



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

(21) BR 112020026432-6 A2



(22) Data do Depósito: 15/07/2019

(43) Data da Publicação Nacional: 23/03/2021

(54) **Título:** VARIANTE DE ANTICORPO, ÁCIDO NUCLEICO ISOLADO, VETOR DE EXPRESSÃO, ÁCIDO NUCLEICO, COMBINAÇÃO DE ÁCIDOS NUCLEICOS, VEÍCULO DE DISPENSAÇÃO, CÉLULA HOSPEDEIRA RECOMBINANTE, MÉTODOS PARA PRODUÇÃO DE UMA VARIANTE DE UM ANTICORPO, PARA AUMENTAR PELO MENOS UMA FUNÇÃO EFETORA DE UM ANTICORPO PARENTAL E PARA TRATAR UMA DOENÇA, ANTICORPO, COMPOSIÇÃO, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, E, VARIANTE DE ANTICORPO PARA USO

(51) **Int. Cl.:** C07K 16/28; A61P 35/00; A61P 35/02; A61P 37/00.

(30) **Prioridade Unionista:** 13/07/2018 US 62/697,730; 16/05/2019 US 62/848,874.

(71) **Depositante(es):** GENMAB A/S.

(72) **Inventor(es):** BART E. C. G. DE GOEIJ; GRIETJE ANDRINGA; FRANK BEURSKENS; JANINE SCHUURMAN; DAVID SATIJN; TAHAMTAN AHMADI.

(86) **Pedido PCT:** PCT EP2019069028 de 15/07/2019

(87) **Publicação PCT:** WO 2020/012036 de 16/01/2020

(85) **Data da Fase Nacional:** 22/12/2020

(57) **Resumo:** VARIANTE DE ANTICORPO, ÁCIDO NUCLEICO ISOLADO, VETOR DE EXPRESSÃO, ÁCIDO NUCLEICO, COMBINAÇÃO DE ÁCIDOS NUCLEICOS, VEÍCULO DE DISPENSAÇÃO, CÉLULA HOSPEDEIRA RECOMBINANTE, MÉTODOS PARA PRODUÇÃO DE UMA VARIANTE DE UM ANTICORPO, PARA AUMENTAR PELO MENOS UMA FUNÇÃO EFETORA DE UM ANTICORPO PARENTAL E PARA TRATAR UMA DOENÇA, ANTICORPO, COMPOSIÇÃO, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, E, VARIANTE DE ANTICORPO PARA USO. Variantes de anticorpos que compreendem uma ou mais mutações na região do Fc, particularmente anticorpos anti-CD38 que compreendem uma mutação em um ou mais resíduos de aminoácidos que correspondem a E430, E345 e S440 em uma cadeia pesada de IgG1 humano, em que os resíduos de aminoácidos são numerados de acordo com o índice da UE.

```
IgG1 247 FKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEHNKATKPREQYNSTRVSVL 306
IgG1f 247 FKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEHNKATKPREQYNSTRVSVL 306
IgG2  FKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEHNKATKPREQYNSTRVSVL
IgG3  FKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEHNKATKPREQYNSTRVSVL
IgG4  FKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEHNKATKPREQYNSTRVSVL
*****

IgG1 307 TVLHQWLNGKEVKCKVSKNALPAIEKTI SKAGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLT 366
IgG1f 307 TVLHQWLNGKEVKCKVSKNALPAIEKTI SKAGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLT 366
IgG2  TVLHQWLNGKEVKCKVSKNALPAIEKTI SKAGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLT
IgG3  TVLHQWLNGKEVKCKVSKNALPAIEKTI SKAGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLT
IgG4  TVLHQWLNGKEVKCKVSKNALPAIEKTI SKAGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLT
*****

IgG1 367 CLVKGFPYSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLVDRSRWQGNVPSCS 426
IgG1f 367 CLVKGFPYSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLVDRSRWQGNVPSCS 426
IgG2  CLVKGFPYSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLVDRSRWQGNVPSCS
IgG3  CLVKGFPYSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLVDRSRWQGNVPSCS
IgG4  CLVKGFPYSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLVDRSRWQGNVPSCS
*****

IgG1 427 VMHEALNNHYTKQSLSLSPGK 447
IgG1f 427 VMHEALNNHYTKQSLSLSPGK 447
IgG2  VMHEALNNHYTKQSLSLSPGK
IgG3  VMHEALNNHYTKQSLSLSPGK
IgG4  VMHEALNNHYTKQSLSLSPGK
*****
```

VARIANTE DE ANTICORPO, ÁCIDO NUCLEICO ISOLADO, VETOR DE EXPRESSÃO, ÁCIDO NUCLEICO, COMBINAÇÃO DE ÁCIDOS NUCLEICOS, VEÍCULO DE DISPENSAÇÃO, CÉLULA HOSPEDEIRA RECOMBINANTE, MÉTODOS PARA PRODUÇÃO DE UMA VARIANTE DE UM ANTICORPO, PARA AUMENTAR PELO MENOS UMA FUNÇÃO EFETORA DE UM ANTICORPO PARENTAL E PARA TRATAR UMA DOENÇA, ANTICORPO, COMPOSIÇÃO, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, E, VARIANTE DE ANTICORPO PARA USO CAMPO DA INVENÇÃO

[001] Variantes de anticorpos que compreendem uma ou mais mutações na região do Fc, particularmente variantes de anticorpos anti-CD38.

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

[002] CD38 é uma glicoproteína transmembranar do tipo II, normalmente encontrada em células hematopoiéticas e em níveis baixos em tecidos sólidos. A expressão de CD38 nas células hematopoiéticas depende da diferenciação e do estado de ativação da célula. As células hematopoiéticas comprometidas com a linhagem expressam a proteína, enquanto ela é perdida pelas células maduras e expressada novamente em linfócitos ativados. A CD38 também é expressada nas células B, em que as células plasmáticas expressam níveis particularmente elevados de CD38. Aproximadamente 80% das células NK em repouso e monócitos expressam CD38 em níveis mais baixos, assim como vários outros tipos de células hematológicas, incluindo linfoblastos de centro germinativo de linfonodos, células intrafoliculares, células dendríticas, eritrócitos e plaquetas (Lee e Aarhus 1993; Zocchi, Franco *et al.* 1993; Malavasi, Funaro *et al.* 1994; Ramaschi, Torti *et al.* 1996). No que se refere aos tecidos sólidos, a CD38 é expressada no intestino por células intraepiteliais e linfócitos da lâmina própria, por células de Purkinje e emaranhados neurofibrilares no cérebro, por células epiteliais na próstata, células β no pâncreas, osteoclastos no osso, células retiniais do olho e

sarcolema de músculo liso e estriado.

[003] A CD38 é expressada em um grande número de doenças malignas hematológicas. A expressão foi observada particularmente nas células malignas de mieloma múltiplo (MM) (Lin, Owens *et al.* 2004) e leucemia linfocítica crônica (CLL) (Damle 1999), e também foi relatada na macroglobulinemia de Waldenström (Konoplev, Medeiros *et al.* 2005), amiloidose sistêmica primária (Perfetti, Bellotti *et al.* 1994), linfoma de células do manto (Parry-Jones, Matutes *et al.* 2007), leucemia linfoblástica aguda (Keyhani, Huh *et al.* 2000), leucemia mieloide aguda (Marinov, Koubek *et al.* 1993; Keyhani, Huh *et al.* 2000), leucemia de células NK (Suzuki, Suzumiya *et al.* 2004), linfoma de células NK/T (Wang, Wang *et al.* 2015) e leucemia de células plasmáticas (van de Donk, Lokhorst *et al.* 2012).

[004] Outras doenças, em que a expressão de CD38 pode estar envolvida, incluem, e. carcinomas broncoepiteliais do pulmão, câncer de mama (evoluindo da proliferação maligna do revestimento epitelial nos dutos e lóbulos da mama), tumores pancreáticos, evoluindo das células β (insulinomas), tumores evoluindo do epitélio no intestino (por exemplo, adenocarcinoma e carcinoma de células escamosas), carcinoma na próstata, seminomas nos testículos, cânceres de ovário e neuroblastomas. Outras divulgações também sugerem um papel da CD38 na autoimunidade, como doença de Graves e tireoidite (Antonelli, Fallahi *et al.* 2001), Diabetes tipo 1 e 2 (Mallone and Perin 2006) e inflamação das células do músculo liso das vias aéreas durante a asma (Deshpande, White *et al.* 2005). Além disso, a expressão de CD38 foi associada à infecção por HIV (Kestens, Vanham *et al.* 1992; Ho, Hultin *et al.* 1993).

[005] CD38 é uma proteína multifuncional. As funções atribuídas aa CD38 incluem a mediação do receptor em eventos de adesão e sinalização e atividade (ecto) enzimática. Como uma ectoenzima, a CD38 usa NAD + como substrato para a formação de ADP-ribose cíclica (cADPR) e ADPR,

mas também de nicotinamida e ácido nicotínicoadenina dinucleotídeo fosfato (NAADP). cADPR demonstrou atuar como segundo mensageiro para a mobilização de Ca^{2+} do retículo endoplasmático.

[006] Vários anticorpos anti-CD38 são descritos na literatura, por exemplo, em WO 2006/099875 A1, WO2008037257 A2, WO 2011/154453 A1, WO 2007/042309 A1, WO 2008/047242 A1, WO2012/092612 A1, Cotner, Hemler *et al.* 1981; Ausiello, Urbani *et al.* 2000; Lande, Urbani *et al.* 2002; de Weers, Tai *et al.* 2011; Deckert, Wetzl *et al.* 2014; Raab, Goldschmidt *et al.* 2015; Eissler, Filosto *et al.* 2018; Roepcke, Plock *et al.* 2018; e Schooten 2018.

[007] Os anticorpos CD38 podem afetar células tumorais que expressam CD38 por um ou mais dos seguintes mecanismos de ação: citotoxicidade dependente do complemento (CDC), citotoxicidade celular dependente de anticorpos (ADCC), fagocitose celular dependente de anticorpos (ADCP), morte celular programada, trogocitose, eliminação de células imunossupressoras e modulação da atividade enzimática (*van de Donk, Janmaat et al. 2016; Krejcik, Casneuf et al. 2016; Krejcik, Frerichs et al. 2017; Chatterjee, Daenthanasanmak et al. 2018; van de Donk 2018*) No entanto, em 2014, foi proposto que nenhum anticorpo CD38 foi descrito que pudesse induzir CDC, ADCC, ADCP eficaz, bem como inibir efetivamente a atividade da enzima CD38 (*Lammerts van Bueren, Jakobs et al. 2014*).

[008] A otimização das funções efectoras pode melhorar a efetividade de anticorpos terapêuticos para o tratamento de câncer ou outras doenças, por exemplo, para melhorar a capacidade de um anticorpo para induzir uma resposta imune a células que expressam antígeno. Tais esforços são descritos em, por exemplo, WO 2013/004842 A2; WO 2014/108198 A1; WO 2018/031258 A1; Dall'Acqua, Cook *et al.* 2006; Moore, Chen *et al.* 2010; Desjarlais e Lazar 2011; Kaneko e Niwa 2011; Song, Myojo *et al.* 2014; Brezski e Georgiou 2016; Sondermann e Szymkowski 2016; Zhang,

Armstrong *et al.* 2017; Wang, Mathieu *et al.* 2018.

[009] Apesar destes e outros esforços na técnica, no entanto, existe uma necessidade de anticorpos terapêuticos CD38 com potências moduladas.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[0010] A presente invenção se refere a variantes do anticorpo C CD38, particularmente variantes possuindo uma ou mais mutações na região do Fc. Pelo menos uma dessas mutações está em um resíduo que corresponde a E430, E345 ou S440 em uma cadeia pesada de IgG1 humano, em que os resíduos de aminoácidos são numerados de acordo com o índice da UE.

[0011] Assim, em um aspecto, a invenção se refere a uma ligação variante de anticorpo à CD38 humana, a variante de anticorpo compreendendo

(a) uma região de ligação ao antígeno que compreende um CDR1 de VH tendo a sequência conforme estabelecido na SEQ ID NO: 2, um CDR2 de VH tendo a sequência conforme estabelecido na SEQ ID NO: 3, um CDR3 de VH tendo a sequência conforme estabelecido na SEQ ID NO: 4, um CDR1 de VL tendo a sequência conforme estabelecido na SEQ ID NO: 6, um CDR2 de VL tendo a sequência AAS, e um CDR3 de VL tendo a sequência conforme estabelecido na SEQ ID NO: 7, e

(b) uma região do Fc variante que compreende uma mutação em um ou mais resíduos de aminoácidos selecionados a partir do grupo que corresponde a E430, E345 e S440 em uma cadeia pesada de IgG1 humano, em que os resíduos de aminoácidos são numerados de acordo com o índice da UE.

[0012] Em um aspecto, a invenção se refere a uma ligação de variante de anticorpo a CD38 humana, a variante de anticorpo compreendendo

(a) uma cadeia pesada que compreende uma região de VH que compreende um CDR1 de VH tendo a sequência conforme estabelecido na SEQ ID NO: 2, um CDR2 de VH tendo a sequência conforme estabelecido na

SEQ ID NO: 3, um CDR3 de VH tendo a sequência como estabelecido na SEQ ID NO: 4 e uma região de CH de IgG1 humano com uma mutação em um ou mais de E430, E345 e S440, os resíduos de aminoácidos sendo numerados de acordo com o índice da UE;

(b) uma cadeia leve que compreende uma região de VL que compreende um CDR1 de VL tendo a sequência conforme estabelecido em SEQ ID NO: 6, um CDR2 de VL tendo a sequência AAS, e um CDR3 de VL tendo a sequência conforme estabelecido em SEQ ID NO: 7.

[0013] Em um aspecto, a invenção se refere a uma ligação de variante de anticorpo a CD38 humana, a variante de anticorpo compreendendo

(a) uma cadeia pesada que compreende uma região de VH que compreende SEQ ID NO: 1 e uma região de CH de IgG1 humano com uma mutação em um ou mais de E430, E345 e S440, em que a numeração do resíduo de aminoácido está de acordo com o índice da UE, e

(b) uma cadeia leve que compreende um VL que compreende SEQ ID NO: 5.

[0014] Em um aspecto, a invenção se refere a um ácido nucleico isolado que codifica a variante de anticorpo de acordo com qualquer aspecto ou modalidade aqui.

[0015] Em um aspecto, a invenção se refere a um vetor de expressão que compreende esse ácido nucleico.

[0016] Em um aspecto, a invenção se refere a uma célula hospedeira recombinante que produz uma variante de anticorpo de acordo com qualquer aspecto ou modalidade aqui.

[0017] Em um aspecto, a invenção se refere a um método de produção de uma variante de anticorpo de acordo com qualquer aspecto ou modalidade aqui, que compreende o cultivo de tal célula hospedeira recombinante em um meio de cultura e sob condições adequadas para a produção da variante de anticorpo.

[0018] Em um aspecto, a invenção se refere a um método para aumentar uma função efetora de um anticorpo parental que compreende uma região do Fc e uma região de ligação ao antígeno que se liga a CD38, tal método compreende a introdução na região do Fc de uma mutação em um ou mais resíduos de aminoácidos selecionado do grupo que corresponde a E430, E345 e S440 na região do Fc de uma cadeia pesada de IgG1 humano, em que os resíduos de aminoácidos são numerados de acordo com o índice da UE;

em que a região de ligação ao antígeno compreende um CDR1 de VH tendo a sequência conforme estabelecido na SEQ ID NO: 2, um CDR2 de VH tendo a sequência conforme estabelecido na SEQ ID NO: 3, um CDR3 de VH tendo a sequência conforme estabelecido na SEQ ID NO: 4, um CDR1 de VL tendo a sequência conforme estabelecido na SEQ ID NO: 6, um CDR2 de VL tendo a sequência AAS, e um CDR3 de VL tendo a sequência conforme estabelecido na SEQ ID NO: 7.

[0019] Em algumas modalidades dos aspectos aqui descritos, a mutação em um ou mais resíduos de aminoácidos é selecionada a partir do grupo que consiste em E430G, E345K, E430S, E430F, E430T, E345Q, E345R, E345Y, S440Y e S440W, tal como, por exemplo, E430G.

[0020] Em um aspecto, a invenção se refere a um método de produção de uma variante de um anticorpo parental que compreende uma região do Fc e uma região de ligação ao antígeno que se liga a CD38, a variante tendo uma função efetora aumentada em comparação com o anticorpo parental, tal método compreende

(a) introduzir na região do Fc uma mutação em um ou mais resíduos de aminoácidos selecionados a partir do grupo que corresponde a E430, E345 e S440 na região do Fc de uma cadeia pesada de IgG1 humano para obter uma variante de anticorpo,

(b) selecionar qualquer variante de anticorpo com uma função efetora aumentada em comparação com o anticorpo parental, e

(c) produzir o dito variante de anticorpo em uma célula hospedeira recombinante,

em que a região de ligação ao antígeno compreende um CDR1 de VH tendo a sequência conforme estabelecido na SEQ ID NO: 2, um CDR2 de VH tendo a sequência conforme estabelecido na SEQ ID NO: 3, um CDR3 de VH tendo a sequência conforme estabelecido na SEQ ID NO: 4, um CDR1 de VL tendo a sequência conforme estabelecido na SEQ ID NO: 6, um CDR2 de VL tendo a sequência AAS, e um CDR3 de VL tendo a sequência conforme estabelecido na SEQ ID NO: 7.

[0021] Em um aspecto, a invenção se refere a um anticorpo obtido ou obtenível por tal método.

[0022] Em um aspecto, a invenção se refere a uma composição farmacêutica que compreende uma variante de anticorpo como definido em qualquer aspecto ou modalidade aqui, e um carreador farmaceuticamente aceitável.

[0023] Em um aspecto, a invenção se refere a uma variante de anticorpo de acordo com qualquer aspecto ou modalidade aqui para uso como um medicamento.

[0024] Em um aspecto, a invenção se refere a uma variante de anticorpo de acordo com qualquer aspecto ou modalidade aqui para uso no tratamento de uma doença envolvendo células que expressam CD38.

[0025] Em um aspecto, a invenção se refere a uma variante de anticorpo de acordo com qualquer aspecto ou modalidade aqui para uso na indução de uma resposta de CDC contra um tumor que compreende células que expressam CD38.

[0026] Em um aspecto, a invenção se refere a uma variante de anticorpo de acordo com qualquer aspecto ou modalidade aqui para uso no tratamento ou prevenção de um câncer em um indivíduo que compreende células que expressam a CD38 humana.

[0027] Em um aspecto, a invenção se refere a uma variante de anticorpo de acordo com qualquer aspecto ou modalidade aqui para uso no tratamento ou prevenção da artrite reumatoide.

[0028] Em um aspecto, a invenção se refere a um método para tratar uma doença que compreende células que expressam CD38, que compreende a administração da variante de anticorpo de acordo com qualquer aspecto ou modalidade aqui a um paciente em necessidade, opcionalmente em que a variante de anticorpo ou composição farmacêutica é administrada em uma quantidade terapeuticamente eficaz e/ou por um tempo suficiente para tratar a doença.

[0029] Estes e outros aspectos e modalidades da invenção são descritos em mais detalhes abaixo.

LEGENDAS PARA AS FIGURAS

[0030] A Figura 1 mostra um alinhamento de sequência de aminoácidos usando software *Clustal 2.1* para segmentos do Fc de IgG1m(a), IgG1m(f), IgG2, IgG3 e IgG4 humanos correspondentes aos resíduos P247 a K447 nas cadeias pesadas de IgG1 humano, em que os resíduos de aminoácidos são numerados de acordo com o índice da UE conforme estabelecido em Kabat. As sequências de aminoácidos apresentadas correspondem aos resíduos 130 a 330 nas regiões constantes da cadeia pesada das variantes alotípicas de IgG1 humano designada IgG1m(za) (SEQ ID NO: 64; No. de acesso UniProt P01857), IgG1m(f) (SEQ ID NO: 65), IgG1m(z) (SEQ ID NO: 66), IgG1m(a) (SEQ ID NO: 67) e IgG1m(x) (SEQ ID NO: 68); resíduos 126 a 326 da região constante da cadeia pesada de IgG2 (SEQ ID NO: 79; número de acesso UniProt P01859); resíduos 177 a 377 da região constante de cadeia pesada de IgG3 (SEQ ID NO: 80; número de acesso UniProt P01860) e resíduos 127 a 327 da região constante de cadeia pesada de IgG4 (SEQ ID NO: 81; número de acesso UniProt P01861).

[0031] A Figura 2 mostra a ligação das variantes do anticorpo CD38

IgG1-A-E430G, IgG1-B-E430G e IgG1-C-E430G a células NALM16 que expressam CD38 em comparação com os anticorpos CD38 IgG1-A, IgG1-B, IgG1-C e controle de isótipo anticorpo. Para obter mais detalhes, consulte o Exemplo 2.

[0032] A Figura 3 mostra a ligação de variantes de anticorpos CD38 IgG1-A-E430G, IgG1-B-E430G e IgG1-C-E430G a CD38 expresso em *cynomolgus* PBMCs (A) ou células Daudi expressando altos números de cópias de CD38 (B) humano em comparação para isótipo de anticorpo de controle. Para obter mais detalhes, consulte o Exemplo 2.

[0033] A Figura 4 mostra a porcentagem de lise induzida por variantes de anticorpo CD38 IgG1-A-E430G, IgG1-B-E430G e IgG1-C-E430G de Ramos (A), Daudi (B), Wien-133 (C), NALM-16 (D), linhas de célula de tumor REH (E), RS4; 11 (F), U266 (G) e RC-K8 (H) em um ensaio de CDC em comparação com os anticorpos CD38 IgG1-A, IgG1-B e IgG1-C. Para obter mais detalhes, consulte o Exemplo 3.

[0034] A Figura 5 mostra o efeito das variantes do anticorpo CD38 IgG1-A-E430G, IgG1-B-E430G e IgG1-C-E430G sobre o número de células NK viáveis (A), células T (B) e células B (C) em um Ensaio de CDC realizado em sangue total em comparação com os anticorpos CD38 IgG1-A, IgG1-B e IgG1-C. Para obter mais detalhes, consulte o Exemplo 3.

[0035] A Figura 6 mostra a porcentagem de lise de células Daudi induzidas por variantes de anticorpos CD38 IgG1-A-E430G, IgG1-B-E430G e IgG1-C-E430G em um ensaio ADCC de liberação de cromo em comparação com anticorpos CD38 IgG1-A, IgG1-B, IgG1-C e anticorpo de controle de isótipo. Para obter mais detalhes, consulte o Exemplo 4.

[0036] A Figura 7 mostra a reticulação de do FcγRIIIa dependente da dose de variantes de anticorpos CD38 IgG1-A-E430G, IgG1-B-E430G e IgG1-C-E430G em um ensaio repórter ADCC em comparação com anticorpos CD38 IgG1-A, IgG1-B, IgG1-C e anticorpo de controle de isótipo.

Para obter mais detalhes, consulte o Exemplo 4.

[0037] A Figura 8 mostra o efeito das variantes de anticorpo CD38 IgG1-A-E430G, IgG1-B-E430G e IgG1-C-E430G na porcentagem de macrófagos PKH-29pos, CD14pos e CD19neg em um ensaio ADCP em comparação com anticorpos CD38 IgG1-A, IgG1-B, IgG1-C e anticorpo de controle de isótipo. Para obter mais detalhes, consulte o Exemplo 5.

[0038] A Figura 9 mostra a porcentagem de lise induzida por variantes de anticorpo CD38 IgG1-A-E430G, IgG1-B-E430G e IgG1-C-E430G de Ramos (A), Daudi (B, C), Wien-133 (D, E) e Linhas de células tumorais NALM-16 (F, G) em um ensaio de apoptose conduzido com (C, E, G) ou sem (A, B, D, F) anticorpo de reticulação do Fc, em comparação com anticorpos CD38 IgG1-A, IgG1-B, IgG1-C e anticorpo de controle de isótipo. Para obter mais detalhes, consulte o Exemplo 6.

[0039] A Figura 10 ilustra as atividades enzimáticas de CD38.

[0040] A Figura 11 mostra o efeito das variantes do anticorpo CD38 IgG1-A-E430G, IgG1-B-E430G e IgG1-C-E430G na atividade ciclase de HisCD38 (A), células Daudi (B) e células Wien-133 (C) como refletido por % de conversão de NDG ao longo do tempo, em comparação com anticorpos CD38 IgG1-A, IgG1-B, IgG1-C e anticorpo de controle de isótipo.

[0041] A Figura 12 mostra o efeito das variantes de anticorpos CD38 IgG1-A-E430G, IgG1-B-E430G e IgG1-C-E430G na expressão de CD38 em células Daudi após 45 minutos de cocultura com macrófagos em comparação com anticorpos CD38 IgG1-A, IgG1-B, IgG1-C e anticorpo de controle de isótipo. Os macrófagos eram do doador A (A, B) ou doador B (B, D) e as células opsonizadas com anticorpos foram testadas quanto à expressão de CD38 (A, B) ou coloração de IgG humana (C, D).

[0042] A Figura 13 mostra o efeito das variantes do anticorpo CD38 IgG1-B-E430G e IgG1-C-E430G na expressão de CD38 em células T reguladoras com ou sem PBMCs, em comparação com IgG1-B.

[0043] A Figura 14 mostra a porcentagem de lise induzida por variantes de anticorpo CD38 IgG1-A-E430G (triângulos fechados), IgG1-B-E430G (círculos fechados) e IgG1-C-E430G (quadrados fechados) de diferentes linhas de células tumorais de células B em um CDC ensaio em comparação com os anticorpos CD38 IgG1-B (círculo aberto) e o anticorpo de controle de isótipo (losangos abertos). Para obter mais detalhes, consulte o Exemplo 3.

[0044] A Figura 15 mostra um resumo de alguns dos valores de EC50 descritos na Tabela 4. Os valores de EC50 de CDC induzidos por anticorpos IgG1-B, IgG1-B-E430G e IgG1-C-E430G em 20 linhas de células tumorais de células B diferentes são mostrados. Cada quadrado, triângulo ou círculo representa uma linha de células tumorais de células B. Os valores de EC50 obtidos com linhas de células AML não foram incluídos porque IgG1-B-E430G não foi testado em linhas de célula de AML.

[0045] A Figura 16 mostra a porcentagem de lise induzida pelo anticorpo CD38 variante IgG1-C-E430G (círculos fechados) de diferentes linhas de células tumorais de AML em um ensaio CDC em comparação com anticorpos CD38 IgG1-B (círculos abertos) e anticorpo de controle de isótipo (quadrados fechados). Para obter mais detalhes, consulte o Exemplo 3.

[0046] A Figura 17 mostra a porcentagem de lise induzida por variantes de anticorpos CD38 IgG1-B-E430G (círculos fechados) e IgG1-C-E430G (quadrados fechados) de células T reguladoras em um ensaio de CDC em comparação com anticorpos CD38 IgG1-B (círculos abertos). Para obter mais detalhes, consulte o Exemplo 3.

[0047] A Figura 18 mostra a porcentagem de lise de células Daudi, Wien-133, Granta 519 e MEC-2 induzidas por variantes de anticorpos CD38 IgG1-B-E430G, IgG1-C-E430G em um ensaio ADCC de liberação de cromo em comparação com anticorpos CD38 IgG- B, IgG1-C e IgG1-b12-E430G. Para obter mais detalhes, consulte o Exemplo 4.

[0048] A Figura 19 mostra a reticulação de do FcγRIIIa dependente da dose de variantes de anticorpos CD38 IgG1-A-E430G, IgG1-B-E430G e IgG1-C-E430G em um ensaio repórter ADCC com células T reguladoras em comparação com anticorpos CD38 IgG1-A, IgG1-B, IgG1-C e anticorpo de controle de isótipo. Para obter mais detalhes, consulte o Exemplo 4.

[0049] A Figura 20 mostra o tamanho do tumor (mm³) em camundongos tratados com a variante de anticorpo CD38 IgG1-C-E430G ou PBS (controle negativo). Para obter mais detalhes, consulte o Exemplo 9.

[0050] A Figura 21 ilustra a configuração do ensaio para medir a trogocitose. 1) As células Daudi foram marcadas com PKH-26 (coloração da membrana) e traço celular violeta (coloração do citosol) e opsonizadas com anticorpos CD38. 2) Células Daudi marcadas e macrófagos foram coincubados por 2h a 37°C para permitir a fixação de macrófagos. 3) Transferência de membrana celular ou trogocitose de células Daudi para macrófagos. 4) Descolamento da interação macrófago-Daudi e degradação da membrana celular de Daudi no macrófago. Para obter mais detalhes, consulte o Exemplo 8.

[0051] A Figura 22 mostra a citotoxicidade mediada pelo complemento por IgG1-C-E430G ou Darzalex® em células mononucleares da medula óssea de 3 pacientes recém diagnosticados com MM (A, B e D) e 1 paciente com MM recidivante/refratário (C).

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[0052] Na descrição das modalidades da invenção, a terminologia específica será utilizada por uma questão de clareza. No entanto, a invenção não se destina a ser limitada aos termos específicos assim selecionados, e entende-se que cada termo específico inclui todos os equivalentes técnicos que operam de maneira semelhante para realizar um propósito semelhante.

Definições

[0053] Conforme usado neste documento, o termo “CD38”

geralmente se refere a CD38 humana (UniProtKB - P28907 (CD38_HUMAN)) tendo a sequência estabelecida na SEQ ID NO: 38, mas também pode, a menos que contradito pelo contexto, se referir a variantes, isoformas e ortólogos disso. Variantes de CD38 humana com mutações S274, Q272R, T237A ou D202G são descritas em WO 2006/099875 A1 e WO 2011/154453 A1.

[0054] O termo “imunoglobulina” se refere a uma classe de glicoproteínas estruturalmente relacionadas que consiste em dois pares de cadeias polipeptídicas, um par de cadeias leves (L) de baixo peso molecular e um par de cadeias pesadas (H), todas as quatro potencialmente interconectadas por dissulfeto títulos. A estrutura das imunoglobulinas foi bem distinguida. Ver, por exemplo, *Fundamental Immunology Ch. 7* (Paul, W., ed., 2ª ed. Raven Press, N.Y. (1989)). Resumidamente, cada cadeia pesada é tipicamente composta por uma região variável da cadeia pesada (VH) e uma região constante da cadeia pesada (CH). A região de CH normalmente é composta por três domínios, CH1, CH2 e CH3. As cadeias pesadas são normalmente interconectadas por meio de ligações dissulfeto na chamada “região de dobradiça”. Cada cadeia leve é tipicamente composta por uma região variável da cadeia leve (VL) e uma região constante da cadeia leve, a última tipicamente composta por um domínio, CL. As regiões VH e VL podem ser subdivididas em regiões de hipervariabilidade (ou regiões hipervariáveis que podem ser hipervariáveis em sequência e/ou forma de loops estruturalmente definidos), também denominadas regiões determinantes de complementaridade (CDRs), intercaladas com regiões que são mais conservadas, denominadas de regiões estruturais (FRs). Cada região de VH e VL é tipicamente composta por três CDRs e quatro FRs, arranjados do terminal amino ao terminal carbóxi na seguinte ordem: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4 (ver também *Chothia e Lesk J. Mol. Biol. 196, 901 917 (1987)*)).

[0055] Salvo indicação em contrário ou contradita pelo contexto, as sequências de CDR neste documento são identificadas de acordo com as regras IMGT usando DomainGapAlign (*Lefranc MP., Nucleic Acids Research 1999; 27: 209-212 e Ehrenmann F., Kaas Q. e Lefranc M.-P. Nucleic Acids Res., 38, D301-307 (2010)*); ver também o endereço [http da Internet www.imgt.org/](http://www.imgt.org/).

[0056] A menos que indicado de outra forma ou contradito pelo contexto, a referência às posições de aminoácidos no CH ou região do Fc/domínio do Fc na presente invenção está de acordo com a numeração EU (*Edelman et al., Proc Natl Acad Sci US A. 1969 maio; 63 (1): 78-85; Kabat et al., Sequences of protein of immunological interest. 5ª Edição - Publicação NIH 1991 No. 91-3242*). Um resíduo de aminoácido em um CH de outro isótipo diferente de IgG1 humano pode, no entanto, alternativamente ser dito pela posição de aminoácido correspondente em uma cadeia pesada de IgG1 humano de tipo selvagem na qual os resíduos de aminoácidos são numerados de acordo com o índice da UE. Especificamente, a posição de aminoácido correspondente pode ser identificada como ilustrado na Figura 1, isto é, por (a) alinhamento da sequência de aminoácidos da região constante não IgG1 (ou um segmento da mesma) com a sequência de aminoácidos de uma IgG1 pesada humana cadeia (ou segmento da mesma) na qual os resíduos de aminoácidos são numerados de acordo com o índice da UE, e (b) identificar com qual posição de aminoácido na cadeia pesada de IgG1 o resíduo de aminoácido está alinhado. Por conseguinte, a posição de tal resíduo de aminoácido pode ser aqui dita como “o resíduo de aminoácido em uma posição que corresponde a”, seguido pela posição do aminoácido em uma cadeia pesada de IgG1 humano de tipo selvagem numerada de acordo com o índice da UE. Ao se referir a uma ou mais de uma série de diferentes posições de aminoácidos, isso pode ser dito aqui como “uma mutação em um ou mais resíduos de aminoácidos em posições selecionadas do grupo que consiste nas

posições correspondentes a”, “uma mutação em um ou mais resíduos de aminoácidos nas posições correspondentes a” ou simplesmente “uma mutação em um ou mais resíduos de aminoácidos selecionados a partir do grupo que corresponde a”, seguido por duas ou mais posições de aminoácidos (por exemplo, E430, E345 e S440) em uma cadeia pesada de IgG1 de tipo selvagem humano, em que os resíduos de aminoácidos são numerados de acordo com o índice da UE.

[0057] O termo “região de dobradiça”, tal como aqui utilizado, destina-se a se referir à região de dobradiça de uma cadeia pesada de imunoglobulina. Assim, por exemplo, a região de dobradiça de um anticorpo IgG1 humano corresponde aos aminoácidos 216-230 de acordo com a numeração EU.

[0058] O termo “região de CH2” ou “domínio CH2”, tal como aqui utilizado, destina-se a se referir à região de CH2 de uma cadeia pesada de imunoglobulina. Assim, por exemplo, a região de CH2 de um anticorpo IgG1 humano corresponde aos aminoácidos 231-340 de acordo com a numeração EU. No entanto, a região de CH2 também pode ser qualquer um dos outros subtipos, conforme descrito neste documento.

[0059] O termo “região de CH3” ou “domínio de CH3”, tal como aqui utilizado, destina-se a se referir à região de CH3 de uma cadeia pesada de imunoglobulina. Assim, por exemplo, a região de CH3 de um anticorpo IgG1 humano corresponde aos aminoácidos 341-447 de acordo com a numeração EU. No entanto, a região de CH3 também pode ser qualquer um dos outros subtipos, conforme descrito neste documento.

[0060] O termo “anticorpo” (Ab) no contexto da presente invenção se refere a uma molécula de imunoglobulina, um fragmento de uma molécula de imunoglobulina ou um derivado de qualquer um deles, que tem a capacidade de se ligar especificamente a um antígeno. O anticorpo da presente invenção compreende um domínio do Fc de uma imunoglobulina e uma região de

ligação ao antígeno. Um anticorpo geralmente contém duas regiões CH2-CH3 e uma região de conexão, por exemplo, uma região de dobradiça, por exemplo pelo menos um domínio do Fc. Assim, o anticorpo da presente invenção pode compreender uma região do Fc e uma região de ligação ao antígeno. As regiões variáveis das cadeias pesadas e leves da molécula de imunoglobulina contêm um domínio de ligação que interage com um antígeno. As regiões constantes ou “Fc” dos anticorpos podem mediar a ligação da imunoglobulina aos tecidos ou fatores do hospedeiro, incluindo várias células do sistema imunológico (como células efectoras) e componentes do sistema de complemento, como C1q, o primeiro componente em a via clássica de ativação do complemento. Tal como aqui utilizado, a menos que contradito pelo contexto, a região do Fc de uma imunoglobulina contém tipicamente pelo menos um domínio CH2 e um domínio de CH3 de uma imunoglobulina CH, e pode compreender uma região de conexão, por exemplo, uma região de dobradiça. Uma região do Fc está normalmente na forma dimerizada através de, por exemplo, pontes dissulfeto conectando as duas regiões de dobradiça e/ou interações não covalentes entre as duas regiões CH3. O dímero pode ser um homodímero (onde as duas sequências de aminoácidos do monômero da região do Fc são idênticas) ou um heterodímero (onde as duas sequências de aminoácidos do monômero da região do Fc diferem em um ou mais aminoácidos). De preferência, o dímero é um homodímero. Um fragmento da região do Fc de um anticorpo de comprimento total pode, por exemplo, ser gerado por digestão do anticorpo de comprimento total com papaína, como é bem conhecido na técnica. Um anticorpo como definido neste documento pode, além de uma região do Fc e uma região de ligação ao antígeno, compreender ainda uma ou ambas de uma região de CH1 de imunoglobulina e uma região CL. Um anticorpo também pode ser um anticorpo multiespecífico, como um anticorpo biespecífico ou molécula semelhante. O termo “anticorpo biespecífico” se refere a um anticorpo com especificidades para pelo menos

dois epítomos diferentes, normalmente não sobrepostos. Esses epítomos podem estar no mesmo ou em alvos diferentes. Se os epítomos estiverem em alvos diferentes, esses alvos podem estar na mesma célula ou em células ou tipos de células diferentes. Como indicado acima, a menos que indicado de outra forma ou claramente contradito pelo contexto, o termo anticorpo aqui inclui fragmentos de um anticorpo que compreende pelo menos uma porção de uma região do Fc e que retém a capacidade de se ligar especificamente ao antígeno. Tais fragmentos podem ser providos por qualquer técnica conhecida, tal como clivagem enzimática, síntese de peptídeos e técnicas de expressão recombinante. Foi demonstrado que a função de ligação ao antígeno de um anticorpo pode ser realizada por fragmentos de um anticorpo de comprimento total. Exemplos de fragmentos de ligação abrangidos pelo termo “Ab” ou “anticorpo” incluem, sem limitação, anticorpos monovalentes (descritos em WO2007059782 por Genmab); anticorpos de cadeia pesada, consistindo apenas em duas cadeias pesadas e de ocorrência natural em, e. camelídeos (por exemplo, Hamers-Casterman (1993) *Nature* 363: 446); ThioMabs (Roche, WO2011069104), domínio modificado de troca de fita (SEED ou corpo-semente) que são moléculas semelhantes a anticorpos biespecíficos e assimétricos (Merck, WO2007110205); Triomab (Pharma/Fresenius Biotech, Lindhofer *et al.* 1995 *J Immunol* 155: 219; WO2002020039); do Fc Δ Adp (Regeneron, WO2010151792), Azymetric Scaffold (Zymeworks/Merck, WO2012/058768), mAb-Fv (Xencor, WO2011/028952), Xmab (Xencor), Imunoglobulina de domínio variável duplo (Abbott, DVD-Ig, Patente US No. 7.612.181); Anticorpos de dupla cabeça de domínio duplo (Unilever; Sanofi Aventis, WO20100226923), Di-diabody (ImClone/Eli Lilly), formatos de anticorpos Knobs-into-holes (Genentech, WO9850431); DuoBody (Genmab, WO 2011/131746); IgG1 e IgG2 biespecífico (Pfizer/Rinat, WO11143545), DuetMab (MedImmune, US2014/0348839), formatos de anticorpos de direcionamento eletrostático

(Amgen, EP1870459 e WO 2009089004; Chugai, US201000155133; Oncomed, WO2010129302A); IgG1 e IgG2 biespecífico (Rinat neurosciences Corporation, WO11143545), CrossMAbs (Roche, WO2011117329), LUZ-Y (Genentech), Biclonic (Merus, WO2013157953), anticorpos de domínio duplo de direcionamento (GSK/Domantis), anticorpos dois em um ou Fabs de ação dupla que reconhecem dois alvos (Genentech, NovImmune, Adimab), Mabs reticulados (Karmanos Cancer Center), mAbs covalentemente fundidos (AIMM), corpo CovX (CovX/Pfizer), FynomAbs (Covagen/Janssen ilag), DutaMab (Dutalys/Roche), iMab (MedImmune), IgG-like Bispecific (ImClone/Eli Lilly, Shen, J., *et al.* J Immunol Methods, 2007. 318 (1-2): p. 65-74), TIG- corpo, corpo DIG e corpo PIG (Pharmabcine), moléculas de redirecionamento de afinidade dupla (Fc-DART ou Ig-DART, por MacroGenics, WO/2008/157379, WO/2010/080538), BEAT (Glenmark), Zybodies (Zyngenia), abordagens com cadeia leve comum (Crucell/Merus, US7262028) ou cadeias pesadas comuns ($\kappa\lambda$ Bodies por NovImmune, WO2012023053), bem como proteínas de fusão que compreende uma sequência polipeptídica fundida a um fragmento de anticorpo contendo uma região do Fc como fusões de scFv, como BsAb por ZymoGenetics/BMS, HERCULES por Biogen Idec (US007951918), SCORPIONS por Emergent BioSolutions/Trubion e Zymogenetics/BMS, Ts2Ab (MedImmune/AZ (Dimasi, N., *et al.* J Mol Biol, 2009. 393 (3): p. 672-92), fusão scFv por Genentech/Roche, fusão scFv por Novartis, fusão scFv por Immunomedics, fusão scFv por Changzhou Adam Biotech Inc (CN 102250246), TvAb por Roche (WO 2012025525, WO 2012025530), mAb2 por f-Star (WO2008/003116), e scFv-fusão dupla s. Deve ser entendido que o termo anticorpo, a menos que especificado de outra forma, inclui anticorpos monoclonais (como anticorpos monoclonais humanos), anticorpos policlonais, anticorpos quiméricos, anticorpos humanizados, anticorpos monoespecíficos (tais como monoespecífico bivalente anticorpos específicos),

anticorpos biespecíficos, anticorpos de qualquer isótipo e/ou alótipo; misturas de anticorpos (policlonais recombinantes), por exemplo, geradas por tecnologias exploradas por Symphogen and Merus (Oligoclonics), proteínas do Fc multiméricas conforme descrito em WO2015/158867 e proteínas de fusão conforme descrito em WO2014/031646. Embora esses diferentes fragmentos e formatos de anticorpo sejam geralmente incluídos no significado de anticorpo, eles coletivamente e cada um independentemente são características únicas da presente invenção, exibindo diferentes propriedades biológicas e utilidade.

[0061] Um “anticorpo CD38” ou “anticorpo anti-CD38”, conforme descrito neste documento, é um anticorpo que se liga especificamente ao antígeno CD38.

[0062] O termo “anticorpo humano”, tal como aqui utilizado, destina-se a incluir anticorpos com regiões variáveis e constantes derivadas de sequências de imunoglobulina da linha germinativa humana. Os anticorpos humanos da invenção podem incluir resíduos de aminoácidos não codificados por sequências de imunoglobulina da linha germinativa humana (por exemplo, mutações, inserções ou deleções introduzidas por mutagênese aleatória ou específica do local *in vitro* ou por mutação somática *in vivo*). No entanto, o termo “anticorpo humano”, tal como aqui utilizado, não se destina a incluir anticorpos nos quais as sequências de CDR derivadas da linha germinativa de outra espécie de mamífero, como um camundongo, foram enxertadas em sequências estruturais humanas.

[0063] Os termos “anticorpo monoclonal”, “Ab monoclonal”, “composição de anticorpo monoclonal”, “mAb” ou semelhantes, conforme usados neste documento, se referem a uma preparação de moléculas Ab de composição molecular única. Uma composição de anticorpo monoclonal exibe uma única especificidade de ligação e afinidade para um epítopo particular. Consequentemente, o termo “anticorpo monoclonal humano” se

refere a Abs exibindo uma única especificidade de ligação que possui regiões variáveis e constantes derivadas de sequências de imunoglobulina da linha germinativa humana. Os mAbs humanos podem ser gerados por um hibridoma que inclui uma célula B obtida a partir de um animal não humano transgênico ou transcromossômico, como um camundongo transgênico, com um genoma que compreende um repertório de transgene de cadeia pesada humana e um repertório de transgene de cadeia leve, rearranjado para produzir um anticorpo humano funcional e fundido a uma célula imortalizada.

[0064] Tal como aqui utilizado, “isótipo” se refere à classe de imunoglobulina que é codificada por genes da região constante da cadeia pesada, incluindo, por exemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgD, IgA1, IgA2, IgE e IgM, bem como qualquer alótipos destes, tais como IgG1m(z), IgG1m(a), IgG1m(x), IgG1m(f) e alótipos mistos destes, tais como IgG1m(za), IgG1m(zax), IgG1m(fa), etc. (ver, para exemplo, *de Lange, Experimental and Clinical Immunogenetics 1989; 6 (1): 7-17*).

[0065] Além disso, cada isótipo de cadeia pesada pode ser combinado com uma cadeia leve kappa (κ) ou lambda (λ). O termo “isótipo misto” aqui utilizado se refere à região do Fc de uma imunoglobulina gerada pela combinação de características estruturais de um isótipo com a região análoga de outro isótipo, gerando assim um isótipo híbrido. Um isótipo misto pode compreender uma região do Fc com uma sequência composta por dois ou mais isótipos selecionados a partir de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgD, IgA1, IgGA2, IgE ou IgM, gerando assim combinações como, por exemplo, e. IgG1/IgG3, IgG1/IgG4, IgG2/IgG3, IgG2/IgG4 ou IgG1/IgA.

[0066] O termo “anticorpo de comprimento total”, quando usado neste documento, se refere a um anticorpo (por exemplo, um anticorpo parental ou variante) que contém todos os domínios constantes e variáveis da cadeia pesada e leve correspondentes àqueles que são normalmente encontrados em um anticorpo de tipo selvagem de o isótipo em questão.

[0067] Um “anticorpo monoclonal bivalente, monoespecífico de comprimento total” quando usado aqui, se refere a um anticorpo bivalente monoespecífico (por exemplo, um anticorpo parental ou variante) formado por um par de HCs idênticos e um par de LCs idênticos, com a constante e variável domínios correspondentes àqueles normalmente encontrados em um anticorpo do isótipo particular em questão.

[0068] O termo “região de ligação ao antígeno”, “região de ligação ao antígeno”, “região de ligação” ou domínio de ligação ao antígeno, tal como aqui utilizado, se refere a uma região de um anticorpo que é capaz de se ligar ao antígeno. Esta região de ligação é tipicamente definida pelos domínios VH e VL do anticorpo que podem ser subdivididos em regiões de hipervariabilidade (ou regiões hipervariáveis que podem ser hipervariáveis em sequência e/ou forma de loops estruturalmente definidos), também denominadas regiões determinantes de complementaridade (CDRs), intercaladas com regiões que são mais conservadas, denominadas regiões estruturais (FRs). O antígeno pode ser qualquer molécula, tal como um polipeptídeo, e. presente em uma célula.

[0069] O termo “alvo”, tal como aqui utilizado, se refere a uma molécula à qual se liga a região de ligação ao antígeno do anticorpo. O alvo inclui qualquer antígeno para o qual o anticorpo criado é direcionado. O termo “antígeno” e “alvo” pode, em relação a um anticorpo, ser usado indistintamente e constituir o mesmo significado e propósito com respeito a qualquer aspecto ou modalidade da presente invenção.

[0070] O termo “epítopo” significa um determinante de proteína capaz de ligação específica a um domínio variável de anticorpo. Os epítopos geralmente consistem em agrupamentos de superfície de moléculas, como aminoácidos, cadeias laterais de açúcar ou uma combinação dos mesmos e geralmente têm características estruturais tridimensionais específicas, bem como características de carga específicas. Os epítopos conformacionais e não

conformacionais distinguem-se pelo facto de a ligação ao primeiro, mas não ao último, se perder na presença de solventes desnaturantes. O epítopo pode compreender resíduos de aminoácidos diretamente envolvidos na ligação (também chamado de componente imunodominante do epítopo) e outros resíduos de aminoácidos, que não estão diretamente envolvidos na ligação.

[0071] Uma “variante”, tal como aqui utilizado, se refere a uma sequência de proteína ou polipeptídeo que difere em um ou mais resíduos de aminoácidos de uma sequência parental ou de referência. Uma variante pode, por exemplo, ter uma identidade de sequência de pelo menos 80%, tal como 90%, ou 95%, ou 97%, ou 98% ou 99%, para um pai ou sequência de referência. Também ou alternativamente, uma variante pode diferir da sequência parental ou de referência em 12 ou menos, tal como 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 ou 1 mutação(ões), como substituições, inserções ou deleções de resíduos de aminoácidos. Por conseguinte, uma “variante de anticorpo” ou uma “variante de anticorpo”, usado indistintamente aqui, se refere a um anticorpo que difere em um ou mais resíduos de aminoácidos em comparação com um anticorpo parental ou de referência, por exemplo, na região de ligação ao antígeno, do região do Fc ou ambos. Da mesma forma, uma “região do Fc variante” ou “variante da região do Fc” se refere a uma região do Fc que difere em um ou mais resíduos de aminoácidos em comparação com uma região do Fc progenitora ou de referência, opcionalmente diferindo da sequência de aminoácidos da região do Fc progenitora ou de referência por 12 ou menos, como 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 ou 1 mutação(ões), como substituições, inserções ou deleções de resíduos de aminoácidos. A região do Fc parental ou de referência é tipicamente a região do Fc de um anticorpo de tipo selvagem humano que, dependendo do contexto, pode ser um isótipo particular. Uma região do Fc variante pode, na forma dimerizada, ser um homodímero ou heterodímero, por exemplo, onde uma das sequências de aminoácidos da região do Fc dimerizada compreende uma mutação enquanto

a outra é idêntica a uma sequência de aminoácidos parental ou de referência de tipo selvagem. Exemplos de sequências de aminoácidos da região constante de CH de IgG e IgG de tipo selvagem (tipicamente uma sequência parental ou de referência), que compreendem sequências de aminoácidos da região do Fc, são apresentados na Tabela 1.

[0072] No contexto da presente invenção, as substituições conservativas podem ser definidas como substituições dentro das seguintes classes de aminoácidos:

- Resíduos ácidos: Asp (D) e Glu (E)
- Resíduos básicos: Lys (K), Arg (R) e His (H)
- Resíduos hidrofílicos não carregados: Ser (S), Thr (T), Asn (N) e Gln (Q)
- Resíduos alifáticos não carregados: Gly (G), Ala (A), Val (V), Leu (L) e Ile (I)
- Resíduos não polares não carregados: Cys (C), Met (M) e Pro (P)
- Resíduos aromáticos: Phe (F), Tyr (Y) e Trp (W)

[0073] Classes alternativas conservadoras de substituição de resíduos de aminoácidos:

1. A S T
2. D E
3. N Q
4. R K
5. I L M
6. F Y W

[0074] Classificações alternativas físicas e funcionais de resíduos de aminoácidos:

- Resíduos contendo grupos álcool: S e T
- Resíduos alifáticos: I, L, V e M

- Resíduos associados a cicloalquênila: F, H, W e Y
- Resíduos hidrofóbicos: A, C, F, G, H, I, L, M, R, T, V, W e

Y

- Resíduos carregados negativamente: D e E
- Resíduos polares: C, D, E, H, K, N, Q, R, S e T
- Resíduos carregados positivamente: H, K e R
- Pequenos resíduos: A, C, D, G, N, P, S, T e V
- Resíduos muito pequenos: A, G e S
- Resíduos envolvidos na formação de curvas: A, C, D, E, G, H, K, N, Q, R, S, P e T
- Resíduos flexíveis: Q, T, K, S, G, N, D, E e R

[0075] “Identidade de sequência”, tal como aqui utilizado, se refere à identidade percentual entre duas sequências em função do número de posições idênticas compartilhadas pelas sequências (ou seja, $\text{homologia percentual} = \frac{\# \text{ de posições idênticas}}{\# \text{ total de posições}} \times 100$), levando em consideração o número de lacunas e o comprimento de cada lacuna, que precisam ser introduzidos para o alinhamento ideal das duas sequências. A porcentagem de identidade entre duas sequências de nucleótidos ou aminoácidos pode, e, ser determinado usando o algoritmo de *E. Meyers e W. Miller, Comput. Appl. Biosci 4, 11-17 (1988)* que foi incorporado ao programa ALIGN (versão 2.0), usando uma tabela de resíduos de peso PAM 120, uma penalidade de comprimento de lacuna de 12 e uma penalidade de lacuna de 4. Além disso, a identidade percentual entre duas sequências de aminoácidos pode ser determinada usando *Needleman e Wunsch, J. Mol. Biol. 48, 444-453 (1970)* algoritmo. Outras ferramentas para alinhamentos de sequência estão disponíveis publicamente na Internet e incluem, sem limitação, *Clustal Omega* e *EMBOSS Needle* no site do EMBL-EBI www.ebi.ac.uk. Normalmente, as configurações padrão podem ser usadas.

[0076] No contexto da presente invenção, as seguintes notações são,

salvo indicação em contrário, utilizadas para descrever uma mutação; nome do aminoácido que sofre mutação, seguido pelo número da posição que sofre mutação, seguido pelo que a mutação abrange. Assim, se a mutação for uma substituição, o nome do aminoácido que substitui o aminoácido anterior é incluído, se o aminoácido for deletado é indicado por um “*”, se a mutação for uma adição, o aminoácido a ser adicionado é incluído após o aminoácido original. Os nomes dos aminoácidos podem ser códigos de uma ou três letras. Assim, por exemplo; a substituição de um ácido glutâmico na posição 430 por uma glicina é dita como E430G, a substituição do ácido glutâmico na posição 430 por qualquer aminoácido é dita como E430X, a deleção do ácido glutâmico na posição 430 é dita como E430 * e adição de uma prolina após o ácido glutâmico na posição E430 é dito como E430EP.

[0077] Tal como aqui utilizado, “células imunossupressoras” se referem a células imunes que podem suprimir uma resposta imune em um indivíduo, tal como suprimindo a atividade de células T efectoras e/ou inibindo a proliferação de células T. Exemplos de tais células imunossupressoras incluem, mas não estão limitados a, células T reguladoras (Tregs), células B reguladoras (Bregs) e células supressoras derivadas de mieloide (MDSCs). Existem também células NK imunossupressoras, células NKT, macrófagos e células apresentadoras de antígenos (APCs). Um exemplo de um fenótipo para uma célula NK imunossupressora é CD56brightCD16-.

[0078] “Células T reguladoras” ou “Tregs” ou “Treg” se referem a linfócitos T que regulam a atividade de outras células T e/ou outras células do sistema imunológico, geralmente suprimindo sua atividade. Um exemplo de um fenótipo Treg é CD3⁺CD4⁺CD25⁺CD127^{dim}. Tregs pode expressar ainda mais Foxp3. É apreciado que Tregs pode não estar totalmente restrito a este fenótipo.

[0079] “Células T efectoras” ou “Teffs” ou “Teff” se referem a linfócitos T que realizam uma função de uma resposta imune, como matar

células tumorais e/ou ativar uma resposta imune antitumoral que pode resultar na eliminação das células tumorais do corpo. Exemplos de fenótipos Teff incluem $CD3^+CD4^+$ e $CD3^+CD8^+$. Os teffs podem secretar, conter ou expressar marcadores como $IFN\gamma$, granzima B e ICOS. É apreciado que Teffs pode não estar totalmente restrito a esses fenótipos.

[0080] “Células supressoras derivadas de mieloide” ou “MDSCs” ou “MDSC” se refere a uma população específica de células da linhagem hematopoiética que expressa o marcador de macrófago/monócito CD11b e o marcador de granulócito Gr-1/Ly-6G. Um exemplo de um fenótipo MDSC é $CD11b^+HLA-DR^-CD14^-CD33^+CD15^+$. MDSCs tipicamente também mostram expressão baixa ou indetectável dos marcadores de células de apresentação de antígenos maduros MHC Classe II e F480. As MDSCs são células imaturas da linhagem mieloide e podem se diferenciar em outros tipos de células, como macrófagos, neutrófilos, células dendríticas, monócitos ou granulócitos. As MDSCs podem ser encontradas naturalmente na medula óssea normal de adultos de humanos e animais ou em locais de hematopoiese normal, como o baço.

[0081] “Célula B reguladora” ou “Breg” ou “Bregs” se refere a linfócitos B que suprimem as respostas imunes. Um exemplo de um fenótipo de Breg é $CD19^+CD24^+CD38^+$. Bregs podem suprimir as respostas imunes inibindo a proliferação de células T mediada por IL-10 secretado pelos Bregs. É apreciado que existem outros subconjuntos de Breg, e são descritos em, por exemplo, *Ding et al., (2015) Human Immunology 76: 615-621*.

[0082] Conforme usado neste documento, o termo “célula efetora” se refere a uma célula imune que está envolvida na fase efetora de uma resposta imune. Células imunes exemplares incluem uma célula de origem mieloide ou linfoide, por exemplo, linfócitos (tais como células B e células T incluindo células T citolíticas (CTLs)), células assassinas, células assassