 686, SEC ID NO: 695, SEC ID NO: 724, SEC ID NO: 725, SEC ID NO: 726, SEC ID NO: 727, SEC ID NO: 732, SEC ID NO: 733, SEC ID NO: 734, SEC ID NO: 735, SEC ID NO: 743, SEC ID NO: 744, SEC ID NO: 745, SEC ID NO: 746, SEC ID NO: 669, SEC ID NO: 670, SEC ID NO: 671, SEC ID NO: 672, SEC ID NO: 673, SEC ID NO: 674, SEC ID NO: 675, SEC ID NO: 676, SEC ID NO: 677, SEC ID NO: 678, SEC ID NO: 688, SEC ID NO: 689, SEC ID NO: 690, SEC ID NO: 692, SEC ID NO: 693, SEC ID NO: 702, SEC ID NO: 703, SEC ID NO: 712, SEC ID NO: 713, SEC ID NO: 714, SEC ID NO: 715, SEC ID NO: 716, SEC ID

NO: 717, SEC ID NO: 718 o la SEC ID NO: 719. Preferentemente, los anticuerpos codificados por las variantes polinucleotídicas se unirán específicamente con CD38 con una afinidad aproximadamente igual a la afinidad del anticuerpo codificado por la secuencia polinucleotídica original (no variante). La afinidad se puede medir, por ejemplo, según cualquier técnica descrita o ejemplificada en el presente documento, incluyendo técnicas descritas en los ejemplos. Los complementos de las secuencias polinucleotídicas y las secuencias polinucleotídicas variantes también están dentro del alcance de la divulgación.

También se incluyen en la invención los vectores que comprenden los polinucleótidos de la invención. Los vectores pueden ser vectores de expresión. Se proporcionan por tanto vectores de expresión recombinante que contienen una secuencia que codifica un polipéptido de interés. El vector de expresión puede contener una o más secuencias adicionales, tales como, pero sin limitación, secuencias reguladoras, un marcador de selección, un marcador de purificación o una señal de poliadenilación. Dichos elementos reguladores pueden incluir un promotor de la transcripción, potenciadores, sitios de unión ribosómica de ARNm o secuencias que controlan la terminación de la transcripción y la traducción.

Los vectores de expresión, especialmente vectores de expresión de mamíferos, puede incluir uno o más elementos no transcritos, tales como un origen de replicación, un promotor adecuado y potenciador ligado al gen para expresar, otras secuencias no transcritas flanqueantes 5' o 3', secuencias no traducidas 5' o 3' (tales como sitios de unión a ribosomas necesarios), un sitio de poliadenilación, sitios donantes y aceptores de corte y empalme o secuencias de terminación de la transcripción. También puede incorporarse un origen de replicación que confiere la capacidad de replicar en un hospedador específico.

Los vectores se pueden usar para transformar cualquiera de una amplia gama de células hospedadoras bien conocidas por los expertos en la técnica y preferentemente células hospedadoras capaces de expresar anticuerpos. Los vectores incluyen, sin limitación, plásmidos, fagémidos, baculovirus, bácmidos, cromosomas artificiales de bacterias (BAC), cromosomas artificiales de levadura (YAC) y baculovirus, así como otros vectores bacterianos, eucariotas, de levadura y víricos. Las células hospedadoras adecuadas incluyen, sin limitación, células CHO, células HEK293 o cualquier línea celular estable eucariota conocida o producida, y también incluyen bacterias, levadura y células de insectos.

Los anticuerpos también pueden ser producidos por células de hibridoma; siendo los procedimientos para producir hibridomas bien conocidos y establecidos en la técnica.

Se ha observado de acuerdo con la divulgación que cuando el ligando de interferón alfa, que tiene una o más mutaciones que disminuyen sustancialmente la afinidad del ligando por un receptor de interferón, está ligado con un anticuerpo anti-CD38 que dirige el ligando alfa de interferón mutado con células diana que presentan el antígeno correspondiente del anticuerpo, la actividad del ligando en células positivas para antígeno diana se mantiene, mientras que la actividad del ligando en células negativas para antígeno no diana se reduce sustancialmente. El resultado neto es una molécula de señalización de ligando que tiene una potencia mucho mayor en la activación de sus receptores en células diana positivas para antígeno en comparación con células no diana negativas para antígeno, que proporciona un medio para reducir la toxicidad que surge de actividad del ligando fuera de diana.

Una construcción polipeptídica puede comprender una variante de IFN-alfa unida a un anticuerpo anti-CD38 o una porción de unión a antígeno del mismo. Dicho polipéptido será capaz de ejercer con alta potencia la actividad antiproliferativa del IFN en células tumorales CD38 positivas ejerciendo al mismo tiempo una potencia mucho menor en células no tumorales, CD38 negativas, dentro del cuerpo.

La divulgación también proporciona composiciones que comprenden los anticuerpos y las construcciones de anticuerpo-interferón atenuado de la divulgación. Estas composiciones pueden comprender además al menos uno de cualquier adyuvante adecuado, tal como, pero sin limitación, uno o más diluyentes, aglutinantes, estabilizantes, tampones, sales, disolventes lipófilos, conservantes, adyuvantes u otro vehículo y/o excipiente adecuado. Se prefieren adyuvantes farmacéuticamente aceptables. Las composiciones pueden comprender cualquiera de los anticuerpos y construcciones de anticuerpo-interferón atenuado descritos y/o ilustrados en el presente documento y un vehículo aceptable tal como un vehículo farmacéuticamente aceptable. Los vehículos adecuados incluyen cualquier medio que no interfiera con la actividad biológica del anticuerpo y/o del interferón y preferentemente no sea tóxico para un hospedador al que se administra. El vehículo puede ser una solución acuosa, tal como agua, solución salina o alcohol, o un tampón fisiológicamente compatible, tal como solución de Hanks, solución de Ringer o tampón salino fisiológico. El vehículo puede contener agentes de formulación, tales como agentes de suspensión, estabilizantes y/o dispersantes.

Los excipientes y aditivos farmacéuticos útiles en la composición incluyen, pero sin limitación, proteínas, péptidos, aminoácidos, lípidos y carbohidratos (p. ej., azúcares, incluyendo monosacáridos, di-, tri-, tetra y oligosacáridos; azúcares derivatizados tales como alditoles, ácidos aldónicos, azúcares esterificados y otros azúcares conocidos; y polisacáridos o polímeros de azúcar), que pueden estar presentes solos o en combinación, comprendiendo solos o en combinación cualquier peso o volumen adecuado. Los excipientes proteicos ilustrativos incluyen albúmina sérica, tal como albúmina sérica humana (HSA), albúmina humana recombinante (rHA), gelatina, caseína y otras proteínas conocidas. Los aminoácidos representativos que también pueden actuar como tampones incluyen alanina, glicina,

arginina, betaína, histidina, ácido glutámico, ácido aspártico, cisteína, lisina, leucina, isoleucina, valina, metionina, fenilalanina y aspartamo. Un aminoácido preferido es histidina. Un segundo aminoácido preferido es arginina.

5 Los excipientes de carbohidratos adecuados para su uso en la composición incluyen, por ejemplo, monosacáridos, tales como fructosa, maltosa, galactosa, glucosa, D-manosa y sorbosa; disacáridos, tales como lactosa, sacarosa, trehalosa y celobiosa; polisacáridos, tales como rafinosa, melicitosa, maltodextrinas, dextranos y almidones; y alditoles, tales como manitol, xilitol, maltitol, lactitol, xilitol sorbitol (glucitol) y mioinositol. Son excipientes de carbohidratos preferidos para su uso en la divulgación manitol, trehalosa y rafinosa.

10 Las composiciones de anticuerpos también pueden incluir un tampón o un agente de ajuste del pH; normalmente, el tampón es una sal preparada a partir de un ácido o base orgánicos. Los tampones representativos incluyen sales de ácidos orgánicos, tales como sales de ácido cítrico, ácido ascórbico, ácido glucónico, ácido carbónico, ácido tartárico, ácido succínico, ácido acético o ácido ftálico; Tris, clorhidrato de trometamina o tampones de fosfato. Son tampones preferidos para su uso en las presentes composiciones son sales de ácidos orgánicos, tales como citrato.

15 Adicionalmente, las composiciones de la divulgación pueden incluir excipientes/aditivos poliméricos, tales como polivinilpirrolidonas, ficoles (un azúcar polimérico), dextratos (p. ej., ciclodextrinas, tales como 2-hidroxi-propil- β -ciclodextrina), polietilenglicoles, agentes antimicrobianos, antioxidantes, agentes antiestáticos, tensioactivos (p. ej., polisorbatos tales como "TWEEN[®] 20" y "TWEEN[®] 80"), lípidos (p. ej., fosfolípidos, ácidos grasos), esteroides (p. ej., colesterol) y agentes quelantes (p. ej., EDTA).

20 Las composiciones también se pueden formular en vehículos de liberación sostenida o preparaciones de depósito. Por ejemplo, las composiciones pueden formularse con materiales poliméricos o hidrófobos adecuados (por ejemplo, como una emulsión en un aceite aceptable) o resinas de intercambio iónico o como derivados poco solubles, por ejemplo, como una sal poco soluble. Los liposomas y las emulsiones son ejemplos bien conocidos de vehículos de suministro adecuados para su uso como vehículos para fármacos hidrófobos.

25 Las composiciones se pueden formular para su administración a un individuo en cualquier forma farmacéutica adecuada. Las composiciones pueden formularse para administraciones orales, bucales, nasales, transdérmicas, parenterales, inyectables, intravenosas, subcutáneas, intramusculares, rectales o vaginales. Las composiciones pueden formularse en un vehículo de liberación controlada adecuado, con un adyuvante o como una formulación de depósito.

30 Las preparaciones para administración parenteral incluyen soluciones estériles listas para su inyección, productos solubles secos estériles listos para combinar con un disolvente justo antes de su uso, incluyendo comprimidos hipodérmicos, suspensiones estériles listas para inyección, polvos insolubles secos estériles listos para combinar con un vehículo justo antes de su uso y emulsiones estériles.

35 Se puede usar una construcción de fusión de anti-CD38-interferón alfa-2b atenuado, por ejemplo, para inhibir, reducir, disminuir, bloquear o prevenir la proliferación de una célula que expresó CD38 en su superficie. Los procedimientos para inhibir o reducir la proliferación de una célula que expresa CD38 en su superficie comprenden en general poner en contacto una célula que expresa CD38 con una construcción de fusión de anti-CD38-interferón alfa-2b atenuado en una cantidad eficaz para inhibir o reducir la proliferación de la célula. El anticuerpo que se une específicamente con CD38 puede ser cualquier anticuerpo descrito o ilustrado en el presente documento. El interferón alfa 2b atenuado puede comprender IFN-alfa2b A145D o IFN-alfa2b A145G. La célula puede ser un linfocito, un linfocito autoinmunitario o una célula tumoral tal como una célula de leucemia, una célula de mieloma múltiple o una célula de linfoma. La construcción de fusión de anti-CD38-interferón alfa-2b atenuado puede estar comprendida en una composición, por ejemplo, con un vehículo farmacéuticamente aceptable y opcionalmente uno o más adyuvantes o excipientes, incluyendo cualquier vehículo, adyuvante o excipiente descrito o ilustrado en el presente documento. Los procedimientos se pueden llevar a cabo *in vitro*, *ex vivo*, *in vivo* o *in situ*.

45 Se puede usar también una construcción de fusión de anti-CD38-interferón alfa-2b atenuado, por ejemplo, para inducir, facilitar o potenciar la apoptosis de una célula que exprese CD38 en su superficie. Los procedimientos para inducen la apoptosis en una célula que expresa CD38 en su superficie comprenden en general poner en contacto una célula que expresa CD38 con una construcción de fusión de anti-CD38-interferón alfa-2b atenuado en una cantidad eficaz para inducir la apoptosis en la célula. El anticuerpo que se une específicamente con CD38 puede ser cualquier anticuerpo descrito o ilustrado en el presente documento. El interferón alfa 2b atenuado puede comprender IFN-alfa2b A145D o IFN-alfa2b A145G. La célula puede ser un linfocito, un linfocito autoinmunitario o una célula tumoral tal como una célula de leucemia, una célula de mieloma múltiple o una célula de linfoma. La construcción de fusión de anti-CD38-interferón alfa-2b atenuado puede estar comprendida en una composición, por ejemplo, con un vehículo farmacéuticamente aceptable y opcionalmente uno o más adyuvantes o excipientes, incluyendo cualquier vehículo, adyuvante o excipiente descrito o ilustrado en el presente documento. Los procedimientos se pueden llevar a cabo *in vitro*, *ex vivo*, *in vivo* o *in situ*.

55 También se puede usar una construcción de fusión de anti-CD38-interferón alfa-2b atenuado para tratar a un individuo que tiene un tumor que comprende y/o está mediado, al menos en parte, por células que expresan CD38 en su superficie. Los procedimientos para tratar un tumor que comprende células que expresan CD38 en su superficie

comprenden en general administrar a un sujeto que lo necesite una construcción de fusión de anti-CD38-interferón alfa-2b atenuado en una cantidad eficaz para tratar el tumor en el sujeto. El tratamiento eficaz puede incluir, por ejemplo, inhibir o reducir la proliferación de células CD38 positivas en el tumor y/o inducir apoptosis de células CD38 positivas en el tumor. El anticuerpo que se une específicamente con CD38 puede ser cualquier anticuerpo descrito o ilustrado en el presente documento. El interferón alfa 2b atenuado puede comprender IFN-alfa2b A145D o IFN-alfa2b A145G. La construcción de fusión de anti-CD38-interferón alfa-2b atenuado puede estar comprendida en una composición, por ejemplo, con un vehículo farmacéuticamente aceptable y opcionalmente uno o más adyuvantes o excipientes, incluyendo cualquier vehículo, adyuvante o excipiente descrito o ilustrado en el presente documento.

Las construcciones de fusión de anti-CD38-interferón alfa-2b atenuado o composición que comprende dichas construcciones se pueden administrar al tumor administrando las construcciones de composición a la sangre. Las construcciones de fusión de anti-CD38-interferón alfa-2b atenuado o composición que comprende dichas construcciones pueden administrarse de modo que la construcción se difunda a través del torrente sanguíneo a y/o en las células tumorales. La construcción puede ser internalizada por una célula tumoral.

Se proporciona uso de un anticuerpo anti-CD38 o una construcción de fusión de anticuerpo anti-CD38-interferón alfa-2b atenuado en el tratamiento de tumores. Se desvelan en el presente documento procedimientos para tratar tumores con un anticuerpo anti-CD38 o una construcción de fusión de anticuerpo anti-CD38-interferón alfa-2b atenuado. Se puede usar cualquier construcción de fusión de anticuerpo anti-CD38 o anticuerpo anti-CD38-interferón alfa-2b atenuado descrito o ilustrado en el presente documento. Los tumores que pueden tratarse incluyen, pero sin limitación, cánceres relacionados con SIDA, neuroma acústico, leucemia linfocítica aguda, leucemia mieloide aguda, carcinoma adenoquístico, cáncer corticosuprarrenal, metaplasia mieloide agnógena, alopecia, sarcoma alveolar de partes blandas, cáncer de ano, angiosarcoma, anemia aplásica, astrocitoma, ataxia-telangiectasia, carcinoma basocelular (piel), cáncer de vejiga, cánceres óseos, cáncer de intestino, glioma del tronco encefálico, tumores cerebrales y del SNC, cáncer de mama, tumores del SNC, tumores carcinoides, cáncer de cuello uterino, tumores cerebrales infantiles, cáncer infantil, leucemia infantil, sarcoma de tejidos blandos infantil, condrosarcoma, coriocarcinoma, leucemia linfocítica crónica, leucemia mieloide crónica, cánceres colorrectales, linfoma cutáneo de linfocitos T, dermatofibrosarcoma protuberante, tumor desmoplásico de células pequeñas y redondas, carcinoma ductal, cánceres endocrinos, cáncer de endometrio, ependimoma, cáncer de esófago, sarcoma de Ewing, cáncer del conducto biliar extrahepático, cáncer de ojo, ojo: melanoma, retinoblastoma, cáncer de las trompas de Falopio, anemia de Fanconi, fibrosarcoma, cáncer de vesícula biliar, cáncer gástrico, cánceres gastrointestinales, tumor carcinóide gastrointestinal, cánceres genitourinarios, tumores de células germinales, enfermedad gestacional-trofoblástica, glioma, cánceres ginecológicos, neoplasias hematológicas, tricolecucemia, cáncer de cabeza y cuello, cáncer hepatocelular, cáncer de mama hereditario, histiocitosis, enfermedad de Hodgkin, virus del papiloma humano, mola hidatiforme, hipercalemia, cáncer de la hipofaringe, melanoma intraocular, cáncer de células de los islotes, sarcoma de Kaposi, cáncer de riñón, histiocitosis de células de Langerhans, cáncer de laringe, leiomiomas, leucemia, síndrome de Li-Fraumeni, cáncer de labio, liposarcoma, cáncer de hígado, cáncer de pulmón, linfedema, linfoma, linfoma de Hodgkin, linfoma no Hodgkin, cáncer de mama masculino, tumor maligno rabdoide de riñón, meduloblastoma, melanoma, cáncer de células de Merkel, mesotelioma, cáncer metastásico, cáncer de boca, neoplasia endocrina múltiple, micosis fungoide, síndromes mielodisplásicos, mieloma múltiple, trastornos mieloproliferativos, cáncer nasal, cáncer nasofaríngeo, neuroblastoma, neuroblastoma, neurofibromatosis, síndrome de rotura de Nimega, cáncer de piel distinto de melanoma, cáncer de pulmón no microcítico (CPNM), cánceres oculares, cáncer de esófago, cáncer de la cavidad oral, cáncer de orofaringe, osteosarcoma, cáncer de ovario con ostomía, cáncer de páncreas, cáncer paranasal, cáncer paratiroideo, cáncer de glándula parótida, cáncer de pene, tumores neuroectodérmicos periféricos, cáncer de hipófisis, policitemia vera, cáncer de próstata, cánceres raros y trastornos asociados, carcinoma de células renales, retinoblastoma, rhabdomyosarcoma, síndrome de Rothmund-Thomson, cáncer de las glándulas salivales, sarcoma, schwannoma, síndrome de Sezary, cáncer de piel, cáncer de pulmón microcítico (CPM), cáncer de intestino delgado, sarcoma de tejidos blandos, tumores de la médula espinal, carcinoma de células escamosas (piel), cáncer de estómago, sarcoma sinovial, cáncer de testículo, cáncer de timo, cáncer de tiroides, cáncer de células de transición (vejiga), cáncer de células de transición (pelvis renal/uréter), cáncer trofoblástico, cáncer de uretra, cáncer del sistema urinario, uroplaquinas, sarcoma uterino, cáncer de útero, cáncer de vagina, cáncer de vulva, macroglobulinemia de Waldenstrom y tumor de Wilms. En una realización, el tumor se selecciona de un grupo de mieloma múltiple o linfoma no Hodgkin.

Los procedimientos se pueden usar para el tratamiento de mieloma múltiple, leucemia o linfoma en un individuo que lo necesite. Dichos procedimientos pueden comprender además tratar al sujeto con un retinoide, tal como ácido holo transretinoico. Cuando el antígeno asociado a la superficie celular es CD38, el tumor o el cáncer se puede seleccionar de mieloma múltiple, linfoma no Hodgkin, leucemia mielógena crónica, leucemia linfocítica crónica o leucemia mielógena aguda.

Una construcción de fusión de anti-CD38-interferón alfa-2b atenuado se puede combinar con otros fármacos y/o usar además de otros regímenes o modalidades de tratamiento del cáncer, tales como radioterapia o cirugía. Cuando se usan construcciones de fusión de anti-CD38-interferón alfa-2b atenuado en combinación con agentes terapéuticos conocidos, la combinación se puede administrar en secuencia (de manera continua o dividida por periodos sin tratamiento) o simultáneamente o como una mezcla. En el caso del cáncer, existen numerosos agentes antineoplásicos conocidos que pueden usarse en este contexto. El tratamiento en combinación también se contempla para abarcar el tratamiento con la construcción de fusión de anti-CD38-interferón alfa-2b atenuado seguido de un

tratamiento conocido o tratamiento con un agente conocido seguido de tratamiento con construcción de fusión de anti-CD38-interferón alfa-2b atenuado, por ejemplo, como terapia de mantenimiento. Por ejemplo, en el tratamiento del cáncer se contempla que la construcción de fusión de anti-CD38-interferón alfa-2b atenuado se pueda administrar en combinación con un agente alquilante (tal como mecloretamina, ciclofosfamida, clorambucilo, ifosfamidocisplatino o agentes de tipo alquilante que contienen platino tales como cisplatino, carboplatino y oxaliplatino), un antimetabolito (como un análogo de purina o pirimidina o un agente antifolato, tal como azatioprina y mercaptopurina), una antraciclina (tal como daunorrubicina, doxorubicina, epirubicina, idarubicina, valrubicina, mitoxantrona o análogo de antraciclina), un alcaloide vegetal (tal como un alcaloide de la vinca o un taxano, tal como vincristina, vinblastina, vinorelbina, vindesina, paclitaxel o dosetaxel), un inhibidor de topoisomerasa (tal como un inhibidor de topoisomerasa de tipo I o tipo II), una podofilotoxina (tal como etopósido o tenipósido) o un inhibidor de tirosina cinasa (tal como mesilato de imatinib, nilotinib o dasatinib).

En el caso del tratamiento del mieloma múltiple, se puede administrar una construcción de fusión de anti-CD38-interferón alfa-2b atenuado en combinación con otras terapias adecuadas, tales como tratamiento del individuo con la administración de esteroides tales como dexametasona, inhibidores de proteasoma (tales como bortezomib o carfilzomib), fármacos inmunomoduladores (tales como talidomida, lenalidomida o pomalidomida) o quimioterapia de inducción seguida de trasplante de células madre hematopoyéticas autólogas, con o sin otros agentes quimioterapéuticos tales como clorhidrato de melfalán o los agentes quimioterapéuticos enumerados anteriormente.

En el caso del tratamiento del linfoma de Hodgkin, se puede administrar una construcción de fusión de anti-CD38-interferón alfa-2b atenuado en combinación con enfoques terapéuticos actuales, tales como ABVD (adriamicina (doxorubicina), bleomicina, vinblastina y dacarbazina) o Stanford V (doxorubicina, bleomicina, vinblastina, vincristina, mecloretamina, etopósido, prednisona) o BEACOPP (doxorubicina, bleomicina, vincristina, ciclofosfamida, procarbazona, etopósido, prednisona).

En el caso del linfoma no Hodgkin u otros linfomas, se puede administrar una construcción de fusión de anti-CD38-interferón alfa-2b atenuado en combinación con enfoques terapéuticos actuales. Los ejemplos de fármacos aprobados para linfoma no Hodgkin incluyen abitrexato (metotrexato), adriamicina PFS (clorhidrato de doxorubicina), adriamicina RDF (clorhidrato de doxorubicina), amboclorina (clorambucilo), amboclorina (clorambucilo), Arranon (nelarabina), clorhidrato de bendamustina, Bexxar (tositumomab y tositumomab de yodo I 131), Blenoxane (bleomicina), bleomicina, bortezomib, clorambucilo, Clafen (ciclofosfamida), ciclofosfamida, citoxano (ciclofosfamida), denileucina-diftitox, DepoCyt (citarabina liposómica), clorhidrato de doxorubicina, DTIC-Dome (dacarbazina), Folex (metotrexato), Folex PFS (metotrexato), Folutyn (pralatrexato), Ibritumomab tiuxetan, Istodax (romidepsina), Leukeran (clorambucilo), Linfolizin (clorambucilo), citarabina liposómica, Matulane (clorhidrato de procarbazona), metotrexato, metotrexato LPF (metotrexato), Mexate (metotrexato), Mexate-AQ (metotrexato), Mozobil (Plerixafor), nelarabina, Neosar (ciclofosfamida), Ontak (denileucina diftitox), Plerixafor, pralatrexato, Rituxan (rituximab), rituximab, romidepsina, tositumomab y tositumomab de yodo I 131, Treanda (clorhidrato de bendamustina), Velban (sulfato de vinblastina), Velcade (bortezomib) y Velsar (sulfato de vinblastina), sulfato de vinblastina, Vincasar PFS (sulfato de vincristina), sulfato de vincristina, vorinostat, Zevalin (tiuxetano de ibritumomab), Zolinza (vorinostat). Los ejemplos de combinaciones farmacológicas usadas en el tratamiento de linfoma no Hodgkin incluyen CHOP (C = ciclofosfamida, H = clorhidrato de doxorubicina (hidroxidaunomicina), O = sulfato de vincristina (oncovina), P = prednisona); COPP (C = ciclofosfamida, O = sulfato de vincristina (oncovina), P = clorhidrato de procarbazona, P = prednisona); CVP (C = ciclofosfamida, V = sulfato de vincristina, P = prednisona); EPOCH (E = Etopósido, P = prednisona, O = sulfato de vincristina (oncovina), C = ciclofosfamida, H = clorhidrato de doxorubicina (hidroxidaunomicina)); ICE (I = ifosfamida, C = carboplatino, E = etopósido) y R-CHOP (R = rituximab, C = ciclofosfamida, H = clorhidrato de doxorubicina (hidroxidaunomicina), O = sulfato de vincristina (oncovina), P = prednisona).

Un anticuerpo anti-CD38 o una construcción de fusión de anti-CD38-interferón alfa-2b atenuado se puede usar para detectar células positivas para CD38, incluyendo células tumorales positivas para CD38. Se pueden usar en procedimientos para detectar una célula tumoral positiva para CD38 en una muestra tisular aislada de un sujeto, pudiendo dichos procedimientos comprender en general poner en contacto un anticuerpo anti-CD38 o una construcción de fusión de anti-CD38-interferón alfa-2b atenuado, con una muestra tisular aislada de un sujeto y detectar un complejo del anticuerpo o la construcción y una célula positiva para CD38 en la muestra tisular. La muestra tisular es preferentemente sangre. La célula puede ser una célula de linfoma de linfocitos B positivos para CD38, célula de mieloma múltiple, célula de linfoma no Hodgkin, célula de leucemia mielógena crónica, célula de leucemia linfocítica crónica o célula de leucemia mielógena aguda. El procedimiento puede comprender además aislar la muestra tisular del sujeto.

La divulgación también presenta equipos que comprenden cualquiera de los anticuerpos y construcciones de fusión de anti-CD38-interferón alfa-2b atenuado descritas e ilustradas en el presente documento. Los equipos pueden usarse para suministrar anticuerpos y otros agentes para su uso en procedimientos de diagnóstico, investigación básica o terapéutica, entre otros.

Un equipo puede comprender una construcción de fusión de anti-CD38-interferón alfa-2b atenuado, la construcción comprendida opcionalmente en una composición que comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable e instrucciones para usar el equipo en uno o más de un procedimiento para inhibir o reducir la proliferación de una célula tumoral que expresa CD38 en su superficie, un procedimiento para inducir apoptosis en una célula tumoral que expresa

- 5 CD38 en su superficie y/o un procedimiento para tratar un tumor que comprende y/o está mediado por células que expresan CD38 en su superficie. Dichos procedimientos pueden ser cualquier procedimiento descrito o ilustrado en el presente documento. Los equipos pueden comprender un vehículo farmacéuticamente aceptable. Los equipos pueden comprender uno o más adyuvantes farmacéuticamente aceptables y/o uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables. En los equipos, el anticuerpo anti-CD38 puede ser cualquier anticuerpo descrito o ilustrado en el presente documento y el interferón alfa-2b atenuado puede comprender cualquier interferón alfa-2b atenuado descrito o ilustrado en el presente documento. Las construcciones pueden estar comprendidas en soluciones estériles listas para inyección o administración intravenosa o pueden comprender una forma estéril, liofilizada, lista para combinar con un vehículo justo antes de su uso.
- 10 Un equipo puede comprender un anticuerpo anti-CD38 e instrucciones para usar el equipo en un procedimiento para detectar células positivas para CD38 en una muestra, incluyendo una muestra tisular aislada de un sujeto. El anticuerpo anti-CD38 puede ser cualquier anticuerpo descrito o ilustrado en el presente documento. El anticuerpo puede fusionarse opcionalmente con una proteína de interferón alfa-2b atenuado.
- 15 Los siguientes ejemplos se proporcionan para describir la divulgación con mayor detalle. Se pretende que ilustren, no limiten, la divulgación.

Ejemplo de referencia 1

Optimización de IgG4 X355/02-HC-L0-IFN-alfa (A145D)

20 Otras proteínas de fusión de anti-CD38-IFN atenuado se describen en la solicitud PCT n.º PCT/AU2012/001323. Estas incluyen la construcción de anticuerpo designada en la solicitud PCT como IgG4 X355/02-HC-L0-IFN-alfa (A145D). En la presente memoria descriptiva, IgG4 X355/02-HC-L0-IFN-alfa (A145D) se ha renombrado A02.1. La secuencia de cadena pesada del anticuerpo comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 11 y la secuencia de cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 12. La cadena ligera variable de A02.1 (SEC ID NO: 14) se coexpresó con su cadena pesada variable A02.1 (SEC ID NO: 13) formateada en una región constante de IgG4 humana que contiene la sustitución S228P (numeración EU) (SEC ID NO: 3). Este anticuerpo se denominó en el presente documento X02.1. A02.1 incluye una fusión con IFN-alfa2b mientras que X02.1 no, a pesar de que 25 ambos anticuerpos comparten secuencias idénticas de cadena pesada y cadena ligera.

30 Se llevó a cabo una búsqueda BLAST (Altschul SF (1997) Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402) contra una base de datos de genes de inmunoglobulina de línea germinal humana usando la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada variable de X02.1. El gen de cadena pesada variable de línea germinal humana más cercano fue IGHV4-61*01 (SEC ID NO: 16). En la figura 2 se muestra una alineación de X02.1 VH e IGHV4-61*01. La región pesada variable X02.1 difiere en ocho aminoácidos de su secuencia de aminoácidos de la línea germinal más cercana. Para reducir la inmunogenicidad de la región variable de cadena pesada X02.1, podrían producirse sustituciones de restos de aminoácidos de línea germinal en restos donde difiere de la secuencia de línea germinal y las variantes de anticuerpos resultantes ensayadas para determinar la actividad de unión anti-CD38.

35 En la Figura 2 se detallan varias variantes de cadena pesada de la secuencia original de X02.1. Estas regiones variables de cadena pesada se formatearon en la región constante de IgG4 S228P y se coexpresaron con la cadena ligera de A02.1. Las tablas 1a y 1b detallan las secuencias de las variantes ensayadas junto con su capacidad para unirse a CD38 humano según se evaluó usando citometría de flujo y resonancia de plasmón superficial (RPS). En resumen, las cadenas de anticuerpos se coexpresaron transitoriamente en células CHO y se purificaron mediante 40 cromatografía de proteína A como se describe en el ejemplo 5. Se usaron ensayos de unión de flujo como se describe en el ejemplo 5 para evaluar las variantes. La CE₅₀ de la curva de respuesta a dosis obtenida para cada anticuerpo también se proporciona en las tablas 1a y 1b.

Tabla 1a

Denominación del anticuerpo	Sustitución de aminoácidos de cadena pesada variable (en relación con X02.1)	Variable pesada SEC ID NO:	Variable ligera SEC ID NO:	Unión a CD38 mediante RPS	Ensayo de unión de flujo de ARP-1 (CE ₅₀ en µg/ml)
X02.8	L74S	17	14	2,30x 10 ⁻⁸	18,3
X02.9	H40P	18	14	2,63x 10 ⁻⁸	N/T
X02.10	T(82A)S	19	14	2,07x 10 ⁻⁸	N/T
X02.11	L74S, 178F R81K, T(82A)S	20	14	2,39x 10 ⁻⁸	18,1

X02.108	178F	32	14	2,63x 10 ⁻⁸	N/T
X02.110	R81K	33	14	2,07x 10 ⁻⁸	N/T
N/T - La proteína no pudo purificarse y no se ensayó.					

Tabla 1b

Denominación del anticuerpo	Sustitución de aminoácidos de cadena pesada variable (en relación con X02.1)	Variable pesada SEC ID NO:	Variable ligera SEC ID NO: [Verificar]	Unión a CD38 mediante RPS	Ensayo de unión de flujo de ARP-1 (CE ₅₀ en µg/ml)
X02.69	Q2V	22	14	3,68x 10 ⁻¹¹	16,8
X02.71	I29V	24	14	1,29x 10 ⁻¹⁰	3,5
X02.78	S32G	31	14	2,04x 10 ⁻¹¹	N/T
N/T - Proteína no purificada ni probada.					

La unión por RPS de las variantes detalladas en la Tabla 1a se evaluó por separado de las de la tabla 1b. La K_D (M) del anticuerpo parental X02.1 varió de 2,7 x 10⁻⁸ a 3,78 x 10⁻¹⁰ en los experimentos de unión de RPS. Los experimentos de unión de citometría de flujo mostraron que los anticuerpos X02.8, X02.11, X02.69 y X02.71 se unían intensamente con la línea celular positiva para CD38 ARP-1.

Los anticuerpos con las sustituciones de aminoácidos anteriores se exploraron posteriormente en el contexto de una proteína de fusión por medio de la conjugación con IFN-alfa2b atenuado (denominado A02 cuando se une con IFN, representando el número después del punto la misma variante que tiene la designación X02). Estas regiones variables de cadena pesada se formatearon en una región constante de IgG4 que comprende la sustitución S228P fusionada con IFN-alfa2b atenuado A145D y coexpresada en células CHO o HEK con la cadena ligera A02.1 como se describe en el ejemplo 5. Las proteínas que se purificaron con éxito a partir del sobrenadante celular se ensayaron después en un ensayo de unión de flujo con la línea celular ARP-1. El valor de CE₅₀ de la curva de respuesta a dosis para cada anticuerpo se proporciona en la tabla 2. Todas las construcciones de fusión de anticuerpo-IFN atenuado se probaron unidas con la línea celular positiva para CD38 ARP-1. Se observó que la variante de cadena pesada X02.9 (no fusionada a IFN) no pudo purificarse fácilmente mientras que una variante idéntica fusionada con IFN (A02.9) se purificó. En algunos casos, las proteínas de fusión de IFN atenuado pudieron expresarse y purificarse, cuando el anticuerpo monoclonal equivalente parecía más difícil de expresar y/o purificar.

Tabla 2

Proteína de fusión de anti-CD38-IFN atenuado	Sustitución de aminoácidos de cadena pesada variable (en relación con A02.1)	Variable pesada SEC ID NO:	Variable ligera SEC ID NO:	Captura de proteína A por RPS (UR)*	Unión a CD38 mediante RPS (UR) a 350 s*	Ensayo de unión de flujo de ARP-1 (CE ₅₀ en µg/ml)
A02.8	L74S	17	14	4697	833	1,9
A02.9	H40P	18	14	4718	841	1,0
A02.10	T(82A)S	19	14	4647	804	1,5
A02.11	L74S, I78F, R81K, T(82A)S	20	14	4483	827	3,5
*La cantidad de proteína de fusión de anti-CD38-IFN atenuado en el sobrenadante de cultivo celular se indica por medio de la captura de proteína A por RPS. La unión de CD38 por RPS se refiere a la cantidad de CD38 que permanece unida a la superficie después de 350 segundos de la fase de disociación.						

Se llevaron a cabo búsquedas BLAST mediante el uso de la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera variable A02.1 frente a la base de datos de genes de inmunoglobulina de línea germinal humana. El gen de cadena ligera variable de línea germinal humana más cercano fue IGLV5-37*01. En la figura 3 se proporciona un alineamiento de

secuencias de aminoácidos de A02.1VL e IGLV5-37*01. Este alineamiento ilustra una diferencia de 12 aminoácidos entre estas secuencias.

5 Se llevaron a cabo varias sustituciones de aminoácidos en la cadena ligera variable de X02.1. Estas sustituciones se muestran en la figura 3. Se realizó coexpresión de estas regiones variables de cadena ligera con la cadena pesada variable de X02.1 formateada en una región constante de IgG4 que contenía la sustitución S228P en células CHO como se describe en el ejemplo 5.

Se probaron posteriormente anticuerpos purificados a partir de sobrenadantes de células CHO en ensayos de unión en base a citometría de flujo con la línea celular positiva para CD38 ARP-1. La tabla 3 detalla valores de CE₅₀ de la curva de respuesta a dosis obtenida para cada anticuerpo.

10

Tabla 3

Denominación del anticuerpo	Sustitución de aminoácidos de cadena ligera variable (en relación con A02.1)	Variable pesada SEC ID NO:	Variable ligera SEC ID NO:	Unión a CD38 mediante RPS (KD)	Ensayo de unión de flujo de ARP-1 (CE ₅₀ en µg/ml)	HPLC de proteína A mg/l
X02.95	A2P	13	53	4,40x 10 ⁻¹²	N/T	11,1
X02.96	A8P	13	54	2,50x 10 ⁻¹⁰	30,0	19,9
X02.97	L11S	13	55	7,51x 10 ⁻¹²	Unión baja	15,0
X02.98	R29S	13	56	5,84x 10 ⁻¹²	N/T	8,7
X02.99	Y30S	13	57	3,21x 10 ⁻¹²	4,4	11,5
X02.100	H(54A)D	13	58	1,60x 10 ⁻⁷	Unión baja	18,9
X02.101	V(66B)A	13	59	2,89x 10 ⁻¹¹	13,7	21,0
X02.102	T68A	13	60	1,20x 10 ⁻¹⁰	20,4	18,0
X02.103	S70T	13	61	1,28x 10 ⁻⁹	9,4	27,9
X02.104	T90I	13	62	1,0x 10 ⁻⁸	9,7	23,1
X02.105	S92P	13	63	3,31x 10 ⁻⁸	12,7*	19,3
X02.106	G95A	13	64	4,47 x 10 ⁻⁸	N/T	11,6

N/T - Proteína no purificada o no probada.
 Unión baja - Unión mínima observada, insuficiente para un valor de CE₅₀.
 *El anticuerpo se probó en un ensayo de unión de flujo frente a la línea celular H929. El valor señalado es la CE₅₀ en µg/ml.

Loa anticuerpos X02.96, X02.99, X02.101, X02.102, X02.103 y X02.104 se unieron intensamente con la línea celular ARP-1 positiva para CD38. X02.105 pudo unirse intensamente con la línea celular H929, positiva para CD38.

15 El análisis de la secuencia de aminoácidos de la secuencia de cadena pesada variable de X02.1 y A02.1 identificó aminoácidos que podrían potencialmente experimentar oxidación o isomerización. Estos incluyen un sitio de isomerización potencial en D101 y un sitio de oxidación potencial en M(100C). Para eliminar los posibles sitios de isomerización y oxidación, se realizaron sustituciones de aminoácidos de la siguiente manera: D(101)E (SEC ID NO: 30), M(100C)L (SEC ID NO: 29) y la combinación tanto de D(101)E como de M(100C)L (SEC ID NO: 27) (figura 2). Se prepararon anticuerpos con combinaciones de estas sustituciones de aminoácidos en la cadena pesada variable como se muestra en la tabla 4. Se formatearon regiones variables de cadena pesada de anticuerpos con una región constante de IgG4 que contenía la sustitución S228P y se coexpresaron con la cadena ligera A02.1 en células CHO.
 20 Los anticuerpos se purificaron después mediante cromatografía de proteína A y se exploraron para determinar la unión con células ARP-1 mediante citometría de flujo. Los datos de unión obtenidos se muestran en la tabla 4.

Tabla 4

Denominación	Sustitución de aminoácidos	Variable pesada	Variable ligera	Unión a CD38	Ensayo de unión de flujo de ARP-1	HPLC de proteína
del anticuerpo	de cadena pesada variable (en relación con X02.1)	SEC ID NO:	SEC ID NO:	mediante RPS (KD)	(CE ₅₀ en µg/ml)	A mg/l
X02.76	M(100C)L	29	14	1,58 x 10 ⁻¹³	4,1	24,8
X02.77	D101E	30	14	9,11 x 10 ⁻¹²	3,7	15,6
X02.74	M(100C)L, D101E	27	14	6,85 x 10 ⁻¹¹	N/T	21,8
N/T - La proteína no se purificó o no se probó.						

Los anticuerpos X02.76 y X02.77 mantuvieron su fuerte unión con la línea celular ARP-1, lo que indica que las sustituciones de aminoácidos para eliminar los sitios potenciales de oxidación e isomerización en la cadena pesada de X02.1 y A02.1 tuvieron poco impacto en su actividad a CD38. La combinación de estas sustituciones para formar el anticuerpo X02.74 dio como resultado un anticuerpo que no se purificó usando el protocolo del ejemplo 5.

- 5 El análisis de aminoácidos de la secuencia de cadena ligera variable de X02.1 y A02.1 identificó aminoácidos que podrían potencialmente experimentar oxidación o desamidación. Estos incluyeron un sitio de desamidación potencial en N69 y un sitio de oxidación potencial en M89. Adicionalmente, se predijo que existía un posible sitio de glucosilación ligado a N dentro de CDR3 de la cadena ligera en la posición N94. La presencia de glucanos ligados a N puede provocar heterogeneidad en proteínas terapéuticas, lo que complica el desarrollo. Para eliminar estos posibles problemas, se sintetizaron las siguientes variantes puntuales: N69A (SEC ID NO: 39), M89L (SEC ID NO: 52) y M89I (SEC ID NO: 51), N94T (SEC ID NO: 48), N94Q (SEC ID NO: 38), G95P (SEC ID NO: 50) y S96A (SEC ID NO: 45) (véase figura 3). Se generaron anticuerpos mediante coexpresión de las cadenas pesadas y ligeras en células CHO como se detalla en la tabla 5. Los anticuerpos se purificaron mediante cromatografía de proteína A y se exploraron para determinar la unión con células ARP-1 mediante citometría de flujo. Los datos de unión obtenidos se presentan en la tabla 5.

Tabla 5

Denominación del anticuerpo	Sustitución de aminoácidos de cadena ligera variable (en relación con A02.1)	Variable pesada SEC ID NO:	Variable ligera SEC ID NO:	Unión a CD38 mediante RPS	Ensayo de unión de flujo de ARP-1 (CE ₅₀ en µg/ml)	HPLC de proteína A mg/l
X02.81	N69A	13	39	2,67x 10 ⁻¹⁰	N/T	12,6
X02.93	M89I	13	51	2,56x 10 ⁻¹¹	18,7	20,0
X02.94	M89L	13	52	3,48x 10 ⁻¹²	8,7	18,9
X02.90	N94T	13	48	5,52x 10 ⁻¹⁰	26,2	23,0
X02.80	N94Q	13	38	1,44x 10 ⁻⁹	13,2	30,3
X02.92	G95P	13	50	Unión baja	Unión baja	18,1
X02.87	S96A	13	45	1,99x 10 ⁻⁹	37,5	18,9
N/T - La proteína no se purificó ni se probó. Unión baja - Unión mínima observada, insuficiente para un valor de CE ₅₀ o KD.						

- 20 X02.94 se unió a la línea celular positiva para CD38 ARP-1, lo que indica que la sustitución M89L tuvo poco impacto en la actividad de unión a CD38. La sustitución N94Q en el anticuerpo X02.80 eliminó el posible motivo de glucosilación ligada a N con una influencia mínima en la actividad de unión a CD38 como se mide mediante citometría de flujo (tabla 5). Otras sustituciones que eliminan este motivo de glucosilación dieron como resultado anticuerpos que no pudieron purificarse fácilmente o anticuerpos que presentaron unión atenuada con la línea celular positiva para CD38 ARP-1. El posible sitio de desamidación en la posición 69 se eliminó por medio de la sustitución a alanina, aunque este anticuerpo (X02.81) no se purificó fácilmente.

5 Otros anticuerpos probados que comprendían variantes de cadena pesada variable de X02.1 se enumeran en la tabla 6. Estas regiones variables de cadena pesada se formatearon en una región constante de IgG4 que contenía una sustitución S228P. Estas cadenas pesadas se coexpresaron con la cadena ligera de A02.1 en células CHO. Los anticuerpos se expresaron y los anticuerpos resultantes se probaron en ensayos basados en citometría de flujo para determinar la unión con la célula positiva para CD38 ARP-1. Todas las sustituciones de cadena pesada variables con la excepción de T23K (SEC ID NO: 21; X02.68) tuvieron una influencia mínima en la unión a la línea celular positiva para CD38 ARP-1 en ensayos basados en citometría de flujo.

Tabla 6

Denominación del anticuerpo	Sustitución de aminoácidos de cadena pesada variable (en relación con X02.1)	Variable pesada SEC ID NO:	Variable ligera SEC ID NO:	Unión a CD38 mediante RPS	Ensayo de unión de flujo de ARP-1 (CE ₅₀ en µg/ml)	HPLC de proteína A mg/l
X02.73	S19K	26	14	3,85x 10 ⁻¹⁰	4,3	20,6
X02.68	T23K	21	14	1,06x 10 ⁻¹¹	N/T	17,0
X02.70	V71R	23	14	3,54x 10 ⁻⁹	7,2	32,8
X02.75	T73K	28	14	6,38x 10 ⁻¹⁰	4,9	17,8
X02.72	T83R	25	14	1,63x 10 ⁻⁹	3,6	30,6
N/T - Proteína no purificada ni probada.						

10 También se produjeron anticuerpos que comprendían otras sustituciones de región variable de cadena ligera en la secuencia de X02.1. Estas cadenas ligeras variantes se combinaron con la cadena pesada de X02.1 formateada en una región constante de IgG4 que contenía la sustitución S228P y se expresaron en células CHO como se describe en el ejemplo 5. En la tabla 7 se proporciona un resumen de las cadenas pesadas y ligeras usadas para producir estas variantes de anticuerpos. Los anticuerpos X02.83, X02.85, X02.91, X02.82 se unían intensamente con la línea celular positiva para CD38 ARP-1.

15

Tabla 7

Denominación del anticuerpo	Sustitución de aminoácidos de cadena ligera variable (en relación con A02.1)	Variable pesada SEC ID NO:	Variable ligera SEC ID NO:	Unión con CD38 a través de RPS	Ensayo de unión de flujo de ARP-1 (CE ₅₀ en µg/ml)	HPLC de proteína A mg/l
X02.83	E17A	13	41	2,69x 10 ⁻⁹	8,2	32,8
X02.86	D(27A)G	13	44	4,28x 10 ⁻⁹	120,4	30,0
X02.85	ΔD(L66A)*** ΔV(L66B)***	13	43	2,70x 10 ⁻¹⁰	6,3	17,6
X02.107	E83I, D85T	13	65	2,47 x10 ^{-8##}	N/T	10,0*
X02.91	P26R	13	49	7,07x 10 ⁻¹⁰	17,6	21,1
X02.88	N32R	13	46	Unión baja	Unión baja	33,5
X02.82	Y49R	13	40	N/T	3,8	27,9
X02.89	Y51R	13	47	Unión	Sin unión	25,7

ES 2 938 708 T3

				baja		
X02.84	Y49R, Y51R	13	42	Unión baja	Sin unión	35,0
<p>N/T - La proteína no se purificó ni se probó. Unión baja - Unión mínima observada, insuficiente para un valor de CE₅₀. *** Δ indica que este aminoácido presente en la cadena ligera A02.1 se eliminó de esta secuencia. *valor de proteína estimado en función del nivel de captura de proteína A por RPS. ##La unión RPS para X02.107 se evaluó en un experimento separado en el que la KD del anticuerpo parental X02.1 fue de 2,7 x 10⁻⁸. La KD del anticuerpo parental X02.1 es 3,78 x10⁻¹⁰ en el experimento de unión de RPS para todos los demás anticuerpos probados.</p>						

5 Se produjeron sustituciones que provocan poco impacto en la actividad de unión a CD38 y la purificación de anticuerpos variantes X02 posteriormente como anticuerpos armados por medio de la fusión con IFN-alfa2b atenuado A145D. Las sustituciones de cadena ligera de X02.1 se combinaron y las variantes resultantes se coexpresaron con variantes puntuales y combinatorias de la cadena pesada de X02.1 en células HEK293E, como se enumera en la tabla 8. Estos anticuerpos se centraron principalmente en eliminar el posible sitio de desamidación de cadena ligera de X02.1, un sitio de oxidación de CDR3 de la cadena pesada de X02.1 y un posible péptido de unión del MHC de clase II fuerte de la región marco conservada 3 de la cadena pesada de X02.1 predicha a través de análisis por ordenador (Epibase, Lonza, Reino Unido), figura 4.

Tabla 8

Proteína de fusión de anti-CD38-IFN atenuado	Sustitución de aminoácidos de cadena pesada variable (en relación con A02.1)	Variable pesada SEC ID NO:	Sustitución de aminoácidos de cadena ligera variable (en relación con A02.1)	Variable ligera SEC ID NO:
A02.2	Ninguno	13	E83I, D85T	65
A02.3	L74S	17	E83I, D85T	65
A02.4	H40P	18	E83I, D85T	65
A02.5	T(82A)S	19	E83I, D85T	65
A02.6	L74S, I78F, R81K, T(82A)S	20	E83I, D85T	65
A02.12	L74S, I78F, R81K, T(82A)S, M(100C)L	34	E83I, D85T	65
A02.13	H40P, L74S, I78F, R81K, T(82A)S	35	E83I, D85T	65
A02.37	L74S, I78F, R81K, T(82A)S, M(100C)L	34	E83I, D85T, M89L	66
A02.46	L74S, I78F, R81K, T(82A)S, M(100C)L	34	E83I, D85T, N69Q	67
A02.47	L74S, I78F, R81K, T(82A)S, M(100C)L	34	E83I, D85T, N69T	68
A02.48	L74S, I78F, R81K, T(82A)S, M(100C)L	34	E83I, D85T, N69G	69
A02.49	L74S, I78F, R81K, T(82A)S, M(100C)L	34	E83I, D85T, N69H	70
A02.50	L74S, I78F, R81K, T(82A)S, M(100C)L	34	E83I, D85T, N69K	71
A02.51	L74S, I78F, R81K, T(82A)S, M(100C)L	34	E83I, D85T, N69P	72

Los anticuerpos enumerados en la Tabla 8 se analizaron para determinar la expresión de proteínas y la unión con CD38 por medio de resonancia de plasmón superficial (RPS). También se realizaron ensayos de potencia usando sobrenadante de cultivo celular tomado de células transfectadas para evaluar la actividad relativa de cada una de estas proteínas de fusión de anti-CD38-IFN atenuado como se perfila en el ejemplo 5. Los datos obtenidos se proporcionan en la tabla 9.

5

Tabla 9

Proteína de fusión de anti-CD38-IFN atenuado	HPLC de proteína A (mg/l)	Unión a CD38 mediante RPS (UR) a 350 s*	Ensayo de anexina V (factor de cambio en relación con células no tratadas)	Ensayo de caspasa (factor de cambio en relación con células no tratadas)	Ensayo de proliferación celular CI ₅₀ (pM)
A02.2	30,2	756	N/T	N/T	N/T
A02.3	21,6	835	N/T	N/T	N/T
A02.4	27,3	809	N/T	N/T	N/T
A02.5	22,0	788	N/T	N/T	N/T
A02.6	33,7	895	N/T	N/T	N/T
A02.12	25,3	N/D	2,7	7,0	236
A02.46	3,1	914	2,2	5,8	1190
A02.47	26,5	1455	3,10	4,44	N/T
A02.48	3,4	921	2,0	5,6	562
A02.49	3,0	946	2,1	5,5	875
A02.50	3,1	809	1,9	6,1	1681
A02.51	1,8	368	2,0	5,8	3741

La unión de CD38 por RPS se refiere a la cantidad de CD38 que permanece unida a la superficie después de 350 segundos de la fase de disociación. El ensayo de anexina V se refiere a células teñidas positivamente por anexina V-FITC después de 24 h de tratamiento con construcciones de anticuerpos a 20 nM. El ensayo de caspasa se refiere a la activación de células por caspasa después de 24 h de tratamiento con construcciones de anticuerpos a 20 nM. N/D - No disponible; N/T - No probado.

De las proteínas probadas, A02.12 se expresó bien y demostró potencia en los ensayos de anexina V, caspasa y proliferación celular. La sustitución de N69T en el anticuerpo A02.47 no afectó los niveles de expresión o la potencia en los ensayos de anexina V o caspasa, lo que sugiere que es posible la eliminación de este sitio de desamidación. La sustitución N69T podría incorporarse en otras construcciones en el presente documento para eliminar este posible sitio de desamidación con pérdidas mínimas en la actividad funcional del anticuerpo resultante.

10

Ejemplo de referencia 2

Análisis de inmunogenicidad por ordenador de la secuencia de aminoácidos de cadena ligera de A02.1

Se identificaron posibles epítomos inmunogénicos en la secuencia de aminoácidos de región variable de cadena ligera de A02.1 mediante el uso del software de análisis Epibase (Lonza, Reino Unido). Para eliminar los posibles epítomos inmunogénicos, se introdujeron sustituciones en la cadena ligera variable de A02.1 (figura 4). Las cadenas ligeras con menor inmunogenicidad predicha se coexpresaron en células HEK293E con la región variable de cadena pesada A02.12 (SEC ID NO: 34) formateada en una región constante de IgG4 que contiene la sustitución S228P fusionada con IFN atenuado con A145D. Las variantes de anticuerpos producidas se detallan en la tabla 10.

20

Tabla 10

Proteína de fusión de anti-CD38-IFN	Sustitución de aminoácidos de cadena pesada variable (en	Variable pesada SEC ID NO:	Sustitución de aminoácidos de cadena ligera variable (en	Variable ligera SEC ID NO:
-------------------------------------	--	----------------------------	--	----------------------------

ES 2 938 708 T3

atenuado	relación con A02.1)		relación con A02.1)	
A02.18	L74S, I78F, R81K, T(82A)S, M(100C)L	34	E83I, D85T, L47E	73
A02.19	L74S, I78F, R81K, T(82A)S, M(100C)L	34	E83I, D85T, L47G	74
A02.20	L74S, I78F, R81K, T(82A)S, M(100C)L	34	E83I, D85T, L47N	75
A02.21	L74S, I78F, R81K, T(82A)S, M(100C)L	34	E83I, D85T, L47P	76
A02.22	L74S, I78F, R81K, T(82A)S, M(100C)L	34	E83I, D85T, L47S	77
A02.23	L74S, I78F, R81K, T(82A)S, M(100C)L	34	E83I, D85T, L48E	78
A02.24	L74S, I78F, R81K, T(82A)S, M(100C)L	34	E83I, D85T, L48P	79
A02.25	L74S, I78F, R81K, T(82A)S, M(100C)L	34	E83I, D85T, Y49E	80
A02.26	L74S, I78F, R81K, T(82A)S, M(100C)L	34	E83I, D85T, Y49Q	81
A02.27	L74S, I78F, R81K, T(82A)S, M(100C)L	34	E83I, D85T, Y50P	82
A02.28	L74S, I78F, R81K, T(82A)S, M(100C)L	34	E83I, D85T, Y50N	83
A02.29	L74S, I78F, R81K, T(82A)S, M(100C)L	34	E83I, D85T, Y50T	84
A02.30	L74S, I78F, R81K, T(82A)S, M(100C)L	34	E83I, D85T, Y51D	85
A02.31	L74S, I78F, R81K, T(82A)S, M(100C)L	34	E83I, D85T, S52E	86
A02.32	L74S, I78F, R81K, T(82A)S, M(100C)L	34	E83I, D85T, S52H	87
A02.33	L74S, I78F, R81K, T(82A)S, M(100C)L	34	E83I, D85T, S52Q	88
A02.34	L74S, I78F, R81K, T(82A)S, M(100C)L	34	E83I, D85T, H(54A)N	89
A02.35	L74S, I78F, R81K, T(82A)S, M(100C)L	34	E83I, D85T, H(54A)P	90
A02.36	L74S, I78F, R81K, T(82A)S, M(100C)L	34	E83I, D85T, K(54B)D	91

Los anticuerpos anteriores se analizaron para determinar la expresión de proteínas, unión con CD38 a través de RPS y potencia mediante el uso de la exploración de sobrenadante de cultivo celular como se describe en el Ejemplo 5. Los resultados de estos ensayos se detallan en la tabla 11. Estos datos indican que la sustitución de algunos restos para reducir la inmunogenicidad prevista del anticuerpo da como resultado proteínas de fusión de anti-CD38-IFN 5 atenuado que expresan y tienen potencia funcional en los ensayos de anexina V, caspasa y proliferación celular.

Tabla 11

Proteína de fusión de anti-CD38-IFN atenuado	HPLC de proteína A (mg/l)	Unión a CD38 por medio de RPS (UR) a 350 s*	Ensayo de anexina V (factor de cambio en relación con células no tratadas)	Ensayo de caspasa (factor de cambio en relación con células no tratadas)	Ensayo de proliferación celular CI ₅₀ (pM)
A02.18	9,3	745	N/T	N/T	N/T
A02.19	8,0	741	N/T	N/T	N/T
A02.20	9,1	N/T	2,2	5,6	37
A02.21	3,3	NSU	N/T	N/T	N/T
A02.22	10,4	738	N/T	N/T	N/T
A02.23	15,9	192	2,7	6,9	N/T
A02.24	23,5	87	1,4	2,3	N/T
A02.25	25,7	80	3,0	4,3	2477
A02.26	35,0	383	3,2	6,0	66
A02.27	12,3	NSU	1,3	2,5	29910
A02.28	16,1	422	2,7	6,3	N/T
A02.29	19,7	150	2,7	5,8	133
A02.30	25,2	122	1,9	2,5	N/T
A02.31	28,4	359	3,0	7,1	514
A02.32	13,5	663	2,7	7,7	60
A02.33	11,2	107	N/T	N/T	N/T
A02.34	16,6	407	4,8	5,1	503
A02.35	11,2	738	2,4	4,8	3050
A02.36	16,7	192	2,8	8,0	N/T

La unión de CD38 por RPS se refiere a la cantidad de CD38 que permanece unida a la superficie después de 350 segundos de la fase de disociación. El ensayo de anexina V se refiere a células teñidas positivamente por anexina V-FITC después de 24 h de tratamiento con construcciones de anticuerpos a 20 nM. El ensayo de caspasa se refiere a la activación de células por caspasa después de 24 h de tratamiento con construcciones de anticuerpos a 20 nM. NSU - no se unió; N/T - No probado.

Ejemplo de referencia 3

Múltiples sustituciones de aminoácidos producen variantes optimizadas de A02.1

Al combinar sustituciones que mejoran la inmunogenicidad, la capacidad de fabricación o la potencia de los anticuerpos anti-CD38 descritos anteriormente en una sola construcción génica, se obtuvieron anticuerpos anti-CD38 muy optimizados y proteínas de fusión de anti-CD38-IFN atenuado. La tabla 12 resume dichas sustituciones combinatorias y detalla combinaciones de cadenas pesadas y ligeras coexpresadas en células HEK293E y posteriormente probadas.

5

Tabla 12

Proteína de fusión de anti-CD38-IFN atenuado	Sustitución de aminoácidos de cadena pesada variable (en relación con A02.1)	Variable pesada SEC ID NO:	Sustitución de aminoácidos de cadena ligera variable (en relación con A02.1)	Variable ligera SEC ID NO:

ES 2 938 708 T3

A02.16	L74S, I78F, R81K, T(82A)S, M(100C)L	34	R29G, Y30S E83I, D85T, M89L, N94Q	92
A02.17	L74S, I78F, R81K, T(82A)S, M(100C)L	34	R29G, Y30S E83I, D85T, M89L, N94E	93
A02.52	L74S, I78F, R81K, T(82A)S, M(100C)L	34	R29G, Y30S, S52Q, E83I, D85T, M89L, N94E	94
A02.53	L74S, I78F, R81K, T(82A)S, M(100C)L	34	Y30S, S52Q, E83I, D85T, M89L, N94E	95
A02.54	L74S, I78F, R81K, T(82A)S, M(100C)L	34	R29G, Y30S, S52Q, E83I, D85T, M89L, N94Q	96
A02.55	L74S, I78F, R81K, T(82A)S, M(100C)L	34	Y30S, S52Q, E83I, D85T, M89L, N94Q	97
A02.56	L74S, I78F, R81K, T(82A)S, M(100C)L	34	R29G, Y30S, S52E, M89L, E83I, D85T, N94E	98
A02.57	L74S, I78F, R81K, T(82A)S, M(100C)L	34	Y30S, S52E, E83I, D85T, M89L, N94E	99
A02.58	L74S, I78F, R81K, T(82A)S, M(100C)L	34	R29G, Y30S, S52E, E83I, D85T, M89L, N94Q	100
A02.59	L74S, I78F, R81K, T(82A)S, M(100C)L	34	Y30S, S52E, E83I, D85T, M89L, N94Q	101
A02.60	L74S, I78F, R81K, T(82A)S, M(100C)L	34	R29G, Y30S, S52Q, N69Q, E83I, D85T, M89L, N94E	102
A02.61	L74S, I78F, R81K, T(82A)S, M(100C)L	34	Y30S, S52Q, N69Q, E83I, D85T, M89L, N94E	103
A02.62	L74S, I78F, R81K, T(82A)S, M(100C)L	34	R29G, Y30S, S52Q, N69Q, E83I, D85T, M89L, N94Q	104
A02.63	L74S, I78F, R81K, T(82A)S, M(100C)L	34	Y30S, S52Q, N69Q, E83I, D85T, M89L, N94Q	105
A02.64	L74S, I78F, R81K, T(82A)S, M(100C)L	34	R29G, Y30S, S52E, N69Q, E83I, D85T, M89L, N94E	106
A02.65	L74S, I78F, R81K, T(82A)S, M(100C)L	34	Y30S, S52E, N69Q, E83I, D85T, M89L, N94E	107
A02.66	L74S, I78F, R81K, T(82A)S, M(100C)L	34	R29G, Y30S, S52E, N69Q, E83I, D85T, M89L, N94Q	108
A02.67	L74S, I78F, R81K, T(82A)S, M(100C)L	34	Y30S, S52E, N69Q, E83I, D85T, M89L, N94Q	109

Cada anticuerpo descrito en la Tabla 12 se analizó para determinar la expresión de proteínas, unión con CD38 a través de RPS y potencia mediante el uso de sobrenadante de cultivo celular. Los datos resultantes se proporcionan en la tabla 13. Estos resultados demuestran que la combinación de sustituciones que se ha predicho que son beneficiosas por ordenador dio lugar a algunas proteínas de fusión de anti-CD38-IFN atenuado que expresaron y tuvieron potencia funcional en los ensayos de anexina V, caspasa y proliferación celular.

5

Tabla 13

Proteína de fusión de anti-CD38-IFN atenuado	HPLC de proteína A (mg/l)	Unión a CD38 por medio de RPS (UR) a 350 s*	Ensayo de anexina V (factor de cambio en relación con células no	Ensayo de caspasa (factor de cambio en relación con células no	Ensayo de proliferación celular CI ₅₀ (pM)
--	---------------------------	---	--	--	---

			tratadas)	tratadas)	
A02.14	8,1	1247	2,18	5,47	398
A02.15	29,6	1409	3,92	5,62	491
A02.16	5,7	1050	2,4	7,9	636
A02.17	10,0	1103	3,7	5,7	467
A02.52	2,8	416	2,0	5,4	2665
A02.53	3,0	545	2,2	4,7	6338
A02.54	1,8	250	1,9	5,9	15350
A02.55	2,1	436	2,2	4,5	12740
A02.56	2,0	178	1,7	4,3	13860
A02.57	2,7	345	2,5	6,6	6363
A02.58	2,3	273	1,9	4,9	9142
A02.59	1,2	388	2,0	4,7	6176
A02.60	1,3	NSU	1,5	3,3	185600
A02.61	1,2	NSU	1,7	4,1	65160
A02.62	1,3	NSU	1,8	5,0	55590
A02.63	1,2	NSU	1,7	3,4	152100
A02.64	1,1	NSU	1,8	3,2	89120
A02.65	1,4	NSU	1,6	4,1	37240
A02.66	1,3	NSU	1,6	4,0	57540
A02.67	1,6	NSU	2,3	3,9	82760

La unión de CD38 por RPS se refiere a la cantidad de CD38 que permanece unida a la superficie después de 350 segundos de la fase de disociación. El ensayo de anexina V se refiere a células teñidas positivamente por anexina V-FITC después de 24 h de tratamiento con construcciones de anticuerpos a 20 nM. El ensayo de caspasa se refiere a la activación de células por caspasa después de 24 h de tratamiento con construcciones de anticuerpos a 20 nM NSU - no se unió; N/T - No probado.

Ejemplo de referencia 4

Emparejamiento de diferentes anticuerpos anti-CD38 de cadena pesada y ligera

5 A fin de determinar si se pueden obtener proteínas de fusión de anti-CD38-IFN atenuado funcionales, las cadenas pesada (SEC ID NO: 110) y ligera (SEC ID NO: 112) del anticuerpo IgG4 X910/12-HC-L0-IFN-alfa (A145D) descrito en el documento PCT/AU2012/001323 y las cadenas pesada (SEC ID NO: 111) y ligera (SEC ID NO: 113) del anticuerpo IgG4 X913/15-HC-L0-IFN-alfa (A145D) descrito en el documento PCT/AU2012/001323, se combinaron entre sí en diversas combinaciones y con cadenas pesadas y ligeras descritas en los ejemplos anteriores. En la tabla 14 se proporciona un resumen de los emparejamientos de cadena pesada y ligera.

Tabla 14

Proteína de fusión de anti-CD38-IFN atenuado	Variable pesada SEC ID NO:	Variable ligera SEC ID NO:
A02.38	34	113
A02.39	34	112

A02.40	111	65
Proteína de fusión de anti-CD38-IFN atenuado	Variable pesada SEC ID NO:	Variable ligera SEC ID NO:
A02.41	110	65
IgG4 X913/15-HC-L0-IFN-alfa (A145D)	111	113
A02.43	110	113
A02.44	111	112
IgG4 X910/12-HC-L0-IFN-alfa (A145D)	110	112

Cada anticuerpo producido se analizó para determinar la expresión de proteínas, unión con CD38 a través de RPS y potencia mediante el uso de los ensayos de potencia de sobrenadante de cultivo celular. Los resultados de estos ensayos se presentan en la tabla 15a. Estos datos muestran que el emparejamiento de diferentes cadenas pesadas y ligeras de distintos anticuerpos dio lugar a algunas proteínas de fusión de anti-CD38-IFN atenuado que expresaron y tuvieron potencia funcional en la anexina V, Ensayos de caspasa y proliferación celular.

5

Tabla 15a

Proteína de fusión de anti-CD38-IFN atenuado	HPLC de proteína A (mg/l)	Unión a CD38 por medio de RPS (UR) a 350 s*	Ensayo de anexina V (factor de cambio en relación con células no tratadas)	Ensayo de caspasa (factor de cambio en relación con células no tratadas)
A02.38	2,9	NSU	0,9	4,3
A02.39	21,3	66	2,5	6,6
A02.40	2,1	NSU	1,0	4,4
A02.41	50,0	165	2,6	6,7
IgG4 X913/15-HC-L0-IFN-alfa (A145D)	8,2	96	2,2	5,4
A02.43	2,5	NSU	0,9	4,1
A02.44	2,2	NSU	1,0	4,5
IgG4 X910/12-HC-L0-IFN-alfa (A145D)	27,1	125	2,6	5,9

La unión de CD38 por RPS se refiere a la cantidad de CD38 que permanece unida a la superficie después de 350 segundos de la fase de disociación. El ensayo de anexina V se refiere a células teñidas positivamente por anexina V-FITC después de 24 h de tratamiento con construcciones de anticuerpos a 20 nM. El ensayo de caspasa se refiere a la activación de células por caspasa después de 24 h de tratamiento con construcciones de anticuerpos a 20 nM. NSU - no se unió.

Una selección de las proteínas de fusión de anti-CD38-IFN atenuado anterior se purificó y analizó para determinar la unión con células positivas para CD38 en ensayos basados en células. Además, se repitieron ensayos de potencia para dar una determinación más precisa de la actividad relativa de cada proteína de fusión de anti-CD38-IFN atenuado. Los resultados de estos ensayos se proporcionan en la tabla 15b.

10

Tabla 15b

Proteína de fusión de anti-CD38-IFN atenuado	Unión de flujo de ARP-1 (CE ₅₀ en µg/ml)	Ensayo de anexina V (factor de cambio en relación con células no)	Ensayo de caspasa (factor de cambio en relación con células no)	Ensayo de proliferación celular CI50 (pM)	Figuras

ES 2 938 708 T3

		tratadas)	tratadas)		
A02.1	1,45	1,86	4,2	278,2	13, 14, 15, 16, 17, 18, 19
A02.2	2,46	1,94	4,4	175,7	13, 19
A02.3	0,96	1,86	3,5	254,9	13, 19
A02.4	1,50	1,88	3,8	198,3	13, 19
A02.5	1,45	1,88	4,3	146,3	13, 19
A02.6	1,42	2,03	3,5	102,3	13, 15, 19, 20
A02.8	1,93	1,91	3,8	125,5	13, 19
A02.9	1,03	1,96	3,6	107,1	13, 19
A02.10	1,48	1,95	3,8	125,6	13, 19
A02.11	3,48	1,98	3,9	374	13, 19
A02.12	3,40*	1,40	3,4	23,66	14,16, 19, 21
A02.14	10,01*	1,82	2,5	398,20	19
A02.15	1,97*	3,09	6,8	491,70	19
A02.16	3,89*	2,66	5,2	636,80	14, 19
A02.17	9,32*	2,23	3,2	467,1	14, 19
A02.18	1,64	1,55	3,7	78,72	19
A02.19	1,07	1,63	3,5	230,3	19
A02.20	15,92*	1,61	2,9	36	19
A02.22	1,58	1,91	3,8	207	19
A02.25	0,37*	1,42	2,4	2477	19
A02.26	37,99*	1,56	2,0	66	19
A02.27	LB*	1,06	1,0	29910	14, 16, 19
A02.29	0,48*	1,55	3,0	133	19
A02.31	0,26*	1,78	2,1	514	14, 16, 19
A02.32	LB*	1,83	3,3	605	19
A02.33	1,54	1,96	3,7	741	16, 19
A02.34	0,89*	3,06	4,7	503	19
A02.35	3,44*	1,71	1,5	3050	19
A02.37	LB*	2,05	4,3	128	19
A02.39	LB*	1,92	4,3	3714	19
A02.41	0,78*	2,01	3,4	554	14, 19
A02.42	LB*	1,52	3,3	310	19

A02.45	0,71*	1,66	1,6	1697	19
A02.47	16,35*	1,53	4,69	144,3	19

La unión de flujo se refiere a la concentración de anticuerpo necesaria para lograr 50 % de intensidad de fluorescencia media máxima. El ensayo de anexina V se refiere a células teñidas positivamente por anexina V-FITC después de 24 h de tratamiento con construcciones de anticuerpos a 20 nM. El ensayo de caspasa se refiere a la activación de células por caspasa después de 24 h de tratamiento con construcciones de anticuerpos a 20 nM. LB - unión baja, insuficiente para un valor de CE₅₀. *El anticuerpo se probó en un ensayo de unión de flujo frente a la línea celular H929. El valor señalado es la CE₅₀ en µg/ml.

5 La Figura 5 enumera la cadena pesada variable de consenso y la Figura 6 enumera la cadena ligera variable de consenso de construcciones relacionadas con A02.1 con actividad funcional. Se podría prever además que podrían realizarse combinaciones de sustituciones tales como las descritas para los anticuerpos anti-CD38 X02.114, X02.115, X02.116, X02.117, X02.118, X02.119 (figura 6), X02.120, X02.121, X02.122, X02.123, X02.124, X02.125, X02.126 o X02.127 (figura 30). Además, los anticuerpos anti-CD38 anteriores también podrían construirse como proteínas de fusión de anti-CD38-IFN atenuado y probarse para determinar la actividad funcional como se describe en el presente documento.

Modelo de xenoinjerto de mieloma múltiple H929

10 La potencia *in vivo* de A02.1 se ha probado previamente en el modelo de mieloma múltiple NCI-H929 s.c. como se ha descrito en el Ejemplo 5. Se mostró que A02.1 tenía potente actividad antitumoral. Los datos se presentan en el documento PCT/AU2012/001323.

El modelo de xenoinjerto de mieloma múltiple H929 se podría usar para probar la actividad antitumoral de cualquiera de las proteínas de fusión de anti-CD38-IFN atenuado descrita anteriormente.

Se requiere IFN atenuado para potente activación apoptótica y de caspasa en líneas celulares tumorales

15 Mediante el uso del ensayo de anexina V y el ensayo de caspasa, se demostró que la potente actividad apoptótica y activación de caspasa dependen de las proteínas de fusión de Anti-CD38-IFN atenuado que contienen un IFN atenuado (tabla 16a, figura 18). En el ensayo de anexina V, las proteínas que contienen IFN atenuado (A02.1 y A02.6) tuvieron una actividad 2 veces mayor que las proteínas que no contienen IFN atenuado (X02.1 y X02.6).

Tabla 16a

Proteína de fusión de anti-CD38-IFN atenuado	Ensayo de anexina V (factor de cambio en relación con células no tratadas)	Ensayo de caspasa (factor de cambio en relación con células no tratadas)
A02.1	3,57	5,60
X02.1	1,50	2,34
A02.6	2,03	3,5
X02.6	1,04	0,40

El ensayo de anexina V se refiere a células teñidas positivamente por anexina V-FITC después de 24 h de tratamiento con construcciones de anticuerpos a 20 nM. El ensayo de caspasa se refiere a la activación de células por caspasa después de 24 h de tratamiento con construcciones de anticuerpos a 20 nM.

20 Ejemplo 1

Procedimientos generales

Producción de anticuerpos y construcciones de fusión de anticuerpos en células HEK-293E. Se prepararon plásmidos de ADN que codificaban construcciones de proteínas (anticuerpos y construcciones relacionadas con anticuerpo-IFN-alfa2b) mediante el uso del equipo maxi de plásmidos HiSpeed (Qiagen, Valencia, CA) y después se transfectaron en células HEK293E (CNRC, Montreal, Canadá), cultivadas en medio sintético F17 complementado con D-(+)-Glucosa al 0,45 % (p/v) (Sigma, Castle Hill, NSW), Geneticina 25 µg/ml (Invitrogen, Carlsbad, CA) y GlutaMAX 1 x (Invitrogen, Carlsbad, CA) mediante el uso de un reactivo de transfección disponible en el mercado y medio OptiMEM (Invitrogen, Carlsbad, CA). Después de permitir la expresión durante 6 días en una incubadora a la que se ha proporcionado CO₂ al 5 % y agitación a 120 rpm, los medios de cultivo se aislaron y se sometieron a purificación por afinidad mediante el uso de perlas de agarosa de proteína A Mab Select SuRe™ (GE Healthcare, Pisataway, NJ). Se intercambió el tampón

de las construcciones de proteínas purificadas a arginina HCl 0,2 M, ácido cítrico 25 mM, Hidróxido de sodio 71,5 mM a pH 6,0 mediante el uso de una columna PD Midi-Trap G-25 (GE Healthcare, Piscataway, NJ) o una columna de desalación HiPrep 26/10 (desalación de HiTrap desalación de HiPrep 26/10). Las construcciones de proteínas purificadas se concentraron después usando dispositivos de filtro centrífugo Amicon Ultra de 50 kDa (Millipore, Billerica, MA), seguido de determinación de la concentración de proteínas leyendo la absorbancia a 280 nm.

Producción de anticuerpos y construcciones de fusión de anticuerpos en células CHO.

Se prepararon plásmidos de ADN que codificaban construcciones de proteínas (anticuerpos y construcciones relacionadas con anticuerpo-IFN-alfa2b) usando el equipo maxi de plásmidos HiSpeed (Qiagen, Valencia, CA) y después se transfectaron en células CHO (Lonza) cultivadas en medio de expresión de CHO Freestyle™ (Invitrogen, Carlsbad, CA) mediante el uso de un reactivo de transfección disponible en el mercado y medio OptiPro SFM™ (Invitrogen, Carlsbad, CA). Después de permitir la expresión durante 6 días en una incubadora a la que se ha proporcionado CO₂ al 10 % y agitación a 120 rpm, los medios de cultivo se aislaron y se sometieron a purificación por afinidad usando perlas de agarosa de proteína A Mab Select SuRe (GE Healthcare, Piscataway, NJ). Se intercambiaron el tampón de las construcciones de proteínas purificadas a arginina HCl 0,2 M, ácido cítrico 25 mM, Hidróxido de sodio 71,5 mM a pH 6,0 mediante el uso de una columna PD Midi-Trap G-25 (GE Healthcare, Piscataway, NJ) o una columna de desalación HiPrep 26/10 (desalación de HiTrap desalación de HiPrep 26/10). Las construcciones de proteínas purificadas se concentraron después usando dispositivos de filtro centrífugo Amicon Ultra de 50 kDa (Millipore, Billerica, MA), seguido de determinación de la concentración de proteínas leyendo la absorbancia a 280 nm.

Proteínas de fusión de anti-CD38-IFN atenuado que se unen con CD38 según lo medido por la resonancia de plasmón superficial (RPS). La capacidad de los anticuerpos anti-CD38 y las proteínas de fusión de anti-CD38-IFN atenuado para unirse con CD38 humano se midió usando sobrenadante celular transfectado no purificado preparado 7:1 con reductor de unión inespecífico (GE Healthcare, Piscataway, NJ). En resumen, mediante el uso de un Biacore™ 3000 o un T200, se inmovilizó proteína A en la celda de flujo (FC) 1 (FC1) y FC2 (o como alternativa FC3 y FC4) de un chip sensor de uso en investigación CM5 mediante el uso de acoplamiento de amina, proporcionando aproximadamente 1500 UR. Se usó FC2 (o FC4) como referencia a lo largo de los experimentos. Los experimentos se ejecutaron a 37 °C en tampón HBS-P+ (HEPES 0,01 M, NaCl 0,15 M, tensioactivo P20 0,005 % v/v, pH 7,4). A un caudal de 20 µl/min, ambas celdas de flujo se regeneraron con 10 µl de hidróxido de sodio 50 mM antes de pasar 40 µl de sobrenadante que contiene la proteína sobre FC1 (o FC3) solamente. Se inyectaron 30 µl de CD38 (10 µg/ml en tampón de ejecución) o 30 µl de tampón de ejecución sobre FC1 y FC2 con un tiempo de disociación de 5 minutos. Ambas superficies se regeneraron dos veces con hidróxido de sodio. Los resultados se generaron usando el software BIAevaluation proporcionado con la máquina. Se usó Microsoft Excel para los cálculos. El software BIAevaluation restó automáticamente el sensorgrama de referencia proporcionando una traza de FC2-1 (o FC4-3) para cada muestra. Se realizó una doble referencia para cada anticuerpo probado restando el sensorgrama con una inyección de CD38 del sensorgrama con una inyección de tampón de ejecución en blanco. La captura de Proteína A se refiere a las unidades de respuesta medidas a partir de un sensorgrama en un punto de tiempo fijo de 412,5s y esto corresponde al nivel de proteína capturada en la superficie de Proteína A. La unión de CD38 es las unidades de respuesta medidas a 507,5s y es una indicación del nivel de CD38 unido con la superficie con proteína capturada. La disociación de CD38 es las unidades de respuesta medidas a 865,5 s y es una indicación del nivel de CD38 unido con la superficie con proteína capturada después de aproximadamente 300 s de fase de disociación. Se usó BIAevaluation para ajustar el sensorgrama usando una ecuación de Langmuir 1:1 para generar una constante de asociación en equilibrio (KD)

HPLC de proteína A.

Los sobrenadantes se analizaron por medio de HPLC de proteína A mediante el uso de una columna POROS A/20 de 2,1x30 mm Id (Applied Biosystems) conectada con un sistema de cromatografía Agilent 1100. La columna se equilibró con PBS a pH 7,4 y la proteína se eluyó con PBS ajustado a pH 2,2. Se generó una curva patrón usando cantidades conocidas de un anticuerpo monoclonal en PBS. Los cromatogramas, a las longitudes de onda de 215 nm o 280 nm, se integraron usando el software del fabricante y el área bajo la curva (ABC) señalada e interpolada frente a la curva patrón generada para estimar la concentración.

Unión por citometría de flujo de anticuerpos y proteínas de fusión de anti-CD38-IFN atenuado con una línea celular positiva para CD38 humano, ARP-1 y H929.

La línea celular de mieloma múltiple ARP-1 fue un regalo de Dr. Bart Barlogie, director del Instituto de mieloma del Centro médico de la Universidad de Arkansas (Little Rock, AK). Se describe en Hardin J. *et al.* (1994) Blood. 84: 3063-70). La línea celular de mieloma múltiple NCI-H929 (H929) se adquirió de ATCC (CRL-9068, Gazdar, Blood 67: 1542-1549, 1986).

Se probó la capacidad de los anticuerpos o las construcciones de anticuerpo-interferón para unirse con las líneas celulares de mieloma positivas para CD38 humano ARP-1 o H929 en ensayos basados en citometría de flujo. Se incubaron células ARP-1 o células H929 (5×10^5 , según se valoró por exclusión de azul de tripano) con cada proteína o con un anticuerpo monoclonal IgG4 humano con una construcción de proteína de especificidad irrelevante a diversas concentraciones en 50 µl de tampón de FACS (PBS más suero de ternero fetal al 1 %, FCS, HEPES 0,2 M, EDTA 0,5 M) en placas de 96 pocillos durante 60 minutos en hielo en la oscuridad. Las células se lavaron tres veces con

tampón FACS antes de la incubación durante 30 minutos en 50 µl de tampón FACS que contenía IgG de cabra antihumana (específica de Fc, conjugado con isotiocianato de fluoresceína, FITC; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Después de lavar tres veces con tampón FACS, las células se fijaron con 50 µl de PBS que contenían formaldehído 4 % v/v y se incubaron a 4 °C en la oscuridad durante 16 horas. Las células incubadas en suspensión se diluyeron con 150 µl adicionales de tampón FACS y se analizaron para determinar la unión por citometría de flujo en un FACS Canto II (BD Biosciences, San Diego, CA) usando dispersión directa, dispersión lateral e intensidad de fluorescencia en el canal de FITC. El valor señalado es la intensidad de fluorescencia media (IFM).

Ensayos diana

Ensayo de proliferación de células Daudi: Este ensayo se usó para cuantificar la actividad antiproliferativa de IFN y construcciones de proteína de fusión de anticuerpo-IFN en células que presentan CD38. Las células Daudi expresan CD38 como un antígeno asociado a la superficie celular. La viabilidad de las células se midió mediante el uso del reactivo CellTiter-Glo®, Cat n.º G7570, de Promega (Madison, Wisconsin). Este es un ensayo basado en la luminiscencia que determina la viabilidad de las células en cultivo en función de la cuantificación de ATP. La intensidad de la señal es proporcional al número de células viables en un pocillo de placa de microtitulación. Los detalles del ensayo son los siguientes: se cultivaron células Daudi (obtenidas de ATCC, Manassas, VA) en un matraz T75 (TPP, Trasadingen, Suiza, cat n.º 90076) a una densidad preferente de entre $0,5 \times 10^5$ y $0,8 \times 10^5$ células viables/ml en RPMI 1640 (Mediatech, Inc., Manassas, VA, cat n.º 10-040-CV) con suero bovino fetal al 10 % (FBS; Hyclone, Logan, UT cat n.º SH30070.03). Las células se recogieron centrifugando a 400 x g durante cinco minutos, decantando el sobrenadante y resuspendiendo el sedimento celular en RPMI 1640 + FBS al 10 %. Después se contaron las células y se ajustó la densidad a $3,0 \times 10^5$ células/ml en RPMI 1640 + FBS al 10 %. Después, se repartieron alícuotas de 50 µl de suspensión celular en cada pocillo de una placa de cultivo tisular de fondo redondo de 96 pocillos (en lo sucesivo en el presente documento, "placa experimental") (TPP, cat n.º 92067). En una placa separada, estéril, de 96 pocillos (en lo sucesivo en el presente documento, "placa de dilución"; Costar, Corning, NY cat n.º 3879), se diluyeron en serie artículos de prueba por duplicado en RPMI 1640 + FBS al 10 %. Después, se transfirieron 50 µl/pocillo de la placa de dilución a la placa experimental. La placa experimental se incubó después durante cuatro días a 37 °C con CO₂ al 5 %. Una mezcla del tampón de ensayo suministrado por el fabricante y el sustrato de ensayo (en adelante en la presente memoria, "reactivo CellTiter-Glo®", mezclado según las instrucciones del fabricante) se añadió a la placa experimental a 100 µl/pocillo. La placa se agitó durante dos minutos.

Después, se transfirieron 100 µl/pocillo de la placa experimental a una placa opaca blanca de fondo plano de 96 pocillos (en lo sucesivo en la presente memoria, "placa de ensayo"; BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ cat n.º 353296). Después, el contenido de la placa de ensayo se dejó estabilizar en la oscuridad durante 15 minutos a temperatura ambiente. La placa se leyó en un contador Victor 3V de múltiples marcadores (Perkin Elmer, Waltham, MA, modelo n.º 1420-041) en el canal de luminometría y se midió la luminiscencia. Los resultados se presentan como "unidades relativas de luminiscencia" (URL). Los datos se analizaron usando Prism 5 (Graphpad, San Diego, CA) usando regresión no lineal y ajuste de curva de tres parámetros para determinar el punto medio de la curva (CE50).

Ensayo de proliferación celular de ARP-1: Este ensayo se usó para cuantificar la actividad antiproliferativa de IFN y construcciones de proteína de fusión de anticuerpo-IFN frente a células positivas para antígeno CD38. Las células ARP-1 expresan CD38 como antígenos asociados a la superficie celular. La viabilidad de las células se midió mediante el uso del reactivo CellTiter-Glo®, Cat n.º G7570, de Promega (Madison, Wisconsin). Este es un ensayo basado en la luminiscencia que determina la viabilidad de las células en cultivo mediante cuantificación de ATP. La intensidad de la señal es proporcional al número de células viables en un pocillo de placa de microtitulación.

Los detalles del ensayo son los siguientes: las células ARP-1 se cultivaron en un matraz T175 (Costar, Corning, NY Lakes, NJ, cat n.º CLS431080) a una densidad preferente de entre $2,0 \times 10^5$ y $2,0 \times 10^6$ células viables/ml en RPMI 1640 (Life technologies, Mulgrave, VIC, cat n.º 11875-093) con suero bovino fetal al 10 % (FBS; AusGeneX, Molendinar, QLD, Australia cat n.º FBS500S). Las células se recogieron centrifugando a 400 x g durante cinco minutos, decantando el sobrenadante y resuspendiendo el sedimento celular en RPMI 1640 + FBS al 10 %. Después se contaron las células y se ajustó la densidad a $2,0 \times 10^5$ células/ml en RPMI 1640 + FBS al 10 %. Después, se distribuyeron en alícuotas 50 µl de la suspensión celular en cada pocillo de una placa opaca blanca de fondo plano de 96 pocillos (en adelante en la presente memoria, "placa experimental"; Costar, Corning, NY Lakes, NJ, cat n.º CLS3917). En una placa separada, estéril, de 96 pocillos (en lo sucesivo en el presente documento, "placa de dilución"; Costar, Corning, NY cat n.º 3799), se diluyeron en serie artículos de prueba por duplicado en RPMI 1640 + FBS al 10 %. Posteriormente, se transfirieron 50 µl/pocillo de la placa de dilución a la placa experimental. La placa experimental se incubó después durante cuatro días a 37 °C con CO₂ al 5 %. Cada placa experimental incluyó la construcción de IFN con anticuerpo parental como control relativo.

Una mezcla del tampón de ensayo suministrado por el fabricante y el sustrato de ensayo (reactivo CellTiter-Glo®, mezclado de acuerdo con las instrucciones del fabricante) se añadió a la placa experimental a 100 µl/pocillo. La placa se agitó durante dos minutos. Después, el contenido de la placa de ensayo se dejó estabilizar en la oscuridad durante 15 minutos a temperatura ambiente. La placa se leyó en un lector de placas FLUOstar Galaxy (BMG Labtech, Durham, NC) en el canal de luminometría y se midió la luminiscencia. Los datos se analizaron usando Prism 5 (Graphpad, San Diego, CA) usando regresión no lineal y ajuste de curva de tres parámetros para determinar el punto medio de la curva

(CE₅₀).

Ensayo de anexina V: Las células H929 se recogieron centrifugando a 400 x g durante cinco minutos, decantando el sobrenadante y resuspendiendo el sedimento celular en RPMI 1640 + FBS al 10 %. Después se contaron las células y se ajustó la densidad a $1,0 \times 10^6$ células/ml en RPMI 1640 + FBS al 10 %. Después, se distribuyeron en alícuotas 50 µl de la suspensión celular en cada pocillo de placas transparentes de fondo redondo de 96 pocillos (en lo sucesivo en el presente documento, "placa experimental"; Costar, Corning, NY cat n.º CL3799). En una placa separada, estéril, de 96 pocillos (en lo sucesivo en el presente documento, "placa de dilución"; Costar, Corning, NY cat n.º CL3799), los artículos de prueba se diluyeron a 40 nM por cuadruplicado en RPMI 1640 + FBS al 10 %. Posteriormente, se transfirieron 50 µl/pocillo de la placa de dilución a la placa experimental. La placa experimental se incubó después durante 24 horas a 37 °C con CO₂ al 5 %. Las células se centrifugaron a 400 xg durante 5 minutos, se decantó el sobrenadante y se resuspendieron en 100 µl de tampón HEPES que contenía anexina V-FITC (1/200) y 7-AAD (1/50). Después, las células se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente y posteriormente se analizaron para determinar la tinción de anexina V y 7-AAD mediante citometría de flujo en un FACS Canto II (BD Biosciences, San Diego, CA) usando dispersión directa, dispersión lateral, FITC y canales PerCP-Cy5.5. Las células positivas para anexina V se refieren a células teñidas positivamente por anexina V-FITC después de 24 h de tratamiento con construcciones de anticuerpos a 20 nM y se expresan como factor de cambio en relación con células no tratadas.

Ensayo de caspasa: Las caspasas activadas 2, 3, 6, 7, 8, 9, 10 se midieron con el reactivo de ensayo de caspasas homogéneo, fluorimétrico cat n.º 12236869001, de Roche (West Sussex, Reino Unido) después de tratamiento con anticuerpos de prueba. A continuación se muestran los detalles del ensayo.

Se cultivaron células ARP-1, que expresan altos niveles de CD38, en un matraz T175 (Costar, Corning, NY, cat n.º CLS431080) a una densidad preferente de entre $2,0 \times 10^5$ y $2,0 \times 10^6$ células viables/ml en RPMI 1640 (Life Technologies, Mulgrave, VIC, cat n.º 11875-093) con FBS al 10 % (AusGeneX, Molendinar, QLD, Australia cat n.º FBS500S). Las células se recogieron centrifugando a 400 x g durante cinco minutos, decantando el sobrenadante y resuspendiendo el sedimento celular en RPMI 1640 sin rojo fenol (Life Technologies, Mulgrave, VIC, cat n.º 11835-030) + FBS al 10 %. Después se contaron las células y se ajustó la densidad a $2,0 \times 10^5$ células/ml en RPMI 1640 sin rojo fenol + FBS al 10 %. Después, se distribuyeron en alícuotas 50 µl de la suspensión celular en cada pocillo de una placa de fondo transparente de paredes negras de fondo plano de 96 pocillos (en lo sucesivo en el presente documento, "placa experimental"; Costar, Corning, NY cat n.º CLS3603). En una placa separada, estéril, de 96 pocillos (en lo sucesivo en el presente documento, "placa de dilución"; Costar, Corning, NY cat n.º 3799), los artículos de prueba se diluyeron a 40 nM por cuadruplicado en RPMI 1640 sin rojo fenol + FBS al 10 %. Posteriormente, se transfirieron 50 µl/pocillo de la placa de dilución a la placa experimental. La placa experimental se incubó después durante 24 horas a 37 °C con CO₂ al 5 %. El tampón de ensayo proporcionado por el fabricante se añadió al sustrato suministrado por el fabricante y se mezcló según las instrucciones del fabricante para crear la "solución de sustrato". Después, se añadieron 100 µl de la solución de sustrato a cada pocillo de la placa de ensayo. La placa se agitó durante 2 minutos. La placa se incubó después a temperatura ambiente durante 15 minutos en la oscuridad y finalmente se leyó en el lector de placas FLUOstar Galaxy (BMG Labtech, Durham, NC) con un filtro de excitación de 470-500 nm y un filtro de emisión de 500-560 nm y la fluorescencia medida y presentada como factor de cambio en relación con células no tratadas. El ensayo de caspasa se refiere a la activación de células por caspasa después de 24 h de tratamiento con construcciones de anticuerpos a 20 nM.

Ensayos fuera de diana

Ensayo indicador génico iLite: El ensayo iLite "fuera de diana" (PBL Interferon Source, Piscataway, NJ, Cat n.º 51100) se realizó en gran medida según lo descrito por el fabricante, con la adición de una etapa de bloqueo de IgG humana. El fabricante describe la línea celular iLite como "una línea celular transfectada estable derivada de una línea celular humana promonocítica disponible en el mercado caracterizada por la expresión de antígenos del MHC de clase II, en particular el antígeno linfocítico humano (HLADR), en la superficie celular". La línea celular contiene un gen de luciferasa transfectado de manera estable, cuya expresión es impulsada por un elemento de respuesta a interferón (IRE), que permite cuantificar la actividad de interferón en función de la producción de luminiscencia. El fabricante suministró la placa iLite (en lo sucesivo en el presente documento, placa de ensayo) y el diluyente se retiró del congelador a -80 °C y se dejó equilibrar a temperatura ambiente. Después, se añadieron 50 µl del diluyente por pocillo a la placa de ensayo. El vial de células reporteras suministrado por el fabricante se sacó del congelador a -80 °C y se descongeló en un baño de agua a 37 °C. Después, se añadieron 25 µl de la solución de sustrato a cada pocillo de la placa de ensayo. A continuación, se añadieron 12,5 µl de IgG humana 8 mg/ml que se diluyó en RPMI 1640 + FBS 10 % (Sigma Chemicals, St. Louis, MO; cat n.º 14506) por cada pocillo. Los contenidos se mezclaron y se incubaron a 37 °C durante 15 minutos. En una "placa de dilución" separada, se diluyeron en serie artículos de prueba por duplicado en RPMI 1640 + FBS al 10 %. Después, se transfirieron 12,5 µl de los artículos de prueba desde la placa de dilución a la placa de ensayo. La placa de ensayo se incubó después a 37 °C con CO₂ al 5 % durante 17 horas. El tampón de ensayo y el sustrato suministrados por el fabricante se retiraron del congelador a -80 °C y se dejaron equilibrar a temperatura ambiente durante dos horas. El tampón de ensayo suministrado por el fabricante se añadió al vial de sustrato suministrado por el fabricante y se mezcló bien según las instrucciones del fabricante para crear la "solución de luminiscencia". Después, se añadieron 100 µl de la solución de luminiscencia a cada pocillo de la placa de ensayo. La placa se agitó durante 2 minutos. Después, la placa se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos en la oscuridad y finalmente se leyó en un contador Victor 3V de múltiples marcadores en un canal de luminometría y

la luminiscencia se midió y se presentó como URL. Los datos se analizaron con Graphpad Prism 5 como se describe para el "ensayo en la diana (Daudi)". Para probar las construcciones de proteína de fusión de anticuerpo anti-CD38-IFN en el ensayo iLite, el diluyente suministrado por el fabricante se complementó con anticuerpo anti-CD38 0,25 mg/ml (el mismo clon de anticuerpo que se prueba como una construcción de proteína de fusión de anticuerpo-IFN, para bloquear cualquier unión de las construcciones de proteína de fusión de anticuerpo anti-CD38-IFN con el CD38 expresado en las células iLite).

Ensayo HEK-Blue™ fuera de diana: El ensayo se usó para cuantificar la capacidad de las construcciones de fusión de anticuerpo-IFN para unirse con el receptor de interferón alfa/β (IFNAR) mediante el uso de la línea celular HEK-Blue™ IFN-alfa/β (InvivoGen, San Diego, CA). El "ensayo fuera de diana (HB-IFN)" se llevó a cabo en gran medida como lo describe el fabricante de la línea celular HEK-Blue™ IFN-alfa/β. Las células HEK-Blue™ IFN-alfa/β están específicamente diseñadas para monitorizar la activación de la vía JAK-STAT, que es inducida por los IFN de tipo I. Las células se generaron introduciendo los genes STAT2 e IRF9 humanos en células HEK293 para obtener una vía de señalización IFN de tipo I totalmente activa. Las células HEK-Blue™ IFN-alfa/β expresan de manera estable un gen indicador, fosfatasa alcalina embrionaria secretada (SEAP), bajo el control del promotor de ISG54. La ISG54 es una conocida ISG activada a través de un mecanismo dependiente de la ISRE por los IFN de tipo I. Tras la estimulación con IFN-alfa o IFNβ, las células HEK-Blue™ IFN-alfa/β activan la vía JAK-STAT y, a continuación, la expresión del gen reportero SEAP. SEAP se secreta en los medios y se puede cuantificar mediante el uso del reactivo colorimétrico QUANTI-Blue™. En resumen, las células HEK-Blue IFN-alfa/β (Invivogen, San Diego CA cat n.º hkb-ifnab) se descongelaron y cultivaron en medios DMEM (Mediatech, Manassas VA, cat n.º 10-013-CV) + FBS al 10 % (Hyclone, Logan UT, cat n.º SH30070.03) que habían sido inactivados por calor (HI FBS). Cuando las células alcanzaron 60-80 % de confluencia, se levantaron con Cell Stripper (Mediatech, cat n.º 25-056-CI). Las células se lavaron dos veces en DMEM + HI FBS y se contaron. Las células se ajustaron a $3,3 \times 10^5$ células viables/ml en DMEM + HI FBS y se distribuyeron 150 µl en alícuotas por pocillo en una placa de cultivo tisular de 96 pocillos de fondo plano (en adelante en la presente memoria, la "placa experimental"). Después, se añadieron 50 µl de IFN-alfa2b o construcción de proteína de fusión, diluida en DMEM + HI FBS, por pocillo. La placa se incubó a 37 °C, CO₂ al 5 % durante 16-24 horas. QUANTI-Blue (Invivogen, cat n.º rep-qb1) se preparó según las instrucciones del fabricante. QUANTI-Blue (150 µl) se dividió en alícuotas en cada pocillo de una placa de fondo plano (en lo sucesivo en el presente documento, la "placa de ensayo"). Después, se transfirieron 50 µl de sobrenadante por pocillo de la placa experimental a la placa de ensayo. La placa de ensayo se incubó a 37 °C durante 1-3 horas. La absorbancia de la placa de ensayo a 630 nm se leyó en un contador de múltiples marcadores modelo 1420-41 Victor 3V de Perkin-Elmer. Los datos se analizaron usando Graph Pad Prism.

Modelo de xenoinjerto H929

El efecto de diferentes dosis de las construcciones de proteína de fusión de IFN-alfa atenuado-anti-CD38 A10.38 y A10.0, se comparó con la construcción de proteína de fusión no dirigida a CD38, en el crecimiento tumoral de mieloma. Para estas comparaciones, se usó el modelo de mieloma múltiple NCI-H929 s.c.

La línea celular de mieloma múltiple, NCI-H929 (ATCC CRL-9068, Gazdar, Blood 67: 1542-1549, 1986) se cultiva por vía subcutánea en ratones inmunodeprimidos (SCID).

Se inyectaron por vía subcutánea en el costado de ratones CB.17 SCID de ocho a doce semanas de edad 1×10^7 células tumorales NCI-H929 en Matrigel™ al 50 %. Cuando el tamaño promedio del tumor alcanzó 170-350 mm³, los ratones se agruparon en 4 cohortes de 7 ratones cada una y el tratamiento comenzó en el momento cero (T0). Todos los tratamientos se administraron mediante inyección intraperitoneal, (i.p.) dos veces por semana durante 3 semanas (indicado por la barra debajo del gráfico). Todos los compuestos se dosificaron a 100 µg/dosis (aproximadamente 4,5 mg/kg) excepto el grupo de vehículo. El volumen tumoral se midió dos veces por semana mediante medición por calibrador. El punto final fue un volumen tumoral de 2.000 mm³.

El efecto de diferentes dosis del A02. Las construcciones de proteína de fusión de IFN-alfa atenuado-anti-CD38 A02.6, A10.0 y A10.38, se compararon con el vehículo, en el crecimiento tumoral de mieloma. Para estas comparaciones, se usó el modelo de mieloma múltiple NCI-H929 s.c.

La línea celular de mieloma múltiple, NCI-H929 (ATCC CRL-9068, Gazdar, Blood 67: 1542-1549, 1986) se cultiva por vía subcutánea en ratones inmunodeprimidos (SCID).

Se inyectaron por vía subcutánea en el costado de ratones CB.17 SCID de ocho a doce semanas de edad 1×10^7 células tumorales NCI-H929 en Matrigel™ al 50 %. Cuando el tamaño promedio del tumor alcanza 90 mm³, los ratones se agruparán en 4 cohortes de 5 ratones cada una y el tratamiento comenzará en el momento cero (T0). Todos los tratamientos se administrarán mediante inyección intraperitoneal, (i.p.) dos veces por semana durante 3 semanas (indicado por la barra debajo del gráfico). Todos los compuestos se dosificarán a 100 µg/dosis (aproximadamente 4,5 mg/kg) excepto el grupo de vehículo. El volumen tumoral se medirá dos veces por semana mediante medición por calibrador.

Ejemplo de referencia 5**Proteína de fusión de anti-CD38-IFN atenuado con región constante alternativa**

5 A02.12 comprende una proteína de fusión de anti-CD38-IFN atenuado en la que la región constante de la proteína es IgG4 HC-L0-IFN-alfa (A145D) (SEC ID NO: 9). La región variable de cadena pesada de este anticuerpo se volvió a formatear en una región constante de IgG1 fusionada con IFN-alfa2b atenuado A145D (SEC ID NO: 10). La coexpresión de esta cadena pesada con la cadena ligera de X02.107 (SEC ID NO: 65) en células HEK293E produjo el anticuerpo A02.112. La comparación de los anticuerpos A02.12 y A02.112 usando ensayos de unión a CD38 basados en citometría de flujo y ensayos de potencia demuestra que también puede usarse otras regiones constantes de anticuerpos, tales como IgG1 humana, lo que da como resultado proteínas de fusión de anticuerpo-IFN atenuado con potente actividad biológica equivalente a las generadas usando una región constante IgG4 humana (tabla 16b).

Tabla 16b

Proteína de fusión de anti-CD38-IFN atenuado	Unión de flujo (CE50 en µg/ml)	Ensayo de anexina V (factor de cambio en relación con células no tratadas)	Ensayo de caspasa (factor de cambio en relación con células no tratadas)	Ensayo de proliferación celular CI ₅₀ (pM)	Figuras
A02.12	3,40*	1,40	2,70	23,66	Fig. 21
A02.112	<0,3*	3,14	3,74	N/T	Fig. 21

*El anticuerpo se probó en un ensayo de unión de flujo frente a la línea celular H929. El valor señalado es la CE₅₀ en µg/ml. El ensayo de anexina V se refiere a células teñidas positivamente con anexina V-FITC después de 24 h de tratamiento con construcciones de anticuerpos a 20 nM. El ensayo de caspasa se refiere a la activación de células por caspasa después de 24 h de tratamiento con construcciones de anticuerpos a 20 nM. N/T - No probado.

10 Ejemplo de referencia 6**Humanización de regiones variables de R5D1, R5E8 y R10A2**

15 Los anticuerpos anti-CD38 procedentes de rata R5D1, R5E8 y R10A2 se describen en el documento PCT/AU2012/001323 y se seleccionaron para humanización. Las regiones variables de estos anticuerpos se sobrehumanizaron como se describe en la publicación de los Estados Unidos No.: 2003-0039649. En resumen, se asignaron estructuras canónicas a cada cadena pesada y ligera de roedores mediante la inspección de sus secuencias de aminoácidos respectivas. A R10A2 se le asignó la estructura canónica 2-1-1/1-2 (V_L/V_H), A R5E8 se le asignó la estructura canónica 4-1-1/1-2 y a R5D1 se le asignó la estructura canónica 2-1-1/1-2. Se usaron secuencias de línea germinal humana de la misma estructura canónica como marcos conservados aceptores para el injerto de CDR donantes. También se diseñaron variantes de los genes de anticuerpos sobrehumanizados resultantes que contienen sustituciones de aminoácidos en posiciones dentro de sus secuencias consideradas probablemente importantes para el mantenimiento de su actividad de unión. Las diferentes regiones variables sobrehumanizadas de cadena pesada se muestran en la figura 7. Las diferentes regiones variables sobrehumanizadas de cadena ligera se muestran en la figura 8.

25 Las secuencias de región variable de cadena pesada se subclonaron en el vector pEE6.4 que contiene una región constante de IgG4 humana que posee la sustitución S228P fusionada con IFN-alfa2b atenuado A145D (SEC ID NO: 9). Se subclonaron regiones variables de cadena ligera en el vector pEE12.4 que contiene una región constante kappa humana (SEC ID NO: 5). Los anticuerpos se produjeron mediante la coexpresión de cadenas pesadas en pEE6.4 y cadenas ligeras en pEE12.4 en células CHO como se ha descrito anteriormente. La tabla 17 resume los emparejamientos de cadenas pesadas y ligeras usados para producir cada proteína sobrehumanizada basada en 5D1. La tabla 18 detalla los emparejamientos de cadenas pesadas y ligeras para la proteína sobrehumanizada basada en 5E8 generada, mientras que los emparejamientos de cadenas pesadas y ligeras usados para generar proteínas sobrehumanizadas basadas en 10A2 se proporcionan en la tabla 19. Se llevó a cabo la clasificación de una vez por constante de disociación en equilibrio (K_D) de los anticuerpos sobrehumanizados por medio de análisis BIAcore™ de los sobrenadantes de transfección de CHO resultantes. El procedimiento se usó para determinar si los anticuerpos se expresaban (captura de proteína A) y tenían un nivel de actividad de unión con CD38 humano.

Tabla 17

Proteína de fusión de anti-CD38-IFN atenuado	Variable pesada SEC ID NO:	Variable ligera SEC ID NO:	K _D (M)	Captura de proteína A (UR)
A5D1.0 (quimérico)	114	125	2,28 x 10 ⁻⁹	N/D

ES 2 938 708 T3

A5D1.1	115	126	$2,95 \times 10^{-8}$	175
A5D1.2	115	127	$2,95 \times 10^{-8}$	289
A5D1.3	115	128	$2,35 \times 10^{-8}$	248
A5D1.4	115	129	$2,85 \times 10^{-8}$	427
A5D1.5	115	130	$1,84 \times 10^{-7}$	269
A5D1.6	115	131	$2,32 \times 10^{-8}$	338
A5D1.7	116	126	$1,05 \times 10^{-8}$	132
A5D1.8	116	127	$6,80 \times 10^{-9}$	263
A5D1.9	116	128	$9,93 \times 10^{-8}$	128
A5D1.10	116	129	$5,69 \times 10^{-9}$	358
A5D1.11	116	130	$1,64 \times 10^{-8}$	250
A5D1.12	116	131	$5,61 \times 10^{-9}$	345
A5D1.13	117	126	$1,44 \times 10^{-8}$	213
A5D1.14	117	127	$1,52 \times 10^{-8}$	344
A5D1.15	117	128	$1,46 \times 10^{-8}$	167
A5D1.16	117	129	$1,37 \times 10^{-8}$	524
A5D1.17	117	130	$3,28 \times 10^{-8}$	410
A5D1.18	117	131	$1,01 \times 10^{-8}$	396
A5D1.19	118	126	$1,01 \times 10^{-8}$	245
A5D1.20	118	127	$1,07 \times 10^{-8}$	282
A5D1.21	118	128	$7,94 \times 10^{-9}$	351
A5D1.22	118	129	$8,97 \times 10^{-9}$	566
A5D1.23	118	130	$2,14 \times 10^{-8}$	336
A5D1.24	118	131	$8,01 \times 10^{-9}$	319
A5D1.25	119	126	NSU	165
A5D1.26	119	127	NSU	286
A5D1.27	119	128	NSU	265
A5D1.28	119	129	NSU	493
A5D1.29	119	130	NSU	275
A5D1.30	119	131	NSU	263
A5D1.31	120	126	$1,05 \times 10^{-7}$	206
A5D1.32	120	127	$1,20 \times 10^{-7}$	318
A5D1.33	120	128	$9,83 \times 10^{-8}$	176
A5D1.34	120	129	$1,06 \times 10^{-7}$	497
A5D1.35	120	130	$6,07 \times 10^{-7}$	211

ES 2 938 708 T3

A5D1.36	120	131	$8,58 \times 10^{-8}$	331
A5D1.37	121	126	$1,01 \times 10^{-7}$	184
A5D1.38	121	127	$1,21 \times 10^{-7}$	315
A5D1.39	121	128	$9,55 \times 10^{-8}$	191
A5D1.40	121	129	$1,22 \times 10^{-7}$	460
A5D1.41	121	130	$5,60 \times 10^{-7}$	409
A5D1.42	121	131	$8,54 \times 10^{-8}$	301
A5D1.43	122	126	$1,78 \times 10^{-8}$	150
A5D1.44	122	127	$1,76 \times 10^{-8}$	226
A5D1.45	122	128	$1,42 \times 10^{-8}$	177
A5D1.46	122	129	$1,51 \times 10^{-8}$	401
A5D1.47	122	130	$1,89 \times 10^{-8}$	364
A5D1.48	122	131	$1,20 \times 10^{-8}$	273
A5D1.49	123	126	$6,32 \times 10^{-9}$	141
A5D1.50	123	127	$5,64 \times 10^{-9}$	212
A5D1.51	123	128	$4,97 \times 10^{-9}$	188
A5D1.52	123	129	$4,07 \times 10^{-9}$	493
A5D1.53	123	130	$6,98 \times 10^{-9}$	561
A5D1.54	123	131	$4,49 \times 10^{-9}$	253
A5D1.55	124	126	$6,48 \times 10^{-9}$	203
A5D1.56	124	127	$8,44 \times 10^{-9}$	144
A5D1.57	124	128	$5,59 \times 10^{-9}$	233
A5D1.58	124	129	$5,37 \times 10^{-9}$	376
A5D1.59	124	130	$1,05 \times 10^{-8}$	313
A5D1.60	124	131	$4,57 \times 10^{-9}$	429
NSU - no se unió. N/D - no disponible.				

Tabla 18

Proteína de fusión de anti-CD38-IFN atenuado	Variable pesada SEC ID NO:	Variable ligera SEC ID NO:	K _D (M)	Captura de proteína A (UR)
A5E8.0 (quimérico)	132	143	$5,50 \times 10^{-9}$	N/D
A5E8.1	133	144	$2,31 \times 10^{-7}$	267
A5E8.2	133	145	$2,37 \times 10^{-7}$	459
A5E8.3	133	146	$3,59 \times 10^{-7}$	281
A5E8.4	133	147	NSU	420
A5E8.5	134	144	$1,75 \times 10^{-7}$	172

ES 2 938 708 T3

A5E8.6	134	145	$1,57 \times 10^{-7}$	611
A5E8.7	134	146	$2,58 \times 10^{-7}$	201
A5E8.8	134	147	$8,09 \times 10^{-7}$	308
A5E8.9	135	144	$1,05 \times 10^{-8}$	153
A5E8.10	135	145	$2,13 \times 10^{-8}$	503
A5E8.11	135	146	$2,69 \times 10^{-8}$	372
A5E8.12	135	147	NSU	212
A5E8.13	136	144	$3,98 \times 10^{-8}$	301
A5E8.14	136	145	$1,26 \times 10^{-7}$	543
A5E8.15	136	146	$1,39 \times 10^{-7}$	504
A5E8.16	136	147	NSU	284
A5E8.17	137	144	$2,76 \times 10^{-8}$	397
A5E8.18	137	145	$8,81 \times 10^{-8}$	430
A5E8.19	137	146	$1,09 \times 10^{-7}$	220
A5E8.20	137	147	NSU	397
A5E8.21	138	144	NSU	277
A5E8.22	138	145	NSU	409
A5E8.23	138	146	NSU	339
A5E8.24	138	147	NSU	266
A5E8.25	139	144	NSU	283
A5E8.26	139	145	NSU	395
A5E8.27	139	146	NSU	277
A5E8.28	139	147	NSU	290
A5E8.29	140	144	$3,91 \times 10^{-8}$	207
A5E8.30	140	145	$5,00 \times 10^{-8}$	255
A5E8.31	140	146	$6,61 \times 10^{-8}$	267
A5E8.32	140	147	NSU	42
A5E8.33	141	144	$1,12 \times 10^{-8}$	134
A5E8.34	141	145	$1,63 \times 10^{-8}$	301
A5E8.35	141	146	$1,85 \times 10^{-8}$	177
A5E8.36	141	147	NSU	10
A5E8.37	142	144	$8,19 \times 10^{-8}$	200
A5E8.38	142	145	$1,55 \times 10^{-8}$	328
A5E8.39	142	146	$1,74 \times 10^{-8}$	232
A5E8.40	142	147	NSU	126

NSU - no se unió. N/D - no disponible.

Tabla 19

Proteína de fusión de anti-CD38-IFN atenuado	SEC ID: Variable Pesado	SEC ID: Luz variable	K _D (M)	Captura de proteína A (UR)
A10A2.0 (quimérico)	148	157	5,98 x 10 ⁻¹⁰	N/D
A10A2.1	149	158	NSU	728
A10A2.2	149	159	NSU	689
A10A2.3	149	160	NSU	850
A10A2.4	149	161	NSU	996
A10A2.5	149	162	NSU	761
A10A2.6	149	163	NSU	890
A10A2.7	149	164	NSU	725
A10A2.8	150	158	7,18 x 10 ⁻⁷	718
A10A2.9	150	159	6,62 x 10 ⁻⁷	627
A10A2.10	150	160	9,13 x 10 ⁻⁷	850
A10A2.11	150	161	2,37 x 10 ⁻⁷	956
A10A2.12	150	162	1,18 x 10 ⁻⁶	864
A10A2.13	150	163	6,80 x 10 ⁻⁷	765
A10A2.14	150	164	NSU	645
A10A2.15	151	158	1,15 x 10 ⁻⁷	488
A10A2.16	151	159	8,11 x 10 ⁻⁸	759
A10A2.17	151	160	1,84 x 10 ⁻⁷	684
A10A2.18	151	161	3,39 x 10 ⁻⁸	907
A10A2.19	151	162	1,84 x 10 ⁻⁷	831
A10A2.20	151	163	1,23 x 10 ⁻⁷	560
A10A2.21	151	164	NSU	337
A10A2.22	152	158	2,70 x 10 ⁻⁹	890
A10A2.23	152	159	2,17 x 10 ⁻⁹	828
A10A2.24	152	160	3,04 x 10 ⁻⁹	803
A10A2.25	152	161	1,51x 10 ⁻⁹	1054
A10A2.26	152	162	3,51x 10 ⁻⁹	741
A10A2.27	152	163	2,42 x 10 ⁻⁹	603
A10A2.28	152	164	3,69 x 10 ⁻⁸	384
A10A2.29	153	158	2,77 x 10 ⁻⁸	93
A10A2.30	153	159	2,15 x 10 ⁻⁸	86

ES 2 938 708 T3

A10A2.31	153	160	$5,82 \times 10^{-8}$	33
A10A2.32	153	161	$8,49 \times 10^{-9}$	169
A10A2.33	153	162	$5,66 \times 10^{-8}$	62
A10A2.34	153	163	$3,88 \times 10^{-8}$	56
A10A2.35	153	164	NSU	NSE
A10A2.36	154	158	$8,38 \times 10^{-9}$	221
A10A2.37	154	159	$1,39 \times 10^{-9}$	858
A10A2.38	154	160	$1,08 \times 10^{-8}$	178
A10A2.39	154	161	$3,80 \times 10^{-9}$	357
A10A2.40	154	162	$1,34 \times 10^{-8}$	217
A10A2.41	154	163	$8,73 \times 10^{-9}$	202
A10A2.42	154	164	$2,09 \times 10^{-7}$	175
A10A2.43	154	158	$2,45 \times 10^{-7}$	621
A10A2.44	155	159	$6,23 \times 10^{-9}$	220
A10A2.45	155	160	$2,84 \times 10^{-7}$	881
A10A2.46	155	161	$1,39 \times 10^{-7}$	1000
A10A2.47	155	162	$3,28 \times 10^{-7}$	9
A10A2.48	155	163	$2,52 \times 10^{-7}$	565
A10A2.49	155	164	NSU	499
A10A2.50	156	158	$1,61 \times 10^{-9}$	567
A10A2.51	156	159	$2,00 \times 10^{-7}$	603
A10A2.52	156	160	$1,69 \times 10^{-9}$	723
A10A2.53	156	161	$1,20 \times 10^{-9}$	729
A10A2.54	156	162	$1,92 \times 10^{-9}$	639
A10A2.55	156	163	$1,47 \times 10^{-9}$	692
A10A2.56	156	164	$1,97 \times 10^{-7}$	383
NSU - no se unió. NSE - no se expresó.				

Para cada familia de anticuerpos humanizados - 5D1, 5E8 y 10A2 - varias combinaciones de cadenas pesadas y ligeras humanizadas no lograron expresar proteína ni unirse con CD38 humano. Un número considerable de anticuerpos en las 3 familias de anticuerpos humanizados expresados y unidos con CD38 humano con constantes de disociación en equilibrio en el intervalo nanomolar (nM). A10A2.53 y A10A2.25, que comparten una cadena ligera común, se eligieron para optimización adicional. A10A2.53 se renombró A10.0 y A10A2.25 se renombró A10.38.

Ejemplo 2

Variantes mejoradas de A10.0

El anticuerpo A10.0 se optimizó por medio de alteraciones en las secuencias variables de cadena pesada y/o ligera con el objetivo de producir un efecto positivo en la inmunogenicidad biofísica y por ordenador del anticuerpo provocando al mismo tiempo un impacto mínimo en la actividad funcional del anticuerpo.

Análisis de inmunogenicidad por ordenador de cadenas pesadas y ligeras A10.0

Se llevaron a cabo análisis de inmunogenicidad por ordenador de las regiones variables de cadena pesada y ligera A10.0 mediante el uso del paquete de software Epibase. Se introdujeron varias sustituciones de aminoácidos en las regiones variables de cadena pesada y ligera de A10.0 para eliminar posibles epítomos inmunogénicos. Una alineación de secuencias de aminoácidos de las variantes de región variable de cadena pesada producidas alineadas con la cadena pesada humanizada (SEC ID NO: 156) se muestra en la Figura 9. Una alineación de secuencias de aminoácidos de las variantes de región variable de cadena ligera alineadas con la cadena ligera humanizada (SEC ID NO: 161) se muestra en la Figura 10. Los detalles de las variantes de cadenas pesada y ligera coexpresadas en células HEK293E para producir proteínas se resumen en la tabla 20.

5

Tabla 20

Proteína de fusión de anti-CD38-IFN atenuado	Sustitución de aminoácidos de VH (en relación con A10.0)	Variable pesada SEC ID NO:	Sustitución de aminoácidos de VK (en relación con A10.0)	Variable ligera SEC ID NO:
A10.1	A40E	165	N/D	161
A10.2	A40G	166	N/D	161
A10.3	A40H	167	N/D	161
A10.4	A40Q	168	N/D	161
A10.5	A40S	169	N/D	161
A10.6	A40V	170	N/D	161
A10.7	N35E	171	N/D	161
A10.8	N35P	172	N/D	161
A10.9	N35Q	173	N/D	161
A10.10	N35S	174	N/D	161
A10.11	R94E	175	N/D	161
A10.12	R94G	176	N/D	161
A10.13	R94P	177	N/D	161
A10.14	R94T	178	N/D	161
A10.15	K96G	179	N/D	161
A10.16	K96T	180	N/D	161
A10.17	N/D	156	K24E	181
A10.18	N/D	156	K24G	182
A10.19	N/D	156	K24P	183
A10.20	N/D	156	K24Q	184
A10.21	N/D	156	R54D	185
A10.22	N/D	156	I48D	186
A10.23	N/D	156	Y49E	187
A10.24	N/D	156	M89A	188
A10.25	N/D	156	M89E	189
A10.26	N/D	156	M89H	190

10

ES 2 938 708 T3

A10.27	N/D	156	M89K	191
A10.28	N/D	156	M89P	192
A10.29	N/D	156	M89Q	193
A10.30	N/D	156	M89S	194
A10.31	N/D	156	M89V	195
A10.32	N/D	156	Q90D	196

Se evaluó el nivel de expresión de proteínas y la unión con CD38 a través de RPS para cada anticuerpo generado mediante el uso de los emparejamientos de cadenas pesadas y ligeras descritos en la Tabla 20. Asimismo, se realizaron ensayos de potencia usando sobrenadantes de cultivo celular para evaluar la actividad funcional relativa de cada una de estas proteínas de fusión de anticuerpo anti-CD38-IFN atenuado, tabla 21.

Tabla 21

Proteína de fusión de anti-CD38-IFN atenuado	HPLC de proteína A (mg/l)	Unión a CD38 por medio de RPS (UR) a 350 s*	Ensayo de anexina V (factor de cambio en relación con células no tratadas)	Ensayo de caspasa (factor de cambio en relación con células no tratadas)	Ensayo de proliferación celular (CI ₅₀ pM)
A10.1	16,9	1824	1,66	3,41	4078
A10.2	16,7	1821	1,66	5,19	7622
A10.3	25,0	2166	1,63	5,46	2148
A10.4	23,7	2169	1,63	5,78	4108
A10.5	28,0	2240	1,64	5,80	3046
A10.6	31,0	2097	1,57	5,76	2283
A10.7	26,5	NSU	1,18	1,09	Sin CI ₅₀
A10.8	2,4	NSU	N/T	N/T	N/T
A10.9	18,3	176	1,48	2,07	Sin CI ₅₀
A10.10	32,2	1072	1,57	4,97	18870
A10.11	28,3	98	1,57	3,64	Sin CI ₅₀
A10.12	30,7	NSU	1,22	1,99	Sin CI ₅₀
A10.13	30,6	123	1,31	2,67	Sin CI ₅₀
A10.14	30,5	247	1,19	5,11	68270
A10.15	41,8	1254	1,52	5,44	5169
A10.16	24,2	1210	1,70	4,57	5224
A10.17	18,2	1686	1,79	6,11	3054
A10.18	32,5	2457	1,89	6,16	2178
A10.19	1,6	NSU	1,73	2,39	Sin CI ₅₀
A10.20	12,2	1355	4,65	7,72	564
A10.21	19,9	1837	1,84	5,56	5330

ES 2 938 708 T3

A10.22	5,5	480	N/T	N/T	N/T
A10.23	20,6	255	1,71	3,85	59720
A10.24	34,6	1943	4,14	6,75	399
A10.25	28,3	1778	1,87	6,09	4910
A10.26	5,7	706	N/T	N/T	N/T
A10.27	7,4	136	N/T	N/T	N/T
A10.28	2,2	48	N/T	N/T	N/T
A10.29	10,9	1443	N/T	N/T	Sin CI ₅₀
A10.30	25,4	1865	1,98	6,21	1438
A10.31	5,8	469	N/T	N/T	N/T
A10.32	34,5	615	3,80	6,97	3628

La unión de CD38 por RPS se refiere a la cantidad de CD38 que permanece unida a la superficie después de 350 segundos de la fase de disociación. El ensayo de anexina V se refiere a células teñidas positivamente por anexina V-FITC después de 24 h de tratamiento con construcciones de anticuerpos a 20 nM. El ensayo de caspasa se refiere a la activación de células por caspasa después de 24 h de tratamiento con construcciones de anticuerpos a 20 nM. NSU - no se unió; N/T- no probado; Sin CI₅₀ - potencia insuficiente para un valor de CI₅₀.

Los análisis de las secuencias de aminoácidos de las secuencias variables de cadena pesada y ligera de A10.0 identificaron varios posibles sitios de desamidación y un posible sitio de oxidación. Se preparó la sustitución de cadena pesada variable N98Q para eliminar un sitio de desamidación de CDR3 de la cadena pesada, SEC ID NO: 197. Se generó una variante adicional de la cadena ligera variable A10.0 que contenía la sustitución de CDR2 N53Q (SEC ID NO: 198) para eliminar este supuesto sitio de desamidación. M89 dentro de CDR3 de la cadena ligera también se alteró mediante sustituciones de aminoácidos en esta posición con los objetivos combinados de eliminar este posible sitio de oxidación y reducir la inmunogenicidad predicha de esta región de la cadena ligera. Estas sustituciones se resumen en la tabla 22, junto con los emparejamientos de cadenas pesada y ligera coexpresados para producir cada proteína de fusión de anti-CD38-IFN atenuado.

Tabla 22

Proteína de fusión de anti-CD38-IFN atenuado	Sustitución de aminoácidos (en relación con A10.0)	Variable pesada SEC ID NO:	Variable ligera SEC ID NO:
A10.35	Cadena pesada N(98)Q	197	161
A10.36	Cadena ligera N(53)Q	156	198

Se evaluó el nivel de expresión de proteínas y la unión con CD38 a través de RPS para cada anticuerpo generado mediante el uso de los emparejamientos de cadenas pesadas y ligeras descritos en la Tabla 22. Asimismo, se realizaron ensayos de potencia usando sobrenadantes de cultivo celular para evaluar la actividad funcional relativa de cada una de estas proteínas de fusión de anticuerpo anti-CD38-IFN atenuado, mostrados en la tabla 23.

Tabla 23

Proteína de fusión de anti-CD38-IFN atenuado	HPLC de proteína A (mg/l)	Unión a CD38 por medio de RPS (UR) a 350 s*	Ensayo de anexina V (factor de cambio en relación con células no tratadas)	Ensayo de caspasa (factor de cambio en relación con células no tratadas)	Ensayo de proliferación celular CI ₅₀ (pM)
A10.35	34,5	1889	1,83	6,16	6241
A10.36	52,4	1895	3,95	5,90	534,9

La unión de CD38 por RPS se refiere a la cantidad de CD38 que permanece unida a la superficie después de 350 segundos de la fase de disociación. El ensayo de anexina V se refiere a células teñidas positivamente por

anexina V-FITC después de 24 h de tratamiento con construcciones de anticuerpos a 20 nM. El ensayo de caspasa se refiere a la activación de células por caspasa después de 24 h de tratamiento con construcciones de anticuerpos a 20 nM.

Ejemplo 3

Generación de variantes mejoradas de A10.38

5 A10.0 y A10.38 que comparten una cadena ligera común. Las secuencias de cadena ligera optimizadas de A10.0 se emparejaron con la cadena pesada del anticuerpo A10.38 con el objetivo de producir un efecto positivo en las propiedades de inmunogenicidad biofísica y por ordenador teniendo al mismo tiempo un impacto mínimo en la actividad funcional. Se describe un resumen de los cambios y los emparejamientos de cadenas pesadas y ligeras en la tabla 24.

Tabla 24

Proteína de fusión de anti-CD38-IFN atenuado	SEC ID: Variable Pesado	Sustitución de aminoácidos de VK (en relación con A10.38)	SEC ID: Luz variable
A10.38	152	N/D	161
A10.39	152	K24E	181
A10.40	152	K24G	182
A10.41	152	K24P	183
A10.42	152	K24Q	184
A10.43	152	R54D	185
A10.44	152	I48D	186
A10.45	152	Y49E	187
A10.46	152	M89A	188
A10.47	152	M89E	189
A10.48	152	M89H	190
A10.49	152	M89K	191
A10.50	152	M89P	192
A10.51	152	M89Q	193
A10.52	152	M89S	194
A10.53	152	M89V	195
A10.54	152	Q90D	196
A10.57	152	N53Q	198

10 Cada uno de los anticuerpos anteriores se evaluó para determinar el nivel de expresión de proteínas y la unión con CD38 a través de RPS. Se realizaron ensayos de potencia usando sobrenadantes de cultivo celular para evaluar la actividad funcional relativa de cada una de estas proteínas de fusión de anticuerpo anti-CD38-IFN atenuado, tabla 25.

Tabla 25

Proteína de fusión de anti-CD38-IFN atenuado	HPLC de proteína A (mg/l)	Unión a CD38 por medio de RPS (UR) a 350 s*	Ensayo de anexina V (factor de cambio en relación con células no tratadas)	Ensayo de caspasa (factor de cambio en relación con células no tratadas)
A10.38	119,7	1540	3,22	5,17

ES 2 938 708 T3

A10.39	113,4	1444	3,39	4,79
A10.40	117,8	1562	3,28	5,12
A10.41	89,7	1459	3,27	5,12
A10.42	111,7	1443	3,32	5,60
A10.43	94,1	1426	3,21	6,15
A10.44	51,9	969	3,08	5,66
A10.45	111,7	333	2,76	5,01
A10.46	120,0	1547	3,24	4,80
A10.47	107,3	1337	3,45	4,25
A10.48	45,5	865	3,06	5,48
A10.49	55,8	213	3,46	7,63
A10.50	11,3	172	2,96	5,61
A10.51	51,6	1320	2,34	6,16
A10.52	70,0	1512	3,21	5,62
A10.53	40,0	536	3,46	4,68
A10.54	61,3	583	3,10	6,20
A10.57	67,1	1431	3,06	6,04

La unión de CD38 por RPS se refiere a la cantidad de CD38 que permanece unida a la superficie después de 350 segundos de la fase de disociación. El ensayo de anexina V se refiere a células teñidas positivamente por anexina V-FITC después de 24 h de tratamiento con construcciones de anticuerpos a 20 nM. El ensayo de caspasa se refiere a la activación de células por caspasa después de 24 h de tratamiento con construcciones de anticuerpos a 20 nM. N/T - No probado.

Se requiere IFN atenuado para potente activación apoptótica y de caspasa en líneas celulares tumorales

La potencia relativa de los anticuerpos anti-CD38 A10.0 (fusión de IFN atenuado) y X10.0 (sin fusión) se comparó mediante el uso de los ensayos de anexina V, caspasa y proliferación celular descritos en el Ejemplo 1. También se comparó la potencia relativa de A10.38 y X10.38, tabla 26.

5

Tabla 26

Proteína de fusión de anti-CD38-IFN atenuado	Ensayo de anexina V (factor de cambio en relación con células no tratadas)	Ensayo de caspasa (factor de cambio en relación con células no tratadas)	Ensayo de proliferación celular CI₅₀ (pM)	Figuras
A10.0	2,10	4,23	2081	Fig. 18
X10.0	1,27	1,70	Sin CI ₅₀	Fig. 18
A10.38	3,22	5,17	1118	Fig. 25
X10.38	1,46	2,09	Sin CI ₅₀	Fig. 25

El ensayo de anexina V se refiere a células teñidas positivamente por anexina V-FITC después de 24 h de tratamiento con construcciones de anticuerpos a 20 nM. El ensayo de caspasa se refiere a la activación de células por caspasa después de 24 h de tratamiento con construcciones de anticuerpos a 20 nM.

Estos datos demuestran que la potente actividad apoptótica presentada por los anticuerpos A10.0 y A10.38 en relación con X10.0 y X10.38, respectivamente, requiere la presencia de la fusión de IFN atenuado. No se observó actividad

antiproliferativa con anticuerpos sin un IFN atenuado.

En la Figura 11 se muestra una alineación de secuencias consenso de regiones variables de cadena pesada de proteínas con actividad funcional. En la figura 12 se muestra una alineación de secuencias consenso de regiones variables de cadena ligera de proteínas con actividad funcional. Se podría prever además que podrían realizarse combinaciones de sustituciones tales como las descritas para los anticuerpos anti-CD38 X10.60, X10.61, X10.62, X10.63, X10.64, X10.65, X10.66, X10.67, X10.68, X10.69, X10.70, X10.71, X10.72, X10.73, X10.74, X10.75, X10.76, X10.77, X10.78, X10.79, X10.80, X10.81, X10.82, X10.83, X10.84, X10.85, X10.86, X10.87, X10.88, X10.89, X10.90, X10.91, X10.92, X10.93, X10.94, X10.95, X10.96, X10.97, X10.98, X10.99, X10.100, X10.101, X10.102, X10.103, X10.104, X10.105, X10.106, X10.107, X10.108, X10.109, X10.110, X10.111, X10.112, X10.113, X10.114, X10.115, X10.116, X10.117, X10.118, X10.119, X10.120, X10.121, X10.122, X10.123, X10.124, X10.125, X10.126, X10.127, X10.128, X10.129, X10.130, X10.131, X10.132, X10.133, X10.134, X10.135, X10.136, X10.137, X10.138, X10.139, X10.140, X10.141, X10.142, X10.143, X10.144, X10.145, X10.146, X10.147 (figura 11, figura 12). Además, los anticuerpos anti-CD38 anteriores también podrían construirse como proteínas de fusión de anti-CD38-IFN atenuado y probarse para determinar la actividad funcional como se describe en el presente documento.

15 *Modelo de xenoinjerto de mieloma múltiple H929*

La potencia *in vivo* de las variantes de 10A2 A10.0 y A10A2.0 se evaluó en un modelo de mieloma múltiple de ratón NCI-H929 s.c., Figura 27. Se mostró que ambos tenían potente actividad antitumoral en este modelo. Dicho modelo podría usarse para probar la actividad antitumoral de otras construcciones de proteínas descritas en este documento.

Actividad fuera de diana para las variantes de 10A2

20 La actividad fuera de diana de las variantes de 10A2 A10.0, A10.38, A10A2.37 y A10A2.39 en comparación con el anticuerpo quimérico A10A2.0 original fusionado con interferón 145D de tipo silvestre y atenuado se evaluó en el ensayo de gen indicador iLite y/o el ensayo HEK Blue y se muestra en la Figura 28 y la Figura 29. Los valores de CE_{50} se proporcionan en la figura 28 y la figura 29. La actividad fuera de diana confirma la atenuación del interferón y la necesidad de que el anticuerpo se dirija a CD38 para restaurar la función.

25 *Datos de potencia in vitro adicionales para A10.0 y construcciones relacionadas*

Una selección de las proteínas de fusión de anti-CD38-IFN atenuado anteriores se purificó y analizó para determinar la unión con células positivas para CD38 en ensayos basados en células. Además, se repitieron ensayos de potencia para determinar de manera más precisa la actividad relativa de cada una de estas proteínas de fusión de anti-CD38-IFN atenuado. Los procedimientos para estos diversos ensayos se describen en el ejemplo 1. Los resultados de cada uno de estos ensayos se proporcionan en la tabla 27.

Tabla 27

Proteína de fusión de anti-CD38-IFN atenuado	Unión de flujo de H929 (CE_{50} en mg/ml)	Ensayo de anexina V (factor de cambio en relación con células no tratadas)	Ensayo de caspasa (factor de cambio en relación con células no tratadas)	Ensayo de proliferación celular CI_{50} (pM)	Figuras
A10.0	1,49	3,05	1,38	120,8	17, 18, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29
A10.1	1,03	1,34	4,63	63,6	24, 25
A10.2	0,57	1,37	4,37	45,6	24, 25
A10.3	0,55	1,43	5,52	65,8	24, 25
A10.5	0,48	3,27	1,61	53,79	24, 25
A10.6	0,35	3,16	1,66	98,85	24, 25
A10.10	6,84	3,02	1,64	1967,00	24, 25
A10.14	2,26	2,46	1,56	2207	22, 24, 25
A10.15	2,06	3,06	2,55	174,4	22, 24, 25

ES 2 938 708 T3

A10.16	1,17	1,35	5,18	49,5	24, 25
A10.18	1,03	2,95	1,70	124,2	22, 24, 25
A10.20	2,11	2,84	1,26	656	24, 25
A10.21	0,78	3,0	1,39	147,3	22, 24, 25
A10.24	0,81	2,95	7,47	87,99	22, 24, 25
A10.25	1,37	2,75	1,38	27,69	24, 25
A10.30	0,88	3,22	1,60	18,73	24, 25
A10.32	51,69	1,93	1,19	381,4	24, 25
A10.35	1,10	2,97	2,05	93,96	22, 24, 25
A10.36	1,53	3,21	3,61	57,83	22, 24, 25
A10.37	18,57	2,53	1,40	163,5	24, 25
A10.38	1,13	3,27	1,53	36,79	23, 24, 25, 26, 29
A10.40	0,99	1,44	5,16	3,02	24, 25
A10.42	1,61	1,58	1,78	155,3	24, 25
A10.43	1,20	1,64	1,79	120,9	24, 25
A10.44	1,65	1,58	1,91	308,6	24, 25
A10.46	0,73	1,84	5,99	2,63	24, 25
A10.47	0,79	1,70	1,53	5,707	24, 25
A10.48	1,72	1,58	1,60	22,33	24, 25
A10.53	1,32	1,56	1,67	56,01	24, 25
A10.54	5,90	1,52	1,43	2008	24, 25
A10.56	2,43	1,84	1,95	141,7	24, 25
A10.57	1,54	1,49	4,71	126,1	24, 25
A10.59	0,89	2,48	2,38	45,75	21, 24, 25
La unión de flujo se determinó en la línea celular H929. El ensayo de anexina V se refiere a células teñidas positivamente por anexina V-FITC después de 24 h de tratamiento con construcciones de anticuerpos a 20 nM. El ensayo de caspasa se refiere a la activación de células por caspasa después de 24 h de tratamiento con construcciones de anticuerpos a 20 nM.					

Proteína de fusión de anti-CD38-IFN atenuado con región constante alternativa

A10.0 comprende una proteína de fusión de anti-CD38-IFN atenuado en la que la región constante de la proteína es IgG4 HC-LO-IFN-alfa (A145D) (SEC ID NO: 9). Usando síntesis génica, la región constante de esta proteína se reemplazó con IgG1 HC-L0-IFN-alfa (A145D) (SEC ID NO: 10), se emparejó con cadena ligera de A10.0 (SEC ID NO: 161) y se le dio la designación A10.59. La proteína se expresó y se descubrió que era potente en ensayos funcionales (tabla 28). Aunque la mayoría de las proteínas probadas en los ejemplos anteriores se construyeron en la región constante de IgG4 humana, estos datos demuestran que también se pueden usar otras regiones constantes de anticuerpos, tales como IgG1 humana, teniendo la construcción de fusión de anticuerpo-IFN atenuado resultante actividad biológica potente equivalente a construcciones que utilizan una región constante de IgG4 humana.

5

10

Tabla 28

Proteína de fusión de anti-	Unión de flujo de H929	Ensayo de anexina V (factor de cambio)	Ensayo de caspasa (factor de cambio)	Ensayo de proliferación	Figuras
CD38-IFN atenuado	(CE ₅₀ en mg/ml)	en relación con células no tratadas)	en relación con células no tratadas)	celular CI ₅₀ (pM)	
A10.0	1,50	3,05	1,89	2081	21, 24, 25
A10.59	0,89	2,48	2,38	328,6	21, 24, 25

El ensayo de anexina V se refiere a células teñidas positivamente por anexina V-FITC después de 24 h de tratamiento con construcciones de anticuerpos a 20 nM. El ensayo de caspasa se refiere a la activación de células por caspasa después de 24 h de tratamiento con construcciones de anticuerpos a 20 nM. N/T es No probado, *Datos obtenidos del ensayo de proliferación celular evaluados con sobrenadante de cultivo celular.

La Tabla 29 enumera el emparejamiento de cadena pesada variable, cadena ligera variable y región constante para cada anticuerpo descrito en el presente documento. La tabla 30 enumera las secuencias usadas en la divulgación. AA se refiere a aminoácido (tipo de secuencia) y ADN se refiere a polinucleótido (tipo de secuencia).

Tabla 29

Nombre del anticuerpo	Variable pesada SEC ID NO: SEC ID NO: ligera variable (aminoácido)	Variable ligera SEC ID NO: SEC ID NO: ligera variable (aminoácido)	Región constante de Cadena Pesada SEC ID NO:(aminoácido) SEC ID NO: ligera variable (aminoácido)
A02.10	19	14	9
A02.11	20	14	9
A02.112	34	65	10
A02.12	34	65	9
A02.13	35	65	9
A02.16	34	92	9
A02.17	34	93	9
A02.18	34	73	9
A02.19	34	74	9
A02.2	13	65	9
A02.20	34	75	9
A02.21	34	76	9
A02.22	34	77	9
A02.23	34	78	9
A02.24	34	79	9
A02.25	34	80	9
A02.26	34	81	9
A02.27	34	82	9
A02.28	34	83	9
A02.29	34	84	9
A02.3	17	65	9
A02.30	34	85	9

ES 2 938 708 T3

A02.31	34	86	9
A02.32	34	87	9
A02.33	34	88	9
A02.34	34	89	9
A02.35	34	90	9
A02.36	34	91	9
A02.37	34	66	9
A02.38	34	113	9
A02.39	34	112	9
A02.4	18	65	9
A02.40	111	65	9
A02.41	110	65	9
A02.43	110	113	9
A02.44	111	112	9
A02.46	34	67	9
A02.47	34	68	9
A02.48	34	69	9
A02.49	34	70	9
A02.5	19	65	9
A02.50	34	71	9
A02.51	34	72	9
A02.52	34	94	9
A02.53	34	95	9
A02.54	34	96	9
A02.55	34	97	9
A02.56	34	98	9
A02.57	34	99	9
A02.58	34	100	9
A02.59	34	101	9
A02.6	20	65	9
A02.60	34	102	9
A02.61	34	103	9
A02.62	34	104	9
A02.63	34	105	9
A02.64	34	106	9

ES 2 938 708 T3

A02.65	34	107	9
A02.66	34	108	9
A02.67	34	109	9
A02.8	17	14	9
A02.9	18	14	9
A10.1	165	161	9
A10.10	174	161	9
A10.11	175	161	9
A10.12	176	161	9
A10.13	177	161	9
A10.14	178	161	9
A10.15	179	161	9
A10.16	180	161	9
A10.17	156	181	9
A10.18	156	182	9
A10.19	156	183	9
A10.2	166	161	9
A10.20	156	184	9
A10.21	156	185	9
A10.22	156	186	9
A10.23	156	187	9
A10.24	156	188	9
A10.25	156	189	9
A10.26	156	190	9
A10.27	156	191	9
A10.28	156	192	9
A10.29	156	193	9
A10.3	167	161	9
A10.30	156	194	9
A10.31	156	195	9
A10.32	156	196	9
A10.35	197	161	9
A10.36	156	198	9
A10.38	152	161	9
A10.39	152	181	9

ES 2 938 708 T3

A10.4	168	161	9
A10.40	152	182	9
A10.41	152	183	9
A10.42	152	184	9
A10.43	152	185	9
A10.44	152	186	9
A10.45	152	187	9
A10.46	152	188	9
A10.47	152	189	9
A10.48	152	190	9
A10.49	152	191	9
A10.5	169	161	9
A10.50	152	192	9
A10.51	152	193	9
A10.52	152	194	9
A10.53	152	195	9
A10.54	152	196	9
A10.57	152	198	9
A10.59	156	161	10
A10.6	170	161	9
A10.7	171	161	9
A10.8	172	161	9
A10.9	173	161	9
A10A2.0 (quimérico)	148	157	9
A10A2.1	149	158	9
A10A2.10	150	160	9
A10A2.11	150	161	9
A10A2.12	150	162	9
A10A2.13	150	163	9
A10A2.14	150	164	9
A10A2.15	151	158	9
A10A2.16	151	159	9
A10A2.17	151	160	9
A10A2.18	151	161	9
A10A2.19	151	162	9

ES 2 938 708 T3

A10A2.2	149	159	9
A10A2.20	151	163	9
A10A2.21	151	164	9
A10A2.22	152	158	9
A10A2.23	152	159	9
A10A2.24	152	160	9
A10A2.25	152	161	9
A10A2.26	152	162	9
A10A2.27	152	163	9
A10A2.28	152	164	9
A10A2.29	153	158	9
A10A2.3	149	160	9
A10A2.30	153	159	9
A10A2.31	153	160	9
A10A2.32	153	161	9
A10A2.33	153	162	9
A10A2.34	153	163	9
A10A2.35	153	164	9
A10A2.36	154	158	9
A10A2.37	154	159	9
A10A2.38	154	160	9
A10A2.39	154	161	9
A10A2.4	149	161	9
A10A2.40	154	162	9
A10A2.41	154	163	9
A10A2.42	154	164	9
A10A2.43	154	158	9
A10A2.44	155	159	9
A10A2.45	155	160	9
A10A2.46	155	161	9
A10A2.47	155	162	9
A10A2.48	155	163	9
A10A2.49	155	164	9
A10A2.5	149	162	9
A10A2.50	156	158	9

ES 2 938 708 T3

A10A2.51	156	159	9
A10A2.52	156	160	9
A10A2.53	156	161	9
A10A2.54	156	162	9
A10A2.55	156	163	9
A10A2.56	156	164	9
A10A2.6	149	163	9
A10A2.7	149	164	9
A10A2.8	150	158	9
A10A2.9	150	159	9
A5D1.0 (quimérico)	114	125	9
A5D1.1	115	126	9
A5D1.10	116	129	9
A5D1.11	116	130	9
A5D1.12	116	131	9
A5D1.13	117	126	9
A5D1.14	117	127	9
A5D1.15	117	128	9
A5D1.16	117	129	9
A5D1.17	117	130	9
A5D1.18	117	131	9
A5D1.19	118	126	9
A5D1.2	115	127	9
A5D1.20	118	127	9
A5D1.21	118	128	9
A5D1.22	118	129	9
A5D1.23	118	130	9
A5D1.24	118	131	9
A5D1.25	119	126	9
A5D1.26	119	127	9
A5D1.27	119	128	9
A5D1.28	119	129	9
A5D1.29	119	130	9
A5D1.3	115	128	9
A5D1.30	119	131	9

ES 2 938 708 T3

A5D1.31	120	126	9
A5D1.32	120	127	9
A5D1.33	120	128	9
A5D1.34	120	129	9
A5D1.35	120	130	9
A5D1.36	120	131	9
A5D1.37	121	126	9
A5D1.38	121	127	9
A5D1.39	121	128	9
A5D1.4	115	129	9
A5D1.40	121	129	9
A5D1.41	121	130	9
A5D1.42	121	131	9
A5D1.43	122	126	9
A5D1.44	122	127	9
A5D1.45	122	128	9
A5D1.46	122	129	9
A5D1.47	122	130	9
A5D1.48	122	131	9
A5D1.49	123	126	9
A5D1.5	115	130	9
A5D1.50	123	127	9
A5D1.51	123	128	9
A5D1.52	123	129	9
A5D1.53	123	130	9
A5D1.54	123	131	9
A5D1.55	124	126	9
A5D1.56	124	127	9
A5D1.57	124	128	9
A5D1.58	124	129	9
A5D1.59	124	130	9
A5D1.6	115	131	9
A5D1.60	124	131	9
A5D1.7	116	126	9
A5D1.8	116	127	9

ES 2 938 708 T3

A5D1.9	116	128	9
A5E8.0 (quimérico)	132	143	9
A5E8.1	133	144	9
A5E8.10	135	145	9
A5E8.11	135	146	9
A5E8.12	135	147	9
A5E8.13	136	144	9
A5E8.14	136	145	9
A5E8.15	136	146	9
A5E8.16	136	147	9
A5E8.17	137	144	9
A5E8.18	137	145	9
A5E8.19	137	146	9
A5E8.2	133	145	9
A5E8.20	137	147	9
A5E8.21	138	144	9
A5E8.22	138	145	9
A5E8.23	138	146	9
A5E8.24	138	147	9
A5E8.25	139	144	9
A5E8.26	139	145	9
A5E8.27	139	146	9
A5E8.28	139	147	9
A5E8.29	140	144	9
A5E8.3	133	146	9
A5E8.30	140	145	9
A5E8.31	140	146	9
A5E8.32	140	147	9
A5E8.33	141	144	9
A5E8.34	141	145	9
A5E8.35	141	146	9
A5E8.36	141	147	9
A5E8.37	142	144	9
A5E8.38	142	145	9
A5E8.39	142	146	9

ES 2 938 708 T3

A5E8.4	133	147	9
A5E8.40	142	147	9
A5E8.5	134	144	9
A5E8.6	134	145	9
A5E8.7	134	146	9
A5E8.8	134	147	9
A5E8.9	135	144	9
X02.10	19	14	3
X02.100	13	58	3
X02.101	13	59	3
X02.102	13	60	3
X02.103	13	61	3
X02.104	13	62	3
X02.105	13	63	3
X02.106	13	64	3
X02.107	13	65	3
X02.108	32	14	3
X02.11	20	14	3
X02.110	33	14	3
X02.114	13	660	3
X02.115	13	661	3
X02.116	13	662	3
X02.117	13	663	3
X02.118	34	700	3
X02.119	34	701	3
X02.120	728	700	3
X02.121	729	700	3
X02.122	730	700	3
X02.123	731	700	3
X02.124	728	701	3
X02.125	729	701	3
X02.126	730	701	3
X02.127	731	701	3
X02.68	21	14	3
X02.69	22	14	3

ES 2 938 708 T3

X02.70	23	14	3
X02.71	24	14	3
X02.72	25	14	3
X02.73	26	14	3
X02.74	27	14	3
X02.75	28	14	3
X02.76	29	14	3
X02.77	30	14	3
X02.78	31	14	3
X02.8	17	14	3
X02.80	13	38	3
X02.81	13	39	3
X02.82	13	40	3
X02.83	13	41	3
X02.84	13	42	3
X02.85	13	43	3
X02.86	13	44	3
X02.87	13	45	3
X02.88	13	46	3
X02.89	13	47	3
X02.9	18	14	3
X02.90	13	48	3
X02.91	13	49	3
X02.92	13	50	3
X02.93	13	51	3
X02.94	13	52	3
X02.95	13	53	3
X02.96	13	54	3
X02.97	13	55	3
X02.98	13	56	3
X02.99	13	57	3
X10.100	720	706	3
X10.101	721	706	3
X10.102	722	706	3
X10.103	723	706	3

ES 2 938 708 T3

X10.104	739	706	3
X10.105	740	706	3
X10.106	741	706	3
X10.107	742	706	3
X10.108	720	707	3
X10.109	721	707	3
X10.110	722	707	3
X10.111	723	707	3
X10.112	739	707	3
X10.113	740	707	3
X10.114	741	707	3
X10.115	742	707	3
X10.116	720	708	3
X10.117	721	708	3
X10.118	722	708	3
X10.119	723	708	3
X10.120	739	708	3
X10.121	740	708	3
X10.122	741	708	3
X10.123	742	708	3
X10.124	720	709	3
X10.125	721	709	3
X10.126	722	709	3
X10.127	723	709	3
X10.128	739	709	3
X10.129	740	709	3
X10.130	741	709	3
X10.131	742	709	3
X10.132	720	710	3
X10.133	721	710	3
X10.134	722	710	3
X10.135	723	710	3
X10.136	739	710	3
X10.137	740	710	3
X10.138	741	710	3

ES 2 938 708 T3

X10.139	742	710	3
X10.140	720	711	3
X10.141	721	711	3
X10.142	722	711	3
X10.143	723	711	3
X10.144	739	711	3
X10.145	740	711	3
X10.146	741	711	3
X10.147	742	711	3
X10.60	156	704	3
X10.61	156	705	3
X10.62	156	706	3
X10.63	156	707	3
X10.64	156	708	3
X10.65	156	709	3
X10.66	156	710	3
X10.67	156	711	3
X10.68	720	161	3
X10.69	721	161	3
X10.70	722	161	3
X10.71	723	161	3
X10.72	739	161	3
X10.73	740	161	3
X10.74	741	161	3
X10.75	742	161	3
X10.76	152	704	3
X10.77	152	705	3
X10.78	152	706	3
X10.79	152	707	3
X10.80	152	708	3
X10.81	152	709	3
X10.82	152	710	3
X10.83	152	711	3
X10.84	720	704	3
X10.85	721	704	3

ES 2 938 708 T3

X10.86	722	704	3
X10.87	723	704	3
X10.88	739	704	3
X10.89	740	704	3
X10.90	741	704	3
X10.91	742	704	3
X10.92	720	705	3
X10.93	721	705	3
X10.94	722	705	3
X10.95	723	705	3
X10.96	739	705	3
X10.97	740	705	3
X10.98	741	705	3
X10.99	742	705	3
IgG4 X910/12- HC-L0-IFN-alfa (A145D)	110	112	9
IgG4 X913/15- HC-L0-IFN-alfa (A145D)	111	113	9

Tabla 30

SEC ID NO:	Tipo	Descripción
1	AA	CD38 humano
2	AA	CD38 de cynomolgus
3	AA	Cadena pesada constante de IgG4 humana
4	AA	Cadena pesada constante de IgG1 humana
5	AA	Región constante kappa humana
6	AA	Región constante lambda humana
7	AA	IFN-alfa2b
8	AA	Intrón A
9	AA	IgG4 HC-L0-IFN-alfa (A145D)
10	AA	IgG1 HC-L0-IFN-alfa (A145D)
11	AA	Cadena pesada de A02.1
12	AA	Cadena ligera de A02.1
13	AA	Cadena pesada variable de A02.1
14	AA	Cadena ligera variable de A02.1

ES 2 938 708 T3

15	AA	Cadena pesada variable X02.1VH
16	AA	Secuencia de línea germinal de IGHV4-61*01
17	AA	Cadena pesada variable X02.8VH
18	AA	Cadena pesada variable X02.9VH
19	AA	Cadena pesada variable X02.10VH
20	AA	Cadena pesada variable X02.11VH
21	AA	Cadena pesada variable X02.68VH
22	AA	Cadena pesada variable X02.69VH
23	AA	Cadena pesada variable X02.70VH
24	AA	Cadena pesada variable X02.71VH
25	AA	Cadena pesada variable X02.72VH
26	AA	Cadena pesada variable X02.73VH
27	AA	Cadena pesada variable X02.74VH
28	AA	Cadena pesada variable X02.75VH
29	AA	Cadena pesada variable X02.76VH
30	AA	Cadena pesada variable X02.77VH
31	AA	Cadena pesada variable X02.78VH
32	AA	Cadena pesada variable X02.108VH
33	AA	Cadena pesada variable X02.110VH
34	AA	Cadena pesada variable A02.12VH
35	AA	Cadena pesada variable A02.13VH
36	AA	Cadena ligera variable de A02.1VL
37	AA	Secuencia de línea germinal de IGLV5-37*01
38	AA	Cadena ligera variable X02.80VL
39	AA	Cadena ligera variable de X02.81VL
40	AA	Cadena ligera variable de X02.82VL
41	AA	Cadena ligera variable de X02.83VL
42	AA	Cadena ligera variable de X02.84VL
43	AA	Cadena ligera variable de X02.85VL
44	AA	Cadena ligera variable de X02.86VL
45	AA	Cadena ligera variable de X02.87VL
46	AA	Cadena ligera variable de X02.88VL
47	AA	Cadena ligera variable de X02.89VL
48	AA	Cadena ligera variable de X02.90VL
49	AA	Cadena ligera variable de X02.91VL

ES 2 938 708 T3

50	AA	Cadena ligera variable de X02.92VL
51	AA	Cadena ligera variable de X02.93VL
52	AA	Cadena ligera variable de X02.94VL
53	AA	Cadena ligera variable de X02.95VL
54	AA	Cadena ligera variable de X02.96VL
55	AA	Cadena ligera variable de X02.97VL
56	AA	Cadena ligera variable de X02.98VL
57	AA	Cadena ligera variable de X02.99VL
58	AA	Cadena ligera variable de X02.100VL
59	AA	Cadena ligera variable de X02.101VL
60	AA	Cadena ligera variable de X02.102VL
61	AA	Cadena ligera variable de X02.103VL
62	AA	Cadena ligera variable de X02.104VL
63	AA	Cadena ligera variable de X02.105VL
64	AA	Cadena ligera variable de X02.106VL
65	AA	Cadena ligera variable de X02.107VL
66	AA	Cadena ligera variable de A02.37VL
67	AA	Cadena ligera variable de A02.46VL
68	AA	Cadena ligera variable de A02.47VL
69	AA	Cadena ligera variable de A02.48VL
70	AA	Cadena ligera variable de A02.49VL
71	AA	Cadena ligera variable de A02.50VL
72	AA	Cadena ligera variable de A02.51VL
73	AA	Cadena ligera variable de A02.18VL
74	AA	Cadena ligera variable de A02.19VL
75	AA	Cadena ligera variable de A02.20VL
76	AA	Cadena ligera variable de A02.21VL
77	AA	Cadena ligera variable de A02.22VL
78	AA	Cadena ligera variable de A02.23VL
79	AA	Cadena ligera variable de A02.24VL
80	AA	Cadena ligera variable de A02.25VL
81	AA	Cadena ligera variable de A02.26VL
82	AA	Cadena ligera variable de A02.27VL
83	AA	Cadena ligera variable de A02.28VL
84	AA	Cadena ligera variable de A02.29VL

ES 2 938 708 T3

85	AA	Cadena ligera variable de A02.30VL
86	AA	Cadena ligera variable de A02.31VL
87	AA	Cadena ligera variable de A02.32VL
88	AA	Cadena ligera variable de A02.33VL
89	AA	Cadena ligera variable de A02.34VL
90	AA	Cadena ligera variable de A02.35VL
91	AA	Cadena ligera variable de A02.36VL
92	AA	Cadena ligera variable de X02.16VL
93	AA	Cadena ligera variable de X02.17VL
94	AA	Cadena ligera variable de A02.52VL
95	AA	Cadena ligera variable de A02.53VL
96	AA	Cadena ligera variable de A02.54VL
97	AA	Cadena ligera variable de A02.55VL
98	AA	Cadena ligera variable de A02.56VL
99	AA	Cadena ligera variable de A02.57VL
100	AA	Cadena ligera variable de A02.58VL
101	AA	Cadena ligera variable de A02.59VL
102	AA	Cadena ligera variable de A02.60VL
103	AA	Cadena ligera variable de A02.61VL
104	AA	Cadena ligera variable de A02.62VL
105	AA	Cadena ligera variable de A02.63VL
106	AA	Cadena ligera variable de A02.64VL
107	AA	Cadena ligera variable de A02.65VL
108	AA	Cadena ligera variable de A02.66VL
109	AA	Cadena ligera variable de A02.67VL
110	AA	Cadena pesada variable 910VH
111	AA	Cadena pesada variable 915 VH
112	AA	Cadena ligera variable de 912VL
113	AA	Cadena ligera variable de 913VL
114	AA	5D1-E2-VH quimérico
115	AA	5d1_1-f*01VH
116	AA	5d1_1-f*01VH94R
117	AA	5d1_1-18*01VH
118	AA	5d1_1-18*01VH71A
119	AA	5d1_1-24*01VH

ES 2 938 708 T3

120	AA	5d1_1-24*01VH71A
121	AA	5d1_1-24*01VH29F
122	AA	5d1_1-24*01VH94R
123	AA	5d1_1-45*01VH
124	AA	5d1_1-45*01VH71A
125	AA	5D1VK quimérico
126	AA	5d1 1-5*01VK
127	AA	5d1 1-9*01VK
128	AA	5d1_1-12*01VK
129	AA	5d1_1D-13* 01VK
130	AA	5d1_1D-16* 01VK
131	AA	5d1_3-15* 01VK
132	AA	5E8 quimérico
133	AA	5E8-1-f* 01VH
134	AA	5E8-1-f* 01VH301
135	AA	5E8-1-f* 01VH94R
136	AA	5E8-1-18*01VH
137	AA	5E8-1-18*01VH71A
138	AA	5E8-1-24*01VH
139	AA	5E8-1-24*01VH71A
140	AA	5E8-1-24*01VH94R
141	AA	5E8-1-45*01VH
142	AA	5E8-1-45*01VH71A
143	AA	5E8VK quimérico
144	AA	5E8-2-24*01VK
145	AA	5E8-2D-28*01VK
146	AA	5E8-2D-29*01VK
147	AA	5E8-2-30*01VK
148	AA	VH quimérico 10A2
149	AA	10A2_1-24* 01VH
150	AA	10A2_1-24* 01VH71A
151	AA	10A2_1-24* 01VH94R
152	AA	10A2_1-24* 0171A94R
153	AA	10A2_1-45* 01VH
154	AA	10A2_1-45* 01VH71A

ES 2 938 708 T3

155	AA	10A2_1-f* 01VH
156	AA	10A2_1-f 01VH94R
157	AA	VK quimérico 10A2
158	AA	10A2_1-9* 01Vk
159	AA	10A2_1-12* 01Vk
160	AA	10A2_1D-13* 01Vk
161	AA	10A2_1-33* 01Vk
162	AA	10A2_3-11* 02Vk
163	AA	10A2_3-15* 01Vk
164	AA	10A2_6-21* 01Vk
165	AA	10A2VH +A40E
166	AA	10A2VH +A40G
167	AA	10A2VH +A40H
168	AA	10A2VH +A40Q
169	AA	10A2VH +A40S
170	AA	10A2VH +A40V
171	AA	10A2VH + N35E
172	AA	10A2VH +N35P
173	AA	10A2VH +N35Q
174	AA	10A2VH +N35S
175	AA	10A2VH +R94E
176	AA	10A2VH +R94G
177	AA	10A2VH +R94P
178	AA	10A2VH +R94T
179	AA	10A2VH +K96G
180	AA	10A2VH +K96T
181	AA	10A2VK+ K24E
182	AA	10A2VK+ K24G
183	AA	10A2VK+ K24P
184	AA	10A2VK+ K24Q
185	AA	10A2VK+ R54D
186	AA	10A2VK+ I48D
187	AA	10A2VK+ Y49E
188	AA	10A2VK+ M89A
189	AA	10A2VK+ M89E

ES 2 938 708 T3

190	AA	10A2VK+ M89H
191	AA	10A2VK+ M89K
192	AA	10A2VK+ M89P
193	AA	10A2VK+ M89Q
194	AA	10A2VK+ M89S
195	AA	10A2VK+ M89V
196	AA	10A2VK+ Q90D
197	AA	10A2VH (AQ) + N98Q
198	AA	10A2VK (AV) + N53Q
199	AA	X02.1VH FWR1
200	AA	X02.1VH CDR1
201	AA	X02.1VH FWR2
202	AA	X02.1VH CDR2
203	AA	X02.1VH FWR3
204	AA	X02.1VH CDR3
205	AA	X02.1VH FWR4
206	AA	IGHV4-61*01 FWR1
207	AA	IGHV4-61*01 CDR1
208	AA	IGHV4-61*01 FWR2
209	AA	IGHV4-61*01 FWR3
210	AA	X02.8VH FWR3
211	AA	X02.9VH FWR2
212	AA	X02.10VH FWR3
213	AA	X02.11VH FWR3
214	AA	X02.68VH FWR1
215	AA	X02.69VH FWR1
216	AA	X02.70VH FWR3
217	AA	X02.71VH FWR1
218	AA	X02.72VH FWR3
219	AA	X02.73VH FWR1
220	AA	X02.74VH CDR3
221	AA	X02.75VH FWR3
222	AA	X02.76VH CDR3
223	AA	X02.77VH CDR3
224	AA	X02.78VH CDR1

ES 2 938 708 T3

225	AA	X02.108 FWR3
226	AA	X02.110VH FWR3
227	AA	A02.12VH FWR3
228	AA	A02.12VH CDR3
229	AA	A02.13VH FWR2
230	AA	A02.13VH FWR3
231	AA	A02.13VH CDR3
232	AA	A02.1VL FWR1
233	AA	A02.1VL CDR1
234	AA	A02.1VL FWR2
235	AA	A02.1VL CDR2
236	AA	A02.1VL FWR3
237	AA	A02.1VL CDR3
238	AA	A02.1VL FWR4
239	AA	IGLV5-37*01 FWR1
240	AA	IGLV5-37*01 CDR1
241	AA	IGLV5-37*01 CDR2
242	AA	IGLV5-37*01 FWR3
243	AA	IGLV5-37*01 CDR3
244	AA	X02.80VL CDR3
245	AA	X02.81VL FWR3
246	AA	X02.82VL FWR2
247	AA	X02.83VL FWR1
248	AA	X02.84VL FWR2
249	AA	X02.84VL CDR2
250	AA	X02.86VL CDR1
251	AA	X02.87VL CDR3
252	AA	X02.88VL CDR1
253	AA	X02.89VL CDR2
254	AA	X02.90VL CDR3
255	AA	X02.91VL CDR1
256	AA	X02.92VL CDR3
257	AA	X02.93VL CDR3
258	AA	X02.94VL CDR3
259	AA	X02.95VL FWR1

ES 2 938 708 T3

260	AA	X02.96VL FWR1
261	AA	X02.97VL FWR1
262	AA	X02.98VL CDR1
263	AA	X02.99VL CDR1
264	AA	X02.100VL CDR2
265	AA	X02.101VL FWR3
266	AA	X02.102VL FWR3
267	AA	X02.103VL FWR3
268	AA	X02.104VL CDR3
269	AA	X02.105VL CDR3
270	AA	X02.106VL CDR3
271	AA	X02.107VL FWR3
272	AA	A02.37VL FWR3
273	AA	A02.37VL CDR3
274	AA	A02.46VL FWR3
275	AA	A02.46VL CDR3
276	AA	A02.47VL FWR3
277	AA	A02.48VL FWR3
278	AA	A02.49VL FWR3
279	AA	A02.50VL FWR3
280	AA	A02.51VL FWR3
281	AA	A02.18VL FWR2
282	AA	A02.18VL FWR3
283	AA	A02.19VL FWR2
284	AA	A02.19VL FWR3
285	AA	A02.20VL FWR2
286	AA	A02.20VL FWR3
287	AA	A02.21VL FWR2
288	AA	A02.21VL FWR3
289	AA	A02.22VL FWR2
290	AA	A02.22VL FWR3
291	AA	A02.23VL FWR2
292	AA	A02.23VL FWR3
293	AA	A02.24VL FWR2
294	AA	A02.24VL FWR3

ES 2 938 708 T3

295	AA	A02.25VL FWR2
296	AA	A02.25VL FWR3
297	AA	A02.26VL FWR2
298	AA	A02.26VL FWR3
299	AA	A02.27VL CDR2
300	AA	A02.27VL FWR3
301	AA	A02.28VL CDR2
302	AA	A02.28VL FWR3
303	AA	A02.29VL CDR2
304	AA	A02.29VL FWR3
305	AA	A02.30VL CDR2
306	AA	A02.30VL FWR3
307	AA	A02.31VL CDR2
308	AA	A02.31VL FWR3
309	AA	A02.32VL CDR2
310	AA	A02.32VL FWR3
311	AA	A02.33VL CDR2
312	AA	A02.33VL FWR3
313	AA	A02.34VL CDR2
314	AA	A02.34VL FWR3
315	AA	A02.35VL CDR2
316	AA	A02.35VL FWR3
317	AA	A02.36VL CDR2
318	AA	A02.36VL FWR3
319	AA	X02.16VL CDR1
320	AA	X02.16VL FWR3
321	AA	X02.16VL CDR3
322	AA	X02.17VL CDR1
323	AA	X02.17VL FWR3
324	AA	X02.17VL CDR3
325	AA	A02.52VL CDR1
326	AA	A02.52VL CDR2
327	AA	A02.52VL FWR3
328	AA	A02.52VL CDR3
329	AA	A02.53VL CDR1

ES 2 938 708 T3

330	AA	A02.53VL CDR2
331	AA	A02.53VL FWR3
332	AA	A02.53VL CDR3
333	AA	A02.54VL CDR1
334	AA	A02.54VL CDR2
335	AA	A02.54VL FWR3
336	AA	A02.54VL CDR3
337	AA	A02.55VL CDR1
338	AA	A02.55VL CDR2
339	AA	A02.55VL FWR3
340	AA	A02.55VL CDR3
341	AA	A02.56VL CDR1
342	AA	A02.56VL CDR2
343	AA	A02.56VL FWR3
344	AA	A02.56VL CDR3
345	AA	A02.57VL CDR1
346	AA	A02.57VL CDR2
347	AA	A02.57VL FWR3
348	AA	A02.57VL CDR3
349	AA	A02.58VL CDR1
350	AA	A02.58VL CDR2
351	AA	A02.58VL FWR3
352	AA	A02.58VL CDR3
353	AA	A02.59VL CDR1
354	AA	A02.59VL CDR2
355	AA	A02.59VL FWR3
356	AA	A02.59VL CDR3
357	AA	A02.60VL CDR1
358	AA	A02.60VL CDR2
359	AA	A02.60VL FWR3
360	AA	A02.60VL CDR3
361	AA	A02.61VL CDR1
362	AA	A02.61VL CDR2
363	AA	A02.61VL FWR3
364	AA	A02.61VL CDR3

ES 2 938 708 T3

365	AA	A02.62VL CDR1
366	AA	A02.62VL CDR2
367	AA	A02.62VL FWR3
368	AA	A02.62VL CDR3
369	AA	A02.63VL CDR1
370	AA	A02.63VL CDR2
371	AA	A02.63VL FWR3
372	AA	A02.63VL CDR3
373	AA	A02.64VL CDR1
374	AA	A02.64VL CDR2
375	AA	A02.64VL FWR3
376	AA	A02.64VL CDR3
377	AA	A02.65VL CDR1
378	AA	A02.65VL CDR2
379	AA	A02.65VL FWR3
380	AA	A02.65VL CDR3
381	AA	A02.66VL CDR1
382	AA	A02.66VL CDR2
383	AA	A02.66VL FWR3
384	AA	A02.66VL CDR3
385	AA	A02.67VL CDR1
386	AA	A02.67VL CDR2
387	AA	A02.67VL FWR3
388	AA	A02.67VL CDR3
389	AA	5D1.1VH FWR1
390	AA	5D1.1VH CDR1
391	AA	5D1.1VH FWR2
392	AA	5D1.1VH CDR2
393	AA	5D1.1VH FWR3
394	AA	5D1.1VH CDR3
395	AA	5D1.1VH FWR4
396	AA	5D1.2VH FWR1
397	AA	5D1.2VH FWR2
398	AA	5D1.2VH CDR2
399	AA	5D1.2VH FWR3

ES 2 938 708 T3

400	AA	5D1.3VH FWR1
401	AA	5D1.3VH FWR2
402	AA	5D1.3VH CDR2
403	AA	5D1.3VH FWR3
404	AA	5D1.4VH FWR1
405	AA	5D1.4VH FWR2
406	AA	5D1.4VH CDR2
407	AA	5D1.4VH FWR3
408	AA	5D1.5VH FWR1
409	AA	5D1.5VH FWR2
410	AA	5D1.5VH CDR2
411	AA	5D1.5VH FWR3
412	AA	5D1.6VH FWR1
413	AA	5D1.6VH FWR2
414	AA	5D1.6VH CDR2
415	AA	5D1.6VH FWR3
416	AA	5D1.7VH FWR1
417	AA	5D1.7VH FWR2
418	AA	5D1.7VH CDR2
419	AA	5D1.7VH FWR3
420	AA	5D1.8VH FWR1
421	AA	5D1.8VH FWR2
422	AA	5D1.8VH CDR2
423	AA	5D1.8VH FWR3
424	AA	5D1.9VH FWR1
425	AA	5D1.9VH FWR2
426	AA	5D1.9VH CDR2
427	AA	5D1.9VH FWR3
428	AA	5D1.10VH FWR1
429	AA	5D1.10VH FWR2
430	AA	5D1.10VH CDR2
431	AA	5D1.10VH FWR3
432	AA	5D1.11VH FWR1
433	AA	5D1.11VH FWR2
434	AA	5D1.11VH CDR2

ES 2 938 708 T3

435	AA	5D1.11VH FWR3
436	AA	5D1.1VL FWR1
437	AA	5D1.1VL CDR1
438	AA	5D1.1VL FWR2
439	AA	5D1.1VL CDR2
440	AA	5D1.1VL FWR3
441	AA	5D1.1VL CDR3
442	AA	5D1.1VL FWR4
443	AA	5D1.2VL FWR1
444	AA	5D1.2VL FWR2
445	AA	5D1.2VL FWR3
446	AA	5D1.2VL FWR4
447	AA	5D1.3VL FWR1
448	AA	5D1.3VL FWR2
449	AA	5D1.3VL FWR3
450	AA	5D1.3VL FWR4
451	AA	5D1.4VL FWR1
452	AA	5D1.4VL FWR2
453	AA	5D1.4VL FWR3
454	AA	5D1.4VL FWR4
455	AA	5D1.5VL FWR1
456	AA	5D1.5VL FWR2
457	AA	5D1.5VL FWR3
458	AA	5D1.5VL FWR4
459	AA	5D1.6VL FWR1
460	AA	5D1.6VL FWR2
461	AA	5D1.6VL FWR3
462	AA	5D1.6VL FWR4
463	AA	5D1.7VL FWR1
464	AA	5D1.7VL FWR2
465	AA	5D1.7VL FWR3
466	AA	5E8.1VH FWR1
467	AA	5E8.1VH CDR2
468	AA	5E8.1VH FWR3
469	AA	5E8.1VH CDR3

ES 2 938 708 T3

470	AA	5E8.2VH FWR1
471	AA	5E8.2VH CDR2
472	AA	5E8.3VH FWR1
473	AA	5E8.3VH CDR2
474	AA	5E8.4VH FWR1
475	AA	5E8.4VH CDR2
476	AA	5E8.5VH FWR1
477	AA	5E8.5VH CDR2
478	AA	5E8.6VH FWR1
479	AA	5E8.6VH CDR2
480	AA	5E8.7VH FWR1
481	AA	5E8.7VH CDR2
482	AA	5E8.8VH FWR1
483	AA	5E8.8VH CDR2
484	AA	5E8.9VH FWR1
485	AA	5E8.9VH CDR2
486	AA	5E8.10VH FWR1
487	AA	58E.10VH CDR2
488	AA	5E8.11VH FWR1
489	AA	58E.11VH CDR2
490	AA	5E8.1VL FWR1
491	AA	5E8.1VL CDR1
492	AA	5E8.1VL FWR2
493	AA	5E8.1VL CDR2
494	AA	5E8.1VL FWR3
495	AA	5E8.1VL CDR3
496	AA	5E8.1VL FWR4
497	AA	5E8.2VL FWR1
498	AA	5E8.2VL FWR2
499	AA	5E8.2VL FWR3
500	AA	5E8.2VL FWR4
501	AA	5E8.3VL FWR1
502	AA	5E8.3VL FWR2
503	AA	5E8.3VL FWR3
504	AA	5E8.3VL FWR4

ES 2 938 708 T3

505	AA	5E8.4VL FWR1
506	AA	5E8.4VL FWR2
507	AA	5E8.4VL FWR3
508	AA	5E8.4VL FWR4
509	AA	5E8.5VL FWR1
510	AA	5E8.5VL FWR2
511	AA	5E8.5VL FWR3
512	AA	5E8.5VL FWR4
513	AA	10A2.1VH FWR1
514	AA	10A2.1VH CDR1
515	AA	10A2.1VH FWR2
516	AA	10A2.1VH CDR2
517	AA	10A2.1VH FWR3
518	AA	10A2.1VH CDR3
519	AA	10A2.1VH FWR4
520	AA	10A2.2VH FWR2
521	AA	10A2.3VH FWR2
522	AA	10A2.4VH FWR2
523	AA	10A2.5VH FWR2
524	AA	10A2.6VH FWR2
525	AA	10A2.7VH FWR2
526	AA	10A2.8VH CDR1
527	AA	10A2.9VH CDR1
528	AA	10A2.10VH CDR1
529	AA	10A2.11VH CDR1
530	AA	10A2.12VH FWR3
531	AA	10A2.13VH FWR3
532	AA	10A2.14VH FWR3
533	AA	10A2.15VH FWR3
534	AA	10A2.16VH CDR3
535	AA	10A2.17VH CDR3
536	AA	10A2.18VH CDR3
537	AA	10A2.19VH FWR1
538	AA	10A2.19VH FWR2
539	AA	10A2.19VH CDR2

ES 2 938 708 T3

540	AA	10A2.19VH FWR3
541	AA	10A2.19VH FWR4
542	AA	10A2.20VH FWR1
543	AA	10A2.20VH FWR2
544	AA	10A2.20VH CDR2
545	AA	10A2.20VH FWR3
546	AA	10A2.20VH FWR4
547	AA	10A2.21VH FWR1
548	AA	10A2.21VH FWR2
549	AA	10A2.21VH CDR2
550	AA	10A2.21VH FWR3
551	AA	10A2.21VH FWR4
552	AA	10A2.22VH FWR1
553	AA	10A2.22VH FWR2
554	AA	10A2.22VH CDR2
555	AA	10A2.22VH FWR3
556	AA	10A2.22VH FWR4
557	AA	10A2.23VH FWR1
558	AA	10A2.23VH FWR2
559	AA	10A2.23VH CDR2
560	AA	10A2.23VH FWR3
561	AA	10A2.23VH FWR4
562	AA	10A2.24VH FWR1
563	AA	10A2.24VH FWR2
564	AA	10A2.24VH CDR2
565	AA	10A2.24VH FWR3
566	AA	10A2.24VH FWR4
567	AA	10A2.25VH FWR1
568	AA	10A2.25VH FWR2
569	AA	10A2.25VH CDR2
570	AA	10A2.25VH FWR3
571	AA	10A2.25VH FWR4
572	AA	10A2.26VH FWR1
573	AA	10A2.26VH FWR2
574	AA	10A2.26VH CDR2

ES 2 938 708 T3

575	AA	10A2.26VH FWR3
576	AA	10A2.26VH FWR4
577	AA	10A2.27VH FWR1
578	AA	10A2.27VH FWR2
579	AA	10A2.27VH CDR2
580	AA	10A2.27VH FWR3
581	AA	10A2.27VH FWR4
582	AA	10A2.1VL FWR1
583	AA	10A2.1VL CDR1
584	AA	10A2.1VL FWR2
585	AA	10A2.1VL CDR2
586	AA	10A2.1VL FWR3
587	AA	10A2.1VL CDR3
588	AA	10A2.1VL FWR4
589	AA	10A2.2VL CDR1
590	AA	10A2.3VL CDR1
591	AA	10A2.4VL CDR2
592	AA	10A2.5VL FWR2
593	AA	10A2.6VL FWR2
594	AA	10A2.7VL CDR3
595	AA	10A2.8VL CDR3
596	AA	10A2.9VL CDR3
597	AA	10A2.10VL CDR3
598	AA	10A2.11VL CDR3
599	AA	10A2.12VL CDR3
600	AA	10A2.13VL CDR3
601	AA	10A2.14VL CDR3
602	AA	10A2.15VL CDR3
603	AA	10A2.16VL CDR3
604	AA	10A2.17VL CDR3
605	AA	10A2.18VL CDR2
606	AA	10A2.19VL CDR3
607	AA	10A2.20VL FWR1
608	AA	10A2.20VL CDR1
609	AA	10A2.20VL FWR2

ES 2 938 708 T3

610	AA	10A2.20VL CDR2
611	AA	10A2.20VL FWR3
612	AA	10A2.20VL CDR3
613	AA	10A2.20VL FWR4
614	AA	10A2.21VL FWR1
615	AA	10A2.21VL FWR2
616	AA	10A2.21VL FWR3
617	AA	10A2.21VL FWR4
618	AA	10A2.22VL FWR1
619	AA	10A2.22VL FWR2
620	AA	10A2.22VL FWR3
621	AA	10A2.22VL FWR4
622	AA	10A2.23VL FWR1
623	AA	10A2.23VL FWR2
624	AA	10A2.23VL FWR3
625	AA	10A2.23VL FWR4
626	AA	10A2.24VL FWR1
627	AA	10A2.24VL FWR2
628	AA	10A2.24VL FWR3
629	AA	10A2.24VL FWR4
630	AA	10A2.25VL FWR1
631	AA	10A2.25VL FWR2
632	AA	10A2.25VL FWR3
633	AA	10A2.25VL FWR4
634	AA	10A2.26VL FWR1
635	AA	10A2.26VL FWR2
636	AA	10A2.26VL FWR3
637	AA	10A2.26VL FWR4
638	AA	10A2.27VL FWR1
639	AA	10A2.27 VL FWR2
640	AA	10A2.27VL FWR3
641	AA	10A2.27VL FWR4
642	AA	Gly4Ser1
643	AA	Gly4Ser1 x 2
644	AA	Gly4Ser1 x 3

ES 2 938 708 T3

645	AA	Gly4Ser1 x 4
646	AA	Gly4Ser1 x 5
647	AA	IFN-alfa2b A145D
648	AA	IFN-alfa2b trunc
649	AA	IFN-alfa2b trunc A145D
650	AA	IFN-alfa2b A145G
651	AA	IFN-alfa2b trunc A145G
652	AA	IgG4 IFN-alfa2b A145D
653	AA	IgG4 IFN-alfa2b A145G
654	AA	IgG4 S228P IFN-alfa2b A145G
655	AA	IgG1 IFN-alfa2b A145G
656	AA	IgG1 YTE IFN-alfa2b A145D
657	AA	IgG1 YTE IFN-alfa2b A145G
658	AA	IgG4 YTE IFN-alfa2b A145D
659	AA	A02 pesada variable de consenso
660	AA	X02.114VL
661	AA	X02.115VL
662	AA	X02.116VL
663	AA	X02.117VL
664	AA	A02 ligera variable de consenso
665	AA	A10 pesada variable de consenso
666	AA	A10 ligera variable de consenso
667	ADN	A02.12VH
668	ADN	X02.9VH
669	ADN	X02.107VL
670	ADN	A02.47VL
671	ADN	A02.31VL
672	ADN	A02.33VL
673	ADN	X02.16VL
674	ADN	X02.17VL
675	ADN	X02.114VL
676	ADN	X02.115VL
677	ADN	X02.116VL
678	ADN	X02.117VL
679	ADN	10A2VH +A40E

ES 2 938 708 T3

680	ADN	10A2VH +A40G
681	ADN	10A2VH +A40H
682	ADN	10A2VH +A40Q
683	ADN	10A2VH +K96G
684	ADN	10A2VH +K96T
685	ADN	10A2_1-f 01VH94R
686	ADN	10A2VH (AQ) + N98Q
687	ADN	10A2-1-24* 0171A94R
688	ADN	10A2_1-33* 01Vk
689	ADN	10A2VK+ K24G
690	ADN	10A2VK+ K24Q
691	ADN	10A2VK+ R54D
692	ADN	10A2VK+ M89A
693	ADN	10A2VK (AV) + N53Q
694	AA	IgG4 YTE IFN-alfa2b A145G
695	ADN	Cadena pesada variable 910VH
696	AA	10A2VK + K24G CDR1
697	AA	910VH CDR1
698	AA	910VH CDR2
699	AA	910VH CDR3
700	AA	Cadena ligera variable de X02.118
701	AA	Cadena ligera variable de X02.119
702	ADN	Cadena ligera variable de X02.118
703	ADN	Cadena ligera variable de X02.119
704	AA	Cadena ligera variable de X10.60
705	AA	Cadena ligera variable de X10.61
706	AA	Cadena ligera variable de X10.62
707	AA	Cadena ligera variable de X10.63
708	AA	Cadena ligera variable de X10.64
709	AA	Cadena ligera variable de X10.65
710	AA	Cadena ligera variable de X10.66
711	AA	Cadena ligera variable de X10.67
712	ADN	Cadena ligera variable de X10.60
713	ADN	Cadena ligera variable de X10.61
714	ADN	Cadena ligera variable de X10.62

ES 2 938 708 T3

715	ADN	Cadena ligera variable de X10.63
716	ADN	Cadena ligera variable de X10.64
717	ADN	Cadena ligera variable de X10.65
718	ADN	Cadena ligera variable de X10.66
719	ADN	Cadena ligera variable de X10.67
720	AA	Cadena pesada variable X10.68
721	AA	Cadena pesada variable X10.69
722	AA	Cadena pesada variable X10.70
723	AA	Cadena pesada variable X10.71
724	ADN	Cadena pesada variable X10.68
725	ADN	Cadena pesada variable X10.69
726	ADN	Cadena pesada variable X10.70
727	ADN	Cadena pesada variable X10.71
728	AA	Cadena pesada variable X02.120
729	AA	Cadena pesada variable X02.121
730	AA	Cadena pesada variable X02.122
731	AA	Cadena pesada variable de X02.123
732	ADN	Cadena pesada variable X02.120
733	ADN	Cadena pesada variable X02.121
734	ADN	Cadena pesada variable X02.122
735	ADN	Cadena pesada variable X02.123
736	AA	910 pesada variable de consenso
737	AA	X02.122VH CDR2
738	AA	X02.123VH CDR2
739	AA	Cadena pesada variable X10.72
740	AA	Cadena pesada variable X10.73
741	AA	Cadena pesada variable X10.74
742	AA	Cadena pesada variable X10.75
743	ADN	Cadena pesada variable X10.72
744	ADN	Cadena pesada variable X10.73
745	ADN	Cadena pesada variable X10.74
746	ADN	Cadena pesada variable X10.75
747	AA	X10.64VL CDR2
748	AA	910 VH FRW1
749	AA	910 VH FRW2

ES 2 938 708 T3

750	AA	X10.120VH FRW2
751	AA	910 VH FRW3
752	AA	X10.121VH FRW3
753	AA	910VH FRW4

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un polinucleótido que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un anticuerpo que se une específicamente con CD38, comprendiendo el anticuerpo una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 156 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 185.
2. El polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la secuencia de ácido nucleico codifica un anticuerpo que comprende una región constante IgG1 humana.
3. El polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la secuencia de ácido nucleico codifica un anticuerpo que comprende una región constante IgG4 humana.
- 10 4. El polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 3, en el que la región constante de cadena pesada de IgG4 humana comprende una prolina en la posición 228 de acuerdo con el sistema de numeración EU.
5. El polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 3 o la reivindicación 4, en el que la región constante de cadena pesada de IgG4 humana comprende una tirosina en la posición 252, una treonina en la posición 254 y un ácido glutámico en la posición 256 de la región constante de acuerdo con el sistema de numeración EU.
- 15 6. El polinucleótido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende una secuencia de ácido nucleico que comprende SEC ID NO: 685, que codifica una región variable de cadena ligera, y una secuencia de ácido nucleico de la SEC ID NO: 691, que codifica una región variable de la cadena ligera.
- 20 7. El polinucleótido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la secuencia de ácido nucleico codifica un interferón alfa-2b fusionado al anticuerpo, en el que el interferón alfa-2b comprende una sustitución de alanina por ácido aspártico o de alanina por glicina en la posición correspondiente a la posición 168 de la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 7.
8. El polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 7, en el que la secuencia de ácido nucleico codifica un interferón alfa-2b que es un interferón alfa-2b truncado N-terminalmente.
- 25 9. El polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 8, en el que el interferón alfa-2b truncado en el extremo N no tiene los veintitrés aminoácidos N-terminales.
10. El polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 7, 8 o 9, en el que la secuencia de ácido nucleico codifica el interferón alfa-2b que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 649 o la SEC ID NO: 651.
11. El polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 7, en el que la secuencia de ácido nucleico codifica el interferón alfa-2b que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 647 o la SEC ID NO: 650.
- 30 12. Un vector que comprende el polinucleótido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11.
13. Una célula de mamífero transformada *in vitro* que comprende el vector de la reivindicación 12.

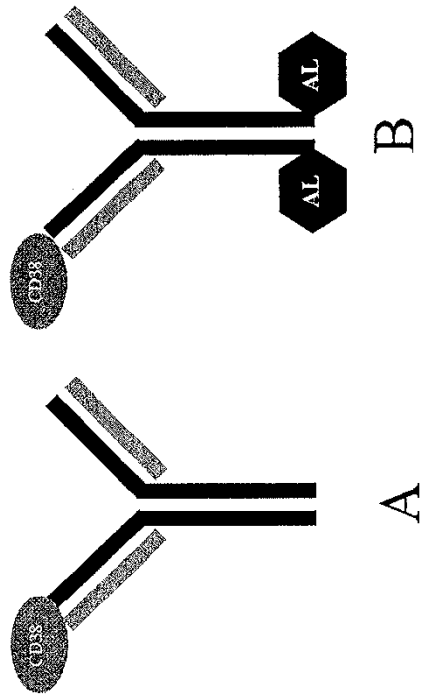


FIG. 1

FIG. 2A

SEC. ID NRO.: 13	QIQIQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISSSSYYWSWIRQHPGKGLEWIGIYYIYSGSTNYPFLKS
SEC. ID NRO.: 16	.V.....V..G.....P.....
SEC. ID NRO.: 17
SEC. ID NRO.: 18P.....
SEC. ID NRO.: 19
SEC. ID NRO.: 20
SEC. ID NRO.: 21K.....
SEC. ID NRO.: 22	.V.....
SEC. ID NRO.: 23
SEC. ID NRO.: 24V.....
SEC. ID NRO.: 25
SEC. ID NRO.: 26K.....
SEC. ID NRO.: 27
SEC. ID NRO.: 28
SEC. ID NRO.: 29
SEC. ID NRO.: 30G.....
SEC. ID NRO.: 31
SEC. ID NRO.: 32
SEC. ID NRO.: 33
SEC. ID NRO.: 34
SEC. ID NRO.: 35P.....

FIG. 2B

SEC. ID NRO.: 13	RVTISVDTLKNQISLRLTSVTAADTAVYYCARVGGAGGWPMDVWGQGT ¹³ TVTVSS
SEC. ID NRO.: 16S...F..K.S.....
SEC. ID NRO.: 17S.....
SEC. ID NRO.: 18S.....
SEC. ID NRO.: 19S.....S.....
SEC. ID NRO.: 20S...F..K.S.....
SEC. ID NRO.: 21
SEC. ID NRO.: 22
SEC. ID NRO.: 23R.....
SEC. ID NRO.: 24
SEC. ID NRO.: 25R.....
SEC. ID NRO.: 26
SEC. ID NRO.: 27L.E.....
SEC. ID NRO.: 28K.....
SEC. ID NRO.: 29L.....
SEC. ID NRO.: 30E.....
SEC. ID NRO.: 31
SEC. ID NRO.: 32F.....
SEC. ID NRO.: 33K.....
SEC. ID NRO.: 34S...F..K.S.....L.....
SEC. ID NRO.: 35S...F..K.S.....L.....

FIG. 3B

SEC. ID NRO.:14	GVPSRFSGSKDVSTNSGILLISGLQSEDEADYYCMTWSSNGSGVFGGGTQLTVLG
SEC. ID NRO.:37A.A.T.....I.P..A.....
SEC. ID NRO.:38A.....Q.....
SEC. ID NRO.:39A.....
SEC. ID NRO.:40
SEC. ID NRO.:41
SEC. ID NRO.:42
SEC. ID NRO.:43
SEC. ID NRO.:44
SEC. ID NRO.:45A.....
SEC. ID NRO.:46
SEC. ID NRO.:47T.....
SEC. ID NRO.:48
SEC. ID NRO.:49P.....
SEC. ID NRO.:50
SEC. ID NRO.:51I.....
SEC. ID NRO.:52L.....
SEC. ID NRO.:53
SEC. ID NRO.:54
SEC. ID NRO.:55
SEC. ID NRO.:56
SEC. ID NRO.:57
SEC. ID NRO.:58
SEC. ID NRO.:59A.....
SEC. ID NRO.:60A.....
SEC. ID NRO.:61T.....
SEC. ID NRO.:62I.....
SEC. ID NRO.:63P.....
SEC. ID NRO.:64A.....
SEC. ID NRO.:65I.T.....

FIG. 4A

SEC. ID NRO.: 14	QAVLTQPASLSASPGESARLTCTLPSDINVRYYNIWYQQKPGSPRRYLLYYSDSHKGGGS
SEC. ID NRO.: 66
SEC. ID NRO.: 67
SEC. ID NRO.: 68
SEC. ID NRO.: 69
SEC. ID NRO.: 70
SEC. ID NRO.: 71
SEC. ID NRO.: 72
SEC. ID NRO.: 73E.....
SEC. ID NRO.: 74G.....
SEC. ID NRO.: 75N.....
SEC. ID NRO.: 76P.....
SEC. ID NRO.: 77S.....
SEC. ID NRO.: 78E.....
SEC. ID NRO.: 79P.....
SEC. ID NRO.: 80E.....
SEC. ID NRO.: 81Q.....
SEC. ID NRO.: 82P.....
SEC. ID NRO.: 83N.....
SEC. ID NRO.: 84T.....
SEC. ID NRO.: 85D.....
SEC. ID NRO.: 86E.....
SEC. ID NRO.: 87H.....
SEC. ID NRO.: 88Q.....
SEC. ID NRO.: 89N.....
SEC. ID NRO.: 90P.....
SEC. ID NRO.: 91D.....
SEC. ID NRO.: 92GS.....
SEC. ID NRO.: 93GS.....
SEC. ID NRO.: 94GS.....Q.....
SEC. ID NRO.: 95S.....Q.....

FIG. 4B

SEC. ID NRO.:96GS.....Q.....
SEC. ID NRO.:97S.....Q.....
SEC. ID NRO.:98GS.....E.....
SEC. ID NRO.:99S.....E.....
SEC. ID NRO.:100GS.....E.....
SEC. ID NRO.:101S.....E.....
SEC. ID NRO.:102GS.....Q.....
SEC. ID NRO.:103S.....Q.....
SEC. ID NRO.:104GS.....Q.....
SEC. ID NRO.:105S.....Q.....
SEC. ID NRO.:106GS.....E.....
SEC. ID NRO.:107S.....E.....
SEC. ID NRO.:108GS.....E.....
SEC. ID NRO.:109S.....E.....

FIG. 4C

SEC. ID NRO.:14	GVPSRFGSKDVSTNSGILLISGLQSEDEADYYCMTWSSNGSGVFGGGTQLTVLG
SEC. ID NRO.:66I.T...L.....
SEC. ID NRO.:67Q.....I.T.....
SEC. ID NRO.:68T.....I.T.....
SEC. ID NRO.:69G.....I.T.....
SEC. ID NRO.:70H.....I.T.....
SEC. ID NRO.:71K.....I.T.....
SEC. ID NRO.:72P.....I.T.....
SEC. ID NRO.:73I.T.....I.T.....
SEC. ID NRO.:74I.T.....I.T.....
SEC. ID NRO.:75I.T.....I.T.....
SEC. ID NRO.:76I.T.....I.T.....
SEC. ID NRO.:77I.T.....I.T.....
SEC. ID NRO.:78I.T.....I.T.....
SEC. ID NRO.:79I.T.....I.T.....
SEC. ID NRO.:80I.T.....I.T.....
SEC. ID NRO.:81I.T.....I.T.....
SEC. ID NRO.:82I.T.....I.T.....
SEC. ID NRO.:83I.T.....I.T.....
SEC. ID NRO.:84I.T.....I.T.....
SEC. ID NRO.:85I.T.....I.T.....
SEC. ID NRO.:86I.T.....I.T.....
SEC. ID NRO.:87I.T.....I.T.....
SEC. ID NRO.:88I.T.....I.T.....
SEC. ID NRO.:89I.T.....I.T.....
SEC. ID NRO.:90I.T.....I.T.....
SEC. ID NRO.:91I.T.....I.T.....
SEC. ID NRO.:92I.T...L...Q.....
SEC. ID NRO.:93I.T...L...E.....
SEC. ID NRO.:94I.T...L...E.....
SEC. ID NRO.:95I.T...L...E.....

FIG. 4D

SEC. ID NRO.:96	I.T..L..Q.....
SEC. ID NRO.:97	I.T..L..Q.....
SEC. ID NRO.:98	I.T..L..E.....
SEC. ID NRO.:99	I.T..L..E.....
SEC. ID NRO.:100	I.T..L..Q.....
SEC. ID NRO.:101	I.T..L..Q.....
SEC. ID NRO.:102	I.T..L..E.....
SEC. ID NRO.:103	I.T..L..E.....
SEC. ID NRO.:104	I.T..L..Q.....
SEC. ID NRO.:105	I.T..L..Q.....
SEC. ID NRO.:106	I.T..L..E.....
SEC. ID NRO.:107	I.T..L..E.....
SEC. ID NRO.:108	I.T..L..Q.....
SEC. ID NRO.:109	I.T..L..Q.....

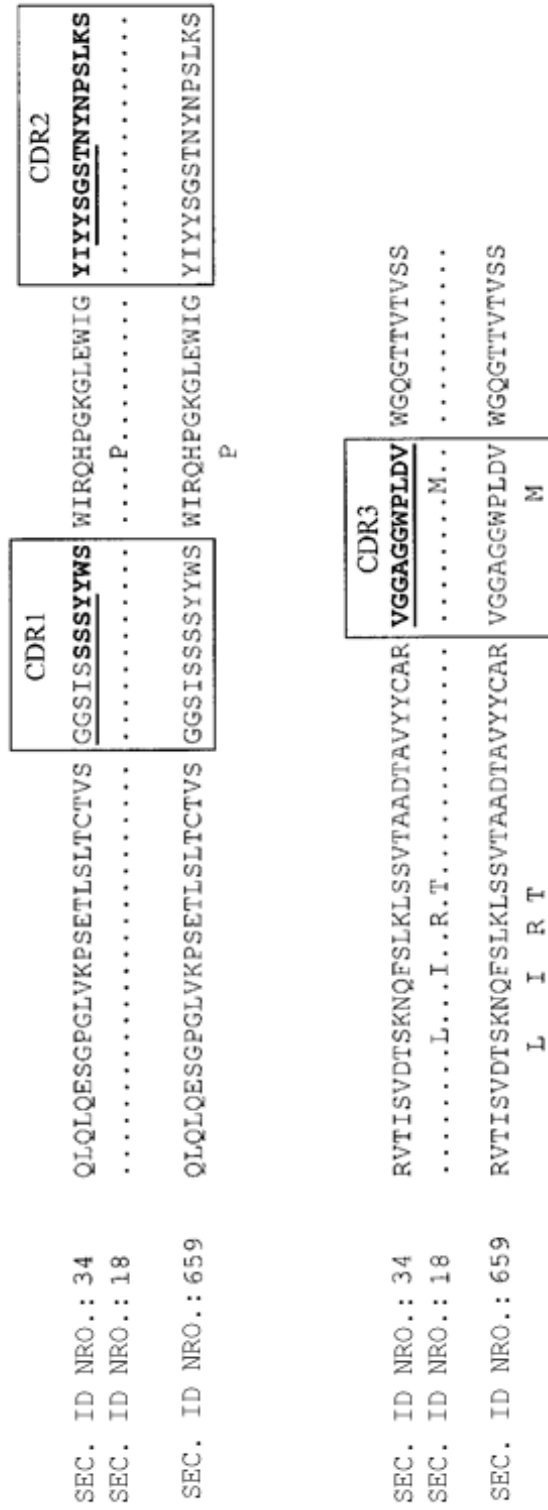


FIG. 5

SEC. ID NRO.: 65	QAVLTQPASLSASPGESARLTC	CDR1 TLPSDINRYNIY	WYQQKPGSPRYLLY	CDR2 YSDSHKQGS
SEC. ID NRO.: 68E.....
SEC. ID NRO.: 86Q.....
SEC. ID NRO.: 88
SEC. ID NRO.: 92GS.....
SEC. ID NRO.: 93GS.....
SEC. ID NRO.: 660GS.....E.....
SEC. ID NRO.: 661GS.....E.....
SEC. ID NRO.: 662GS.....Q.....
SEC. ID NRO.: 663GS.....Q.....
SEC. ID NRO.: 700GS.....
SEC. ID NRO.: 701GS.....
SEC. ID NRO.: 664	QAVLTQPASLSASPGESARLTC	TLPSDINRYNIY GS	WYQQKPGSPRYLLY	YSDSHKQGS Q E
SEC. ID NRO.: 65	GVPSRFGSKDVSTNSGILLISGLQSEDIATYYC	CDR3 MTWSSNGSGV	FGGGTQLTVLG	
SEC. ID NRO.: 68T.....
SEC. ID NRO.: 86
SEC. ID NRO.: 88
SEC. ID NRO.: 92L...Q.....
SEC. ID NRO.: 93L...E.....
SEC. ID NRO.: 660L...Q.....
SEC. ID NRO.: 661L...E.....
SEC. ID NRO.: 662L...Q.....
SEC. ID NRO.: 663L...E.....
SEC. ID NRO.: 700L...Q.....
SEC. ID NRO.: 701L...E.....
SEC. ID NRO.: 664	GVPSRFGSKDVSTNSGILLISGLQSEDIATYYC	MTWSSNGSGV	FGGGTQLTVLG	
	T	L Q E		

FIG. 6

FIG. 7A

SEC. ID NRO.:114	EVQLQQSGPEVGRPGSSVKISKASGYTFTDYIMHHWVKQSPGQGLEWIGWIDPEYGRD YAEKFKK
SEC. ID NRO.:115	...V...A..KK..AT...V.....V.....Q..A..K...M.....Q..G
SEC. ID NRO.:116	...V...A..KK..AT...V.....V.....Q..A..K...M.....Q..G
SEC. ID NRO.:117	Q...V...A..KK..A..V.....R..A.....M.....Q..LQG
SEC. ID NRO.:118	Q...V...A..KK..A..V.....R..A.....M.....Q..LQG
SEC. ID NRO.:119	Q...V...A..KK..A..V...V...L.....R..A..K...M.....Q..QG
SEC. ID NRO.:120	Q...V...A..KK..A..V...V...L.....R..A..K...M.....Q..QG
SEC. ID NRO.:121	Q...V...A..KK..A..V...V...L.....R..A..K...M.....Q..QG
SEC. ID NRO.:122	Q...V...A..KK..A..V...V...L.....R..A..K...M.....Q..QG
SEC. ID NRO.:123	QM..V...A..KKT.....V.....R..A..A..M.....Q..QD
SEC. ID NRO.:124	QM..V...A..KKT.....V.....R..A..A..M.....Q..QD
SEC. ID NRO.:114	KATLTADTSSSTAYIQLSSLASEDTATYFCARSAHTTGGFAYWGQGLVTVSS
SEC. ID NRO.:115	RV..I...TD...ME...R...V..Y..T.....
SEC. ID NRO.:116	RV..I...TD...ME...R...V..Y..T.....
SEC. ID NRO.:117	RV..M..T...T...ME..R..R..D...V..Y..T.....
SEC. ID NRO.:118	RV..M...T...ME..R..R..D...V..Y..T.....
SEC. ID NRO.:119	RV..M..E...TD...ME...R...V..Y..T.....
SEC. ID NRO.:120	RV..M...T...ME..R..R..D...V..Y..T.....
SEC. ID NRO.:121	RV..M..E...TD...ME...R...V..Y..T.....
SEC. ID NRO.:122	RV..M..E...TD...ME...R...V..Y..T.....
SEC. ID NRO.:123	RV..I..R..R..M...ME...R...M..Y.....
SEC. ID NRO.:124	RV..I...R..M...ME...R...M..Y.....

FIG. 7B

SEC. ID NRO.: 132	EVQLQDSGPEVGRPGSSVKISCKASGYIFTDYIMHWVKQSPGGQGLEWIGWIDPEYGSTDYAEKFKK
SEC. ID NRO.: 133 V . . . A . KK . AT V . . . T Q . A . K . . . M QG
SEC. ID NRO.: 134 V . . . A . KK . AT V Q . A . K . . . M QG
SEC. ID NRO.: 135 V . . . A . KK . AT V . . . T Q . A . K . . . M QG
SEC. ID NRO.: 136	Q . . . V . . . A . KK . A . V T R . A M Q . LQG
SEC. ID NRO.: 137	Q . . . V . . . A . KK . A . V T R . A M Q . LQG
SEC. ID NRO.: 138	Q . . . V . . . A . KK . A . V . . . V . . . TL R . A . K . . . M Q . QG
SEC. ID NRO.: 139	Q . . . V . . . A . KK . A . V . . . V . . . TL R . A . K . . . M Q . QG
SEC. ID NRO.: 140	Q . . . V . . . A . KK . A . V . . . V . . . TL R . A . K . . . M Q . QG
SEC. ID NRO.: 141	QM . . V . . A . KKT V T R . A . . . A . . M Q . QD
SEC. ID NRO.: 142	QM . . V . . A . KKT V T R . A . . . A . . M Q . QD
SEC. ID NRO.: 132	KATLTADTSSSTAYIQLSLTSSETATYFCARVAIIITTVASGGFAYWGQGLVTVSS
SEC. ID NRO.: 133	RV . I TD . . ME R V . Y . T
SEC. ID NRO.: 134	RV . I TD . . ME R V . Y . T
SEC. ID NRO.: 135	RV . I TD . . ME R V . Y
SEC. ID NRO.: 136	RV . M . T . . . T . . ME . R . R . D . . V . Y
SEC. ID NRO.: 137	RV . M T . . ME . R . R . D . . V . Y
SEC. ID NRO.: 138	RV . M . E . . TD . . ME R V . Y . T
SEC. ID NRO.: 139	RV . M TD . . ME R V . Y . T
SEC. ID NRO.: 140	RV . M . E . . TD . . ME R V . Y
SEC. ID NRO.: 141	RV . I . R . R . M . . ME R M . Y
SEC. ID NRO.: 142	RV . I . . . R . R . M . . ME R M . Y

FIG. 7C

SEC. ID NRO.: 148	EVQLQDSPEVGRPGSSVKISCKASGYTFD <u>SYMNVWVKQSPGQGLEWIGWIDPEYGR</u> TDVAEKFKK
SEC. ID NRO.: 149	Q...V...A...KK.A...V...V...L...L...R.A..K...M.....Q..QG
SEC. ID NRO.: 150	Q...V...A...KK.A...V...V...L...L...R.A..K...M.....Q..QG
SEC. ID NRO.: 151	Q...V...A...KK.A...V...V...L...L...R.A..K...M.....Q..QG
SEC. ID NRO.: 152	Q...V...A...KK.A...V...V...L...L...R.A..K...M.....Q..QG
SEC. ID NRO.: 153	QM..V...A...KKT.....V.....R.A..A...M.....Q..QD
SEC. ID NRO.: 154	QM..V...A...KKT.....V.....R.A..A...M.....Q..QD
SEC. ID NRO.: 155V...A...KK..AT.....V.....Q.A..K...M.....Q..QG
SEC. ID NRO.: 156V...A...KK..AT.....V.....Q.A..K...M.....Q..QG
SEC. ID NRO.: 148	KATLTADSSSTAYIYLSGLTSEDTATYFCARTKYNSGYGFPYWGQGSLSLTVSS
SEC. ID NRO.: 149	RV.M.E.T.TD...ME..S.R.....V.Y..T.....TT.....
SEC. ID NRO.: 150	RV.M...T.TD...ME..S.R.....V.Y..T.....TT.....
SEC. ID NRO.: 151	RV.M.E.T.TD...ME..S.R.....V.Y.....TT.....
SEC. ID NRO.: 152	RV.M...T.TD...ME..S.R.....V.Y.....TT.....
SEC. ID NRO.: 153	RV.I.R.R.M...ME..S.R.....M.Y.....TT.....
SEC. ID NRO.: 154	RV.I...R.M...ME..S.R.....M.Y.....TT.....
SEC. ID NRO.: 155	RV.I...T.TD...ME..S.R.....V.Y..T.....TT.....
SEC. ID NRO.: 156	RV.I...T.TD...ME..S.R.....V.Y.....TT.....

FIG. 8A

SEC. ID NRO.:	125	DIQMTQSPASLSASLG	TVTIECRASEDIYSNLA	WYQQKPGNSPQLLIYDANS	LAD
SEC. ID NRO.:	126ST.....	V.DR...T.....KA.K.....
SEC. ID NRO.:	127L.....	SE...V.DR...T.....KA.K.....
SEC. ID NRO.:	128S.V.....	V.DR...T.....KA.K.....
SEC. ID NRO.:	129	A.L.....	S...V.DR...T.....KA.K.....
SEC. ID NRO.:	130S.....	V.DR...T.....	EKA.KS
SEC. ID NRO.:	131	E.V.....	T.V.P..RA.LS.....	QA.R.....
SEC. ID NRO.:	125	GVPSRFSASGSGTQ	FLKINSLRSE	DVASYFCQQYNNYPYTFGAGTKLELKR	
SEC. ID NRO.:	126G.....	E.T.T.S..QPD.F.T.Y.....Q.....	I..
SEC. ID NRO.:	127G.....	E.T.T.S..QP..F.T.Y.....Q.....	I..
SEC. ID NRO.:	128G.....	D.T.T.S..QP..F.T.Y.....Q.....	I..
SEC. ID NRO.:	129G.....	D.T.T.S..QP..F.T.Y.....Q.....	I..
SEC. ID NRO.:	130G.....	D.T.T.S..QP..F.T.Y.....Q.....	I..
SEC. ID NRO.:	131	I.A.....	E.T.T.S..Q...F.V.Y.....Q.....	I..

FIG. 8B

SEC. ID NRO.:	143	DIVMTQGALPNVPVSGESASITCQSS <u>ESLLHSNGKTYLNWY</u> LQRPFGQSPQLLIYWMSTRAA
SEC. ID NRO.:	144TP.SS..TL.QP...S.....LQ.....P.R.....
SEC. ID NRO.:	145SP.SL..TP..P...S.....K.....
SEC. ID NRO.:	146TP.SLS.TP.QP...S.....K..P.....
SEC. ID NRO.:	147	.V.....SP.SL..TL.QP...S.....FQ.....RR.....
SEC. ID NRO.:	143	GVSDRFSGSGTDFTLTISGVEAEDVGVYCCQQFLEYPPTFGSGTKLEIKR
SEC. ID NRO.:	144	..P.....A.....K..R.....Q.....
SEC. ID NRO.:	145	..P.....K..R.....Q.....
SEC. ID NRO.:	146	..P.....K..R.....Q.....
SEC. ID NRO.:	147	..P.....K..R.....Q.....

FIG. 8C

SEC. ID NRO.: 157	DIVMTQSP	SISISV	GERVT	MNCKAS	QNVDSD	VDWY	QQKT	GQSP	KLLIYK	ASNRYT
SEC. ID NRO.: 158	..QL...	..SFL.A...	..D...IT...P.KA.....
SEC. ID NRO.: 159	..Q....	..S.V.A...	..D...IT...P.KA.....
SEC. ID NRO.: 160	A.QL...	..S.L.A...	..D...IT...P.KA.....
SEC. ID NRO.: 161	..Q....	..S.L.A...	..D...IT...P.KA.....
SEC. ID NRO.: 162	E..L...	..ATL.L.P...	..A.LS...P..A.R.....
SEC. ID NRO.: 163	E.....	..ATL.V.P...	..A.LS...P..A.R.....
SEC. ID NRO.: 164	E..L...	..DFQ.VTPK.K...	..IT.....PD.....K.....
SEC. ID NRO.: 157	GVPDRFT	CSCSGT	DFTFT	TISNM	QAEDL	AVYCM	QSNTH	PRTF	GGTK	LKLKR
SEC. ID NRO.: 158	...S.S...	...E.L...	...SL.P...	..F.T...V.I...
SEC. ID NRO.: 159	...S.S...	...L...	...SL.P...	..F.T...V.I...
SEC. ID NRO.: 160	...S.S...	...L...	...SL.P...	..F.T...V.I...
SEC. ID NRO.: 161	...S.S...	...L...	...SL.P...	..I.T...V.I...
SEC. ID NRO.: 162	.I.A.S...	...R...L...	...SLEP...	..F.....V.I...
SEC. ID NRO.: 163	.I.A.S...	...E.L...	...SL.S...	..F.....V.I...
SEC. ID NRO.: 164	...S.S...	...L...NSLE...	..A.T...V.I...

FIG. 9A

SEC. ID NRO.: 156	EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSGYTF	FTDSVMNWVQQAPGKGLEWNGWIDPEYGR	TDVAEK	FQGG
SEC. ID NRO.: 165E.....
SEC. ID NRO.: 166G.....
SEC. ID NRO.: 167H.....
SEC. ID NRO.: 168Q.....
SEC. ID NRO.: 169S.....
SEC. ID NRO.: 170V.....
SEC. ID NRO.: 171E.....
SEC. ID NRO.: 172P.....
SEC. ID NRO.: 173Q.....
SEC. ID NRO.: 174S.....
SEC. ID NRO.: 175
SEC. ID NRO.: 176
SEC. ID NRO.: 177
SEC. ID NRO.: 178
SEC. ID NRO.: 179
SEC. ID NRO.: 180
SEC. ID NRO.: 197

FIG. 9B

SEC. ID NRO.: 156	RVTITADTSTDTAYMELSSIRSEDTAVYYCARTKYN <u>SGYGF</u> PPYWGQGTIVTVSS
SEC. ID NRO.: 165
SEC. ID NRO.: 166
SEC. ID NRO.: 167
SEC. ID NRO.: 168
SEC. ID NRO.: 169
SEC. ID NRO.: 170
SEC. ID NRO.: 171
SEC. ID NRO.: 172
SEC. ID NRO.: 173
SEC. ID NRO.: 174
SEC. ID NRO.: 175E.....
SEC. ID NRO.: 176G.....
SEC. ID NRO.: 177P.....
SEC. ID NRO.: 178T.....
SEC. ID NRO.: 179G.....
SEC. ID NRO.: 180T.....
SEC. ID NRO.: 197Q.....

FIG. 10B

SEC. ID NRO.: 161	GVPSRFSGSGGTDFTFTISSLQPEDIAIYYCMQSNTHPRTEFGGGTKVEIKR
SEC. ID NRO.: 183
SEC. ID NRO.: 184
SEC. ID NRO.: 181
SEC. ID NRO.: 182
SEC. ID NRO.: 185
SEC. ID NRO.: 186
SEC. ID NRO.: 187
SEC. ID NRO.: 188A.....
SEC. ID NRO.: 189E.....
SEC. ID NRO.: 190H.....
SEC. ID NRO.: 191K.....
SEC. ID NRO.: 192P.....
SEC. ID NRO.: 193Q.....
SEC. ID NRO.: 194S.....
SEC. ID NRO.: 195V.....
SEC. ID NRO.: 196D.....
SEC. ID NRO.: 198

SEC. ID NRO.: 165	EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKV	CDR1	WYQQEFGKGLWVG	CDR2
SEC. ID NRO.: 166	GYTFD SVMNG.....	WIDPEYGRTDVAEKFGQ
SEC. ID NRO.: 167H.....
SEC. ID NRO.: 179A.....
SEC. ID NRO.: 180A.....
SEC. ID NRO.: 156A.....
SEC. ID NRO.: 197A.....
SEC. ID NRO.: 152	Q.....L.....R.A.....Q.....
SEC. ID NRO.: 720	Q.....L.....R.G.....Q.....
SEC. ID NRO.: 721	Q.....L.....R.H.....Q.....
SEC. ID NRO.: 722	Q.....L.....R.G.....Q.....
SEC. ID NRO.: 723	Q.....L.....R.H.....Q.....
SEC. ID NRO.: 739G.....
SEC. ID NRO.: 740H.....
SEC. ID NRO.: 741G.....
SEC. ID NRO.: 742H.....
SEC. ID NRO.: 665	EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKV	CDR1	WYQQEFGKGLWVG	CDR2
	Q.....	GYTFD SVMNR G H A	WIDPEYGRTDVAEKFGQ
		L		Q

FIG. 11a

SEC. ID NRO.:	RVTITADTSTDTAYMELSSLRSED	CDR3	WGQGTITVTVSS
165	AVYYCAR	TKYNSGYGFPY
166
167
179G.....
180T.....
156
197Q.....
152M.....
720M.....
721M.....
722M.....
723M.....
739
740
741
742
665	RVTITADTSTDTAYMELSSLRSED	TKYNSGYGFPY	WGQGTITVTVSS
	AVYYCAR	G Q
		T

FIG. 11b

SEC. ID NRO.: 161	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITC	CDR1 KASQNVDSVDV	WYQQKPGKAPKLLIY	COR2 KASNRYT
SEC. ID NRO.: 182	G.....
SEC. ID NRO.: 184	Q.....
SEC. ID NRO.: 185D..
SEC. ID NRO.: 188Q..
SEC. ID NRO.: 198	G.....D..
SEC. ID NRO.: 704	G.....D..
SEC. ID NRO.: 705	Q.....QD..
SEC. ID NRO.: 706	Q.....Q..
SEC. ID NRO.: 707	G.....QD..
SEC. ID NRO.: 708	G.....Q..
SEC. ID NRO.: 709	Q.....QD..
SEC. ID NRO.: 710	Q.....Q..
SEC. ID NRO.: 711
SEC. ID NRO.: 666	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITC	KASQNVDSVDV	WYQQKPGKAPKLLIY	KASNRYT
		G		QD
		Q		
SEC. ID NRO.: 161	GVPSRFSGSGSGTDFTTISLSLPEDIATYYC	COR3 MQSNTHPT	FGGGTKVEIKR	
SEC. ID NRO.: 182	
SEC. ID NRO.: 184	
SEC. ID NRO.: 185	
SEC. ID NRO.: 188	A.....	
SEC. ID NRO.: 198	
SEC. ID NRO.: 704	A.....	
SEC. ID NRO.: 705	A.....	
SEC. ID NRO.: 706	A.....	
SEC. ID NRO.: 707	A.....	
SEC. ID NRO.: 708	A.....	
SEC. ID NRO.: 709	A.....	
SEC. ID NRO.: 710	A.....	
SEC. ID NRO.: 711	A.....	
SEC. ID NRO.: 666	GVPSRFSGSGSGTDFTTISLSLPEDIATYYC	MQSNTHPT	FGGGTKVEIKR	
		A		

FIG. 12

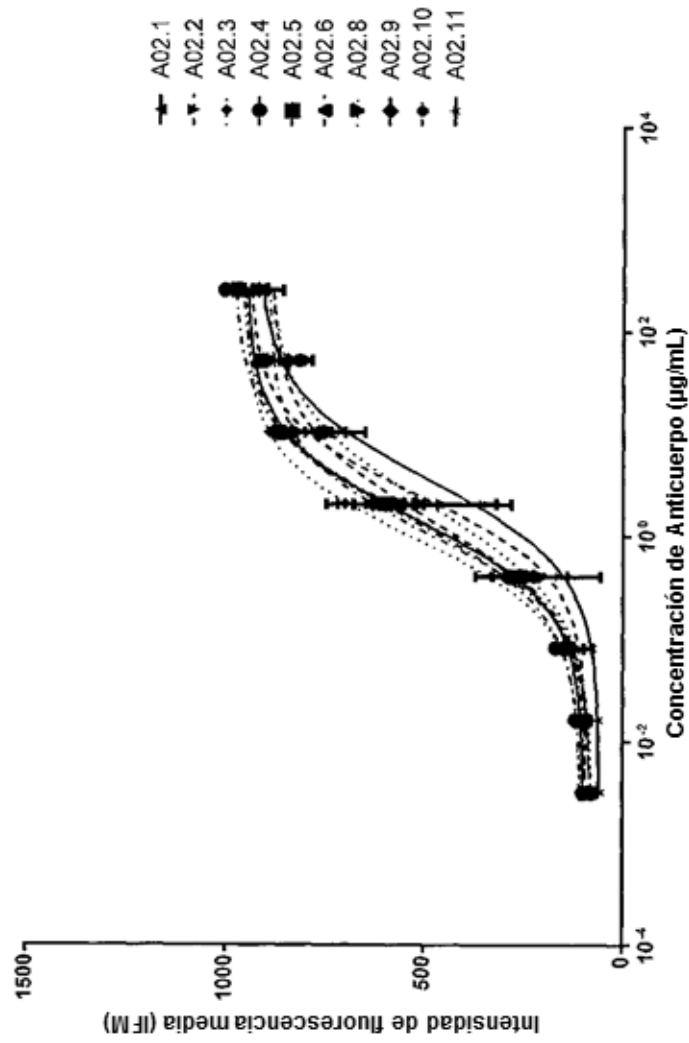


FIG. 13

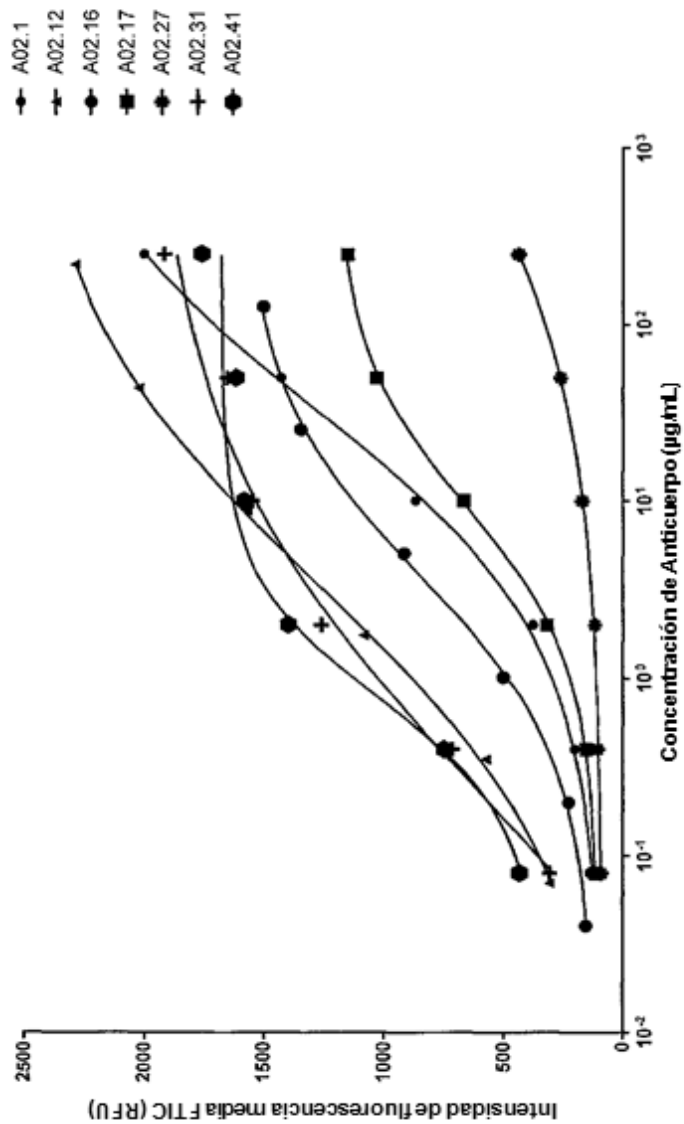


FIG. 14

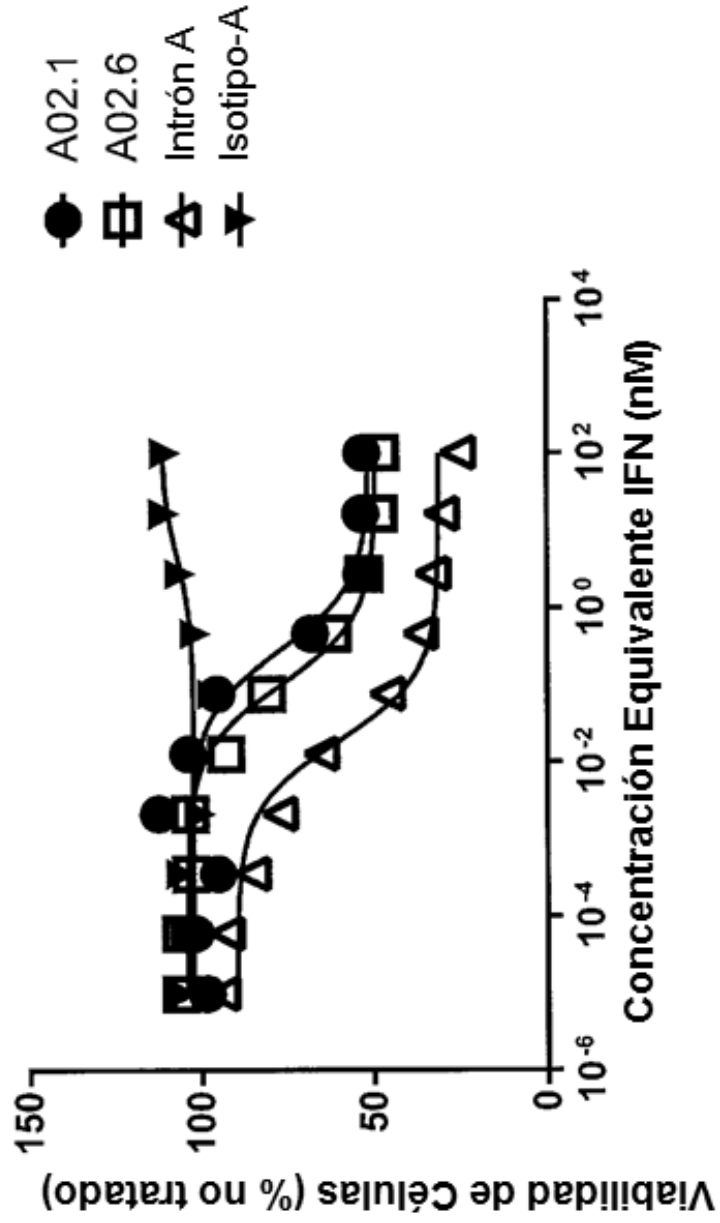


FIG. 15

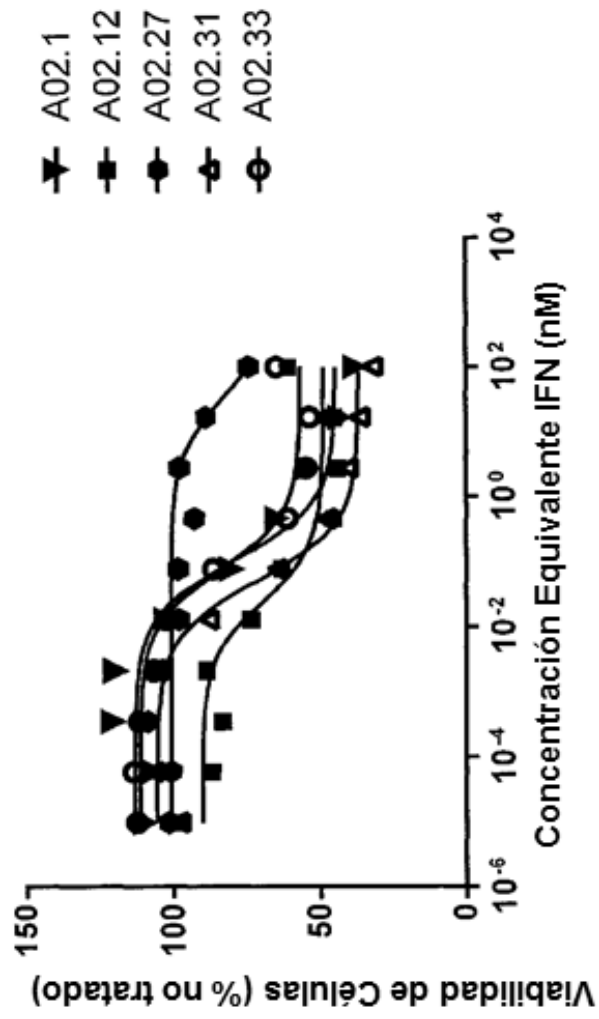


FIG. 16

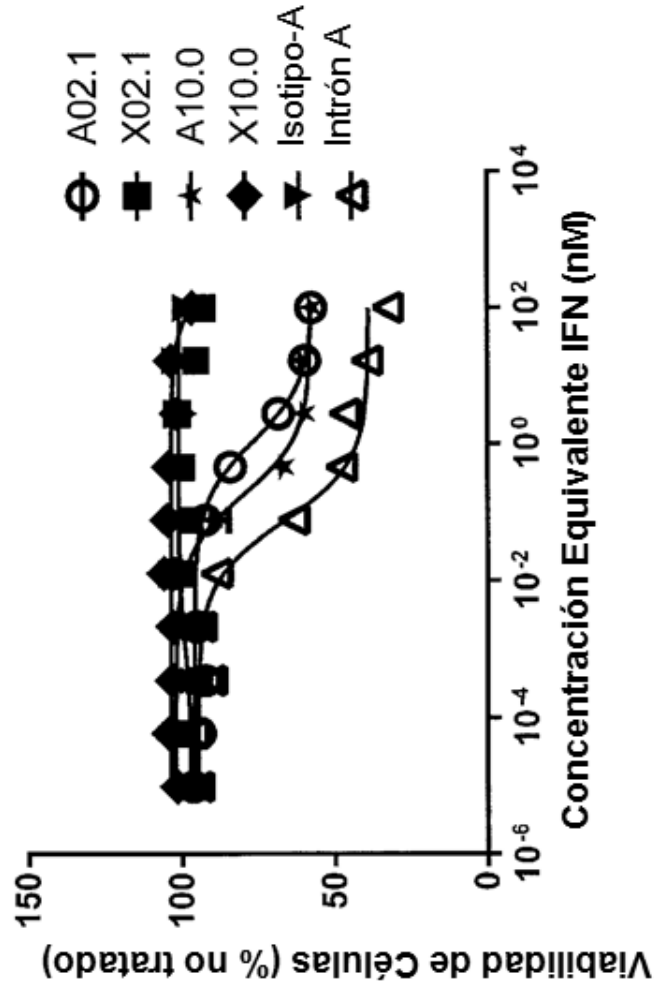


FIG. 17

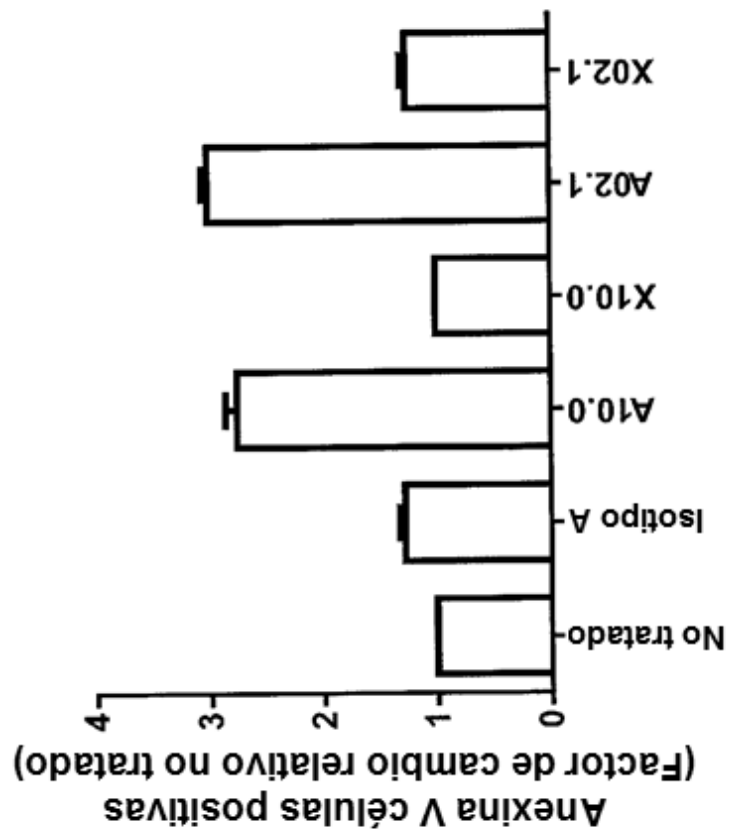


FIG. 18

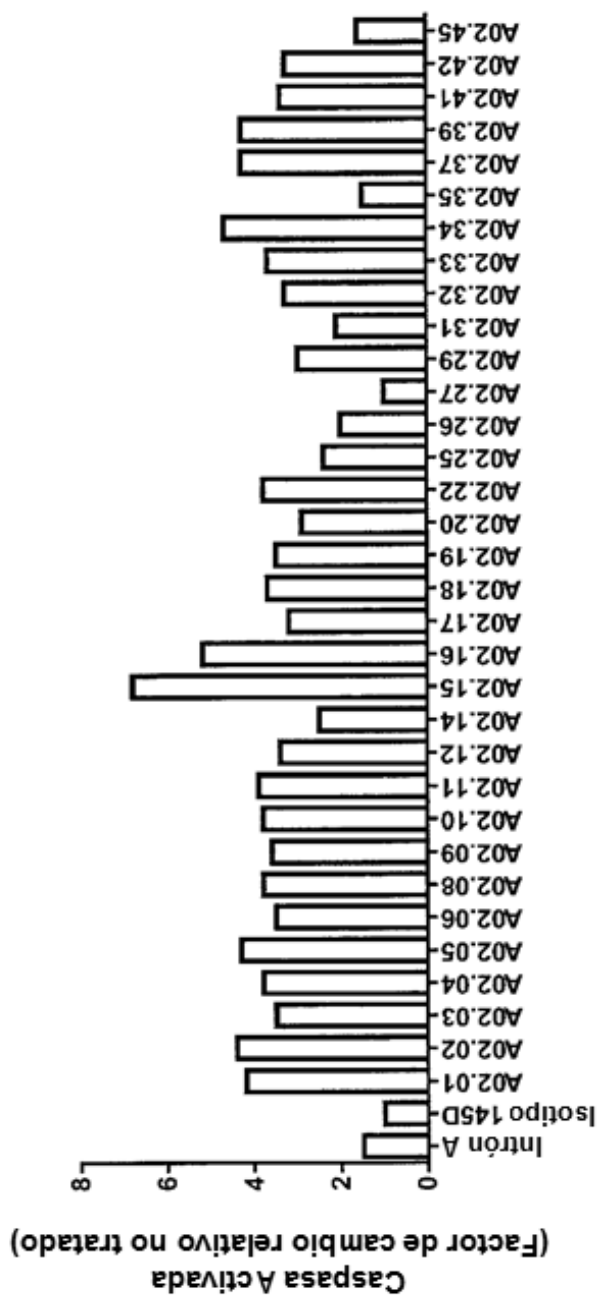


FIG. 19

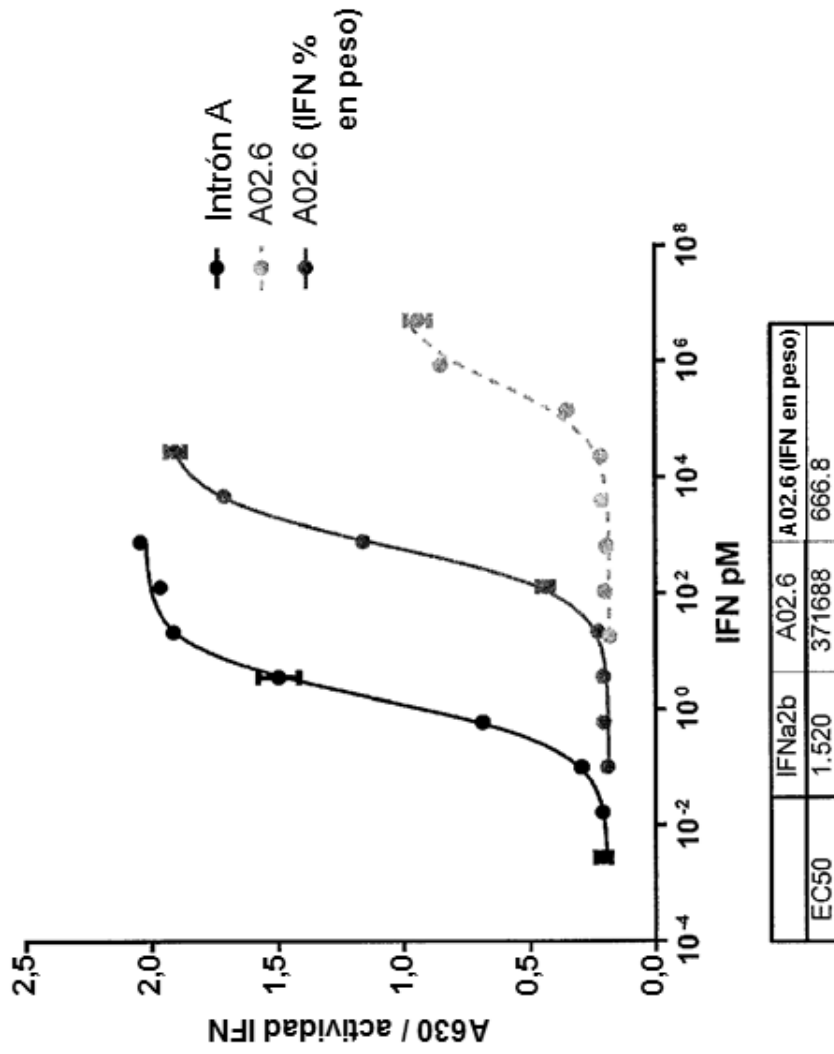


FIG. 20

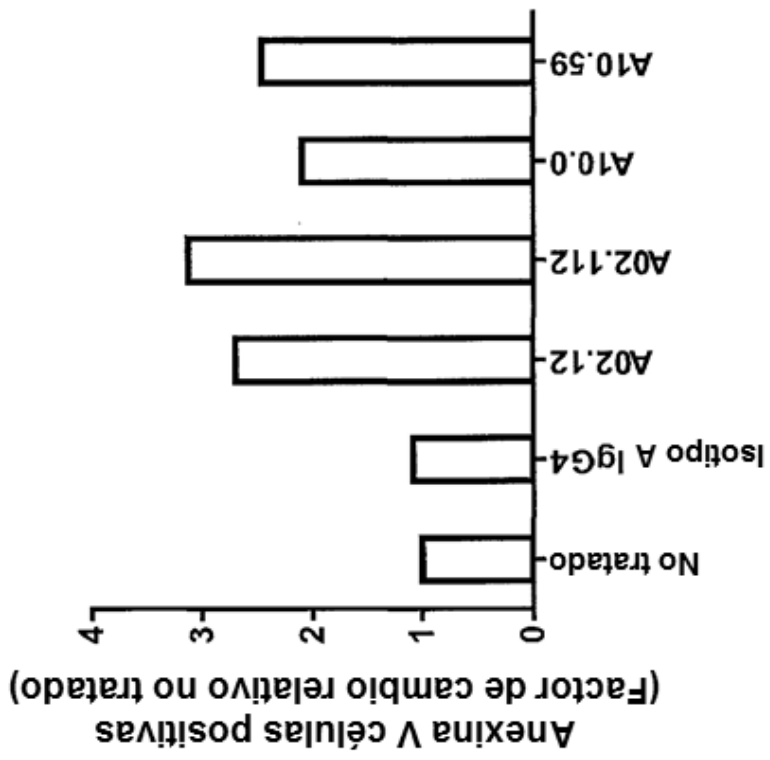


FIG. 21

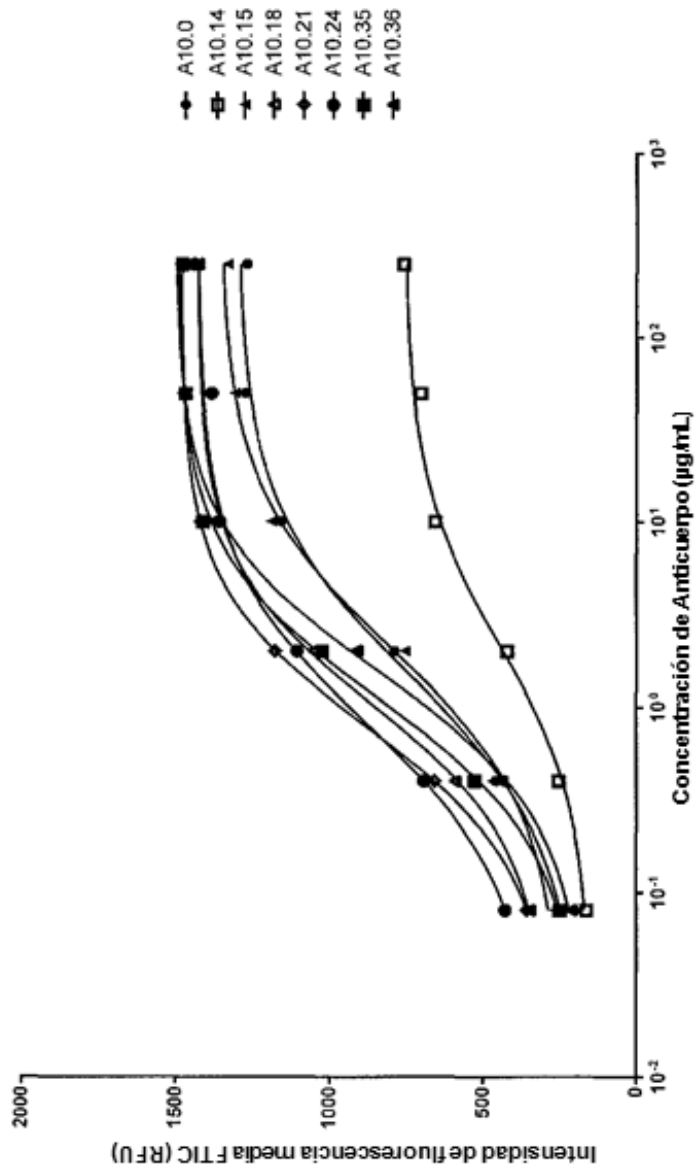


FIG. 22

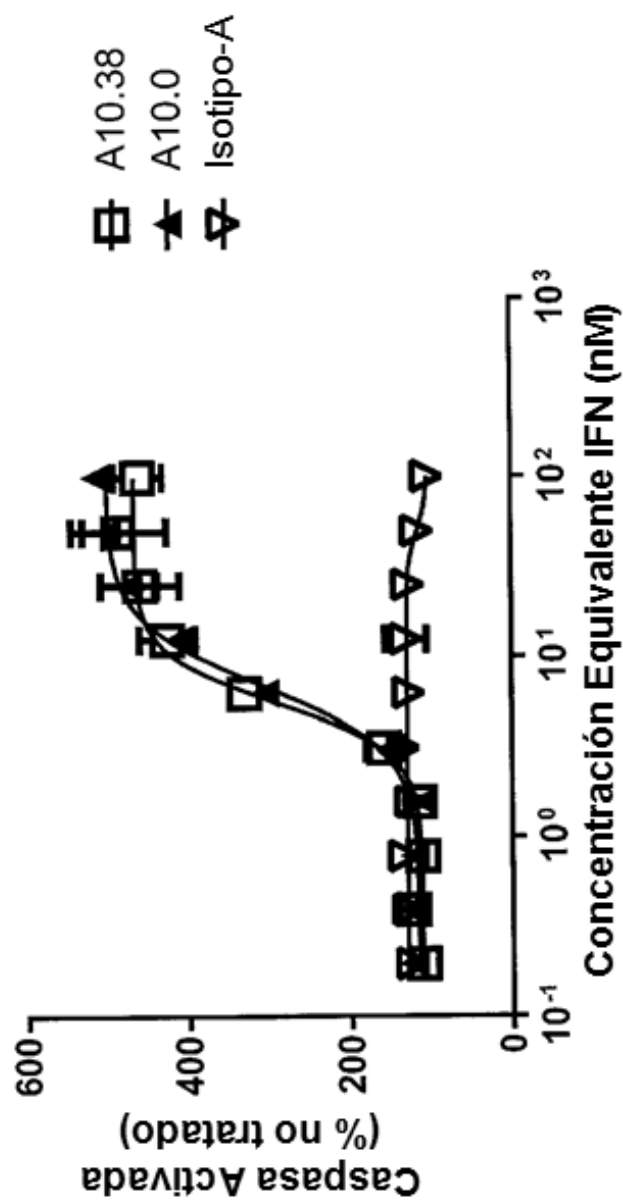


FIG. 23

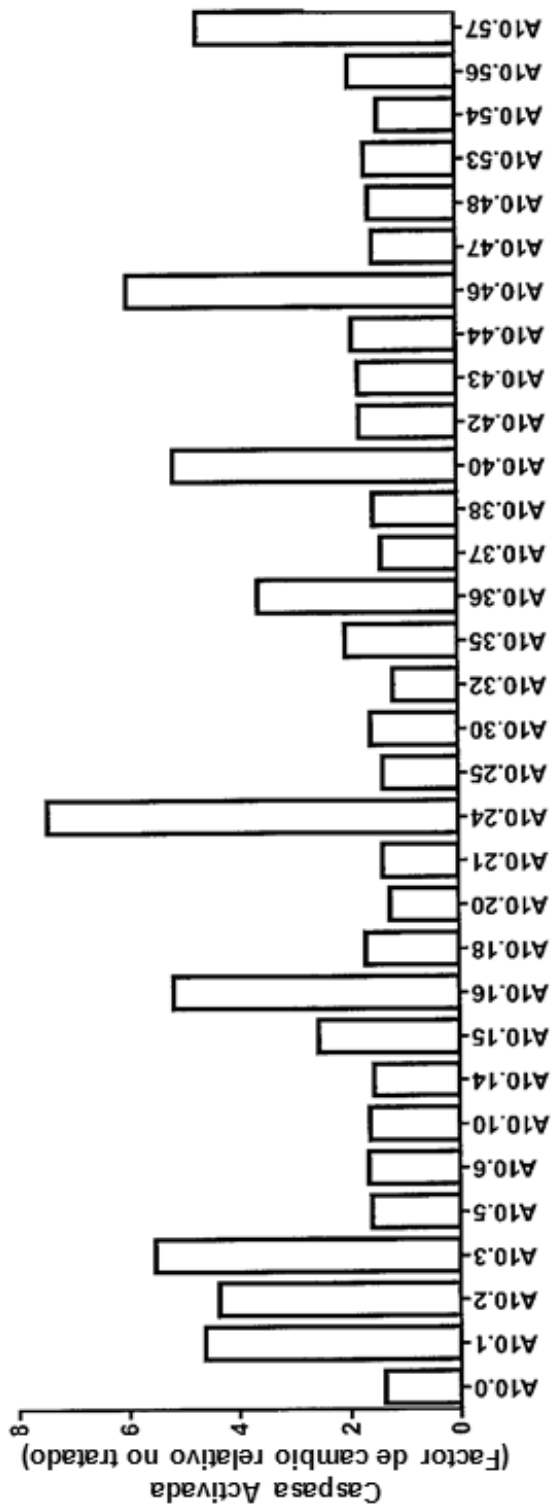


FIG. 24

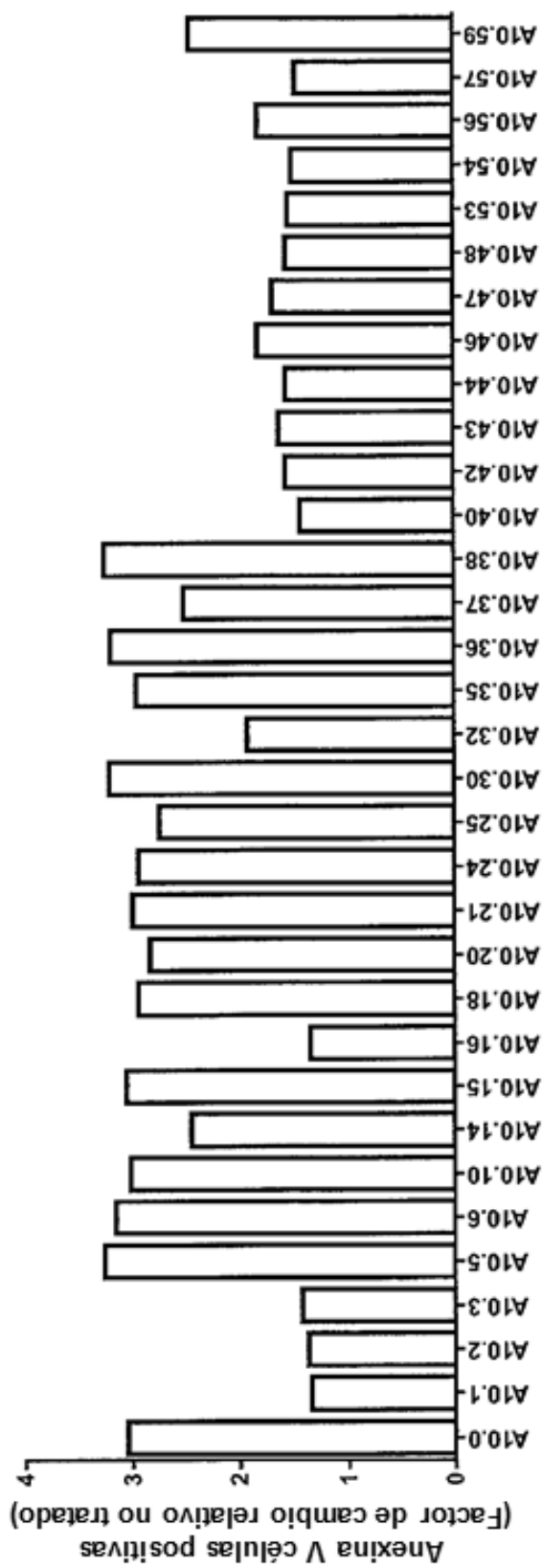


FIG. 25

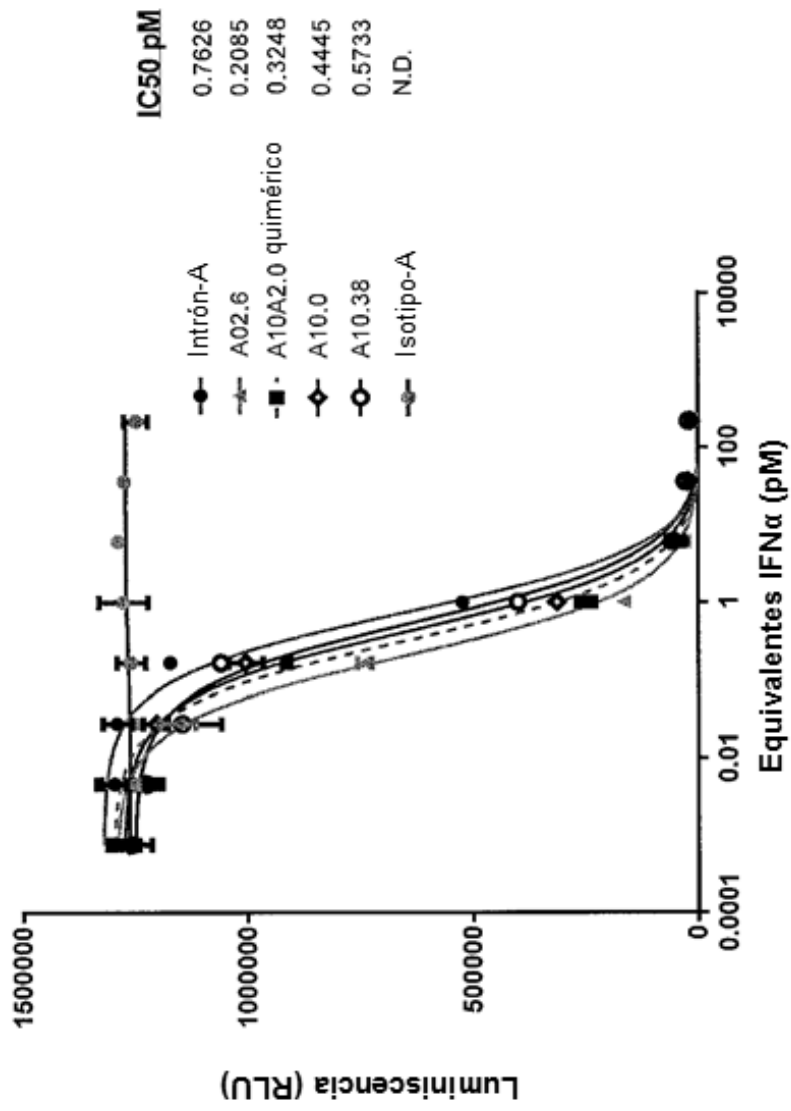


FIG. 26

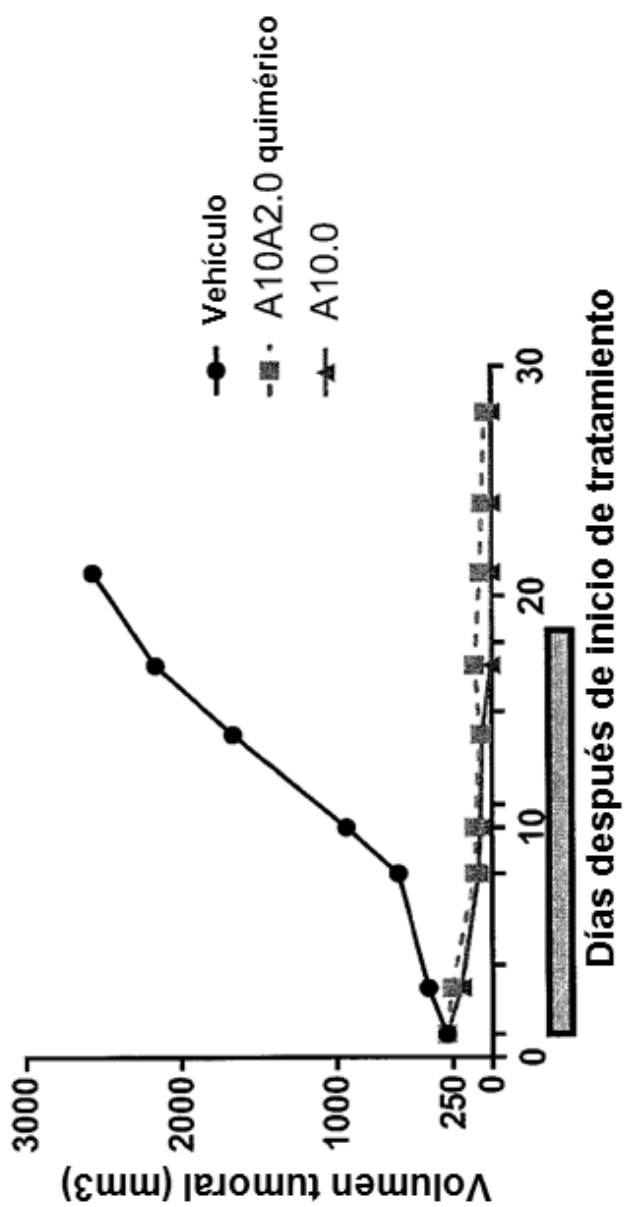


FIG. 27

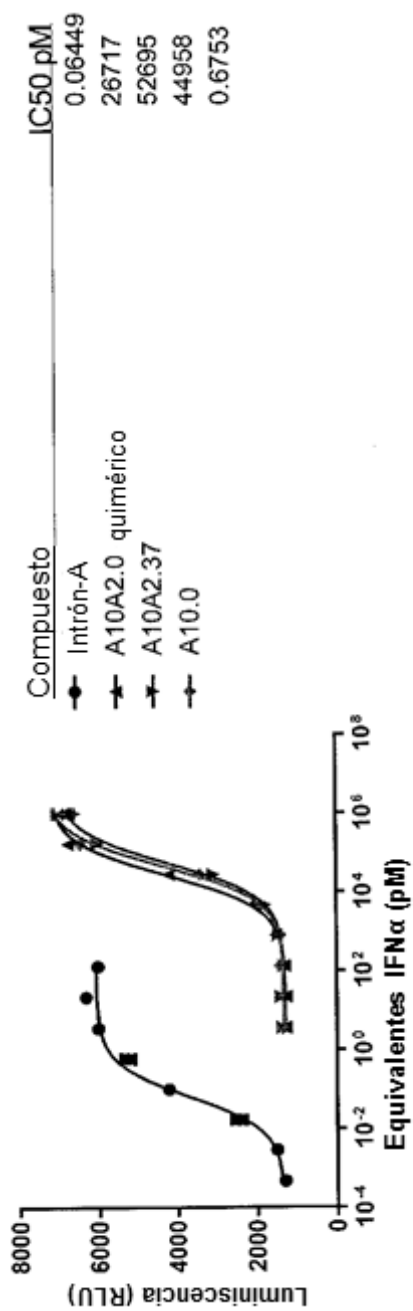


FIG. 28

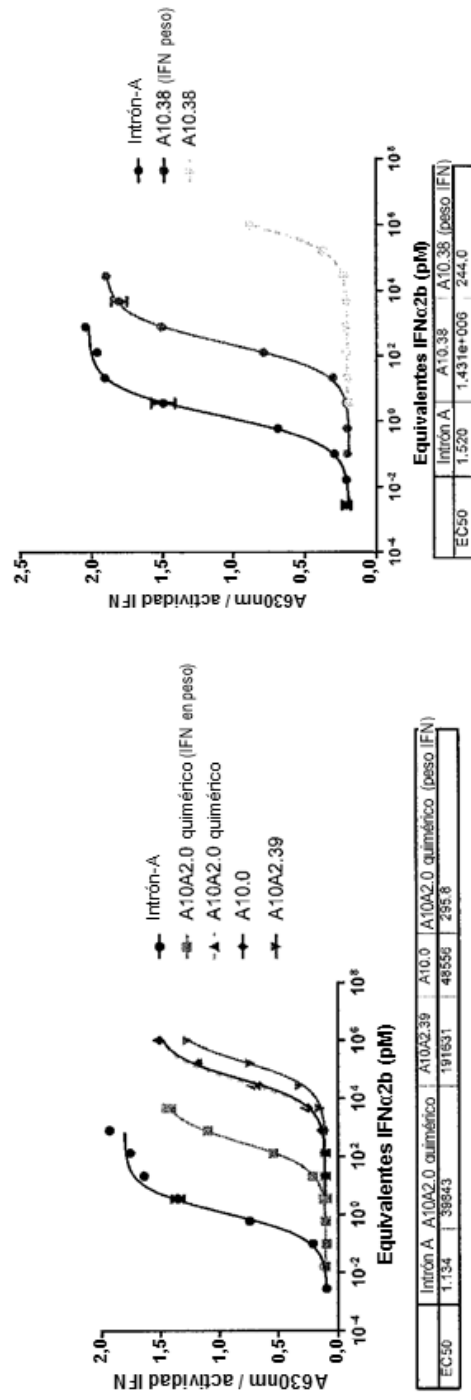


FIG. 29

SEC. ID NRO.: 110	EVQLVQSGAEVKKSGASVKVCKAS	GYTFIDYIH	WVRQAPGGLEWNG	WINPNNGGVTFAQKFQG
SEC. ID NRO.: 728P.....
SEC. ID NRO.: 729P.....
SEC. ID NRO.: 730P.....T.....
SEC. ID NRO.: 731P.....
SEC. ID NRO.: 736	EVQLVQSGAEVKKSGASVKVCKAS	GYTFIDYIH	WVRQAPGGLEWNG	WINPNNGGVTFAQKFQG
			P	T
SEC. ID NRO.: 110	RVTMTRDTSISTAYMDLSSLSRSDDTAVYFCAR	DIRMSGWLAFFDY	WGQGTLLVTVSS	
SEC. ID NRO.: 728	
SEC. ID NRO.: 729Y.....	
SEC. ID NRO.: 730	
SEC. ID NRO.: 731L.....	
SEC. ID NRO.: 736	RVTMTRDTSISTAYMDLSSLSRSDDTAVYFCAR	DIRMSGWLAFFDY	WGQGTLLVTVSS	
		Y	L	

FIG. 30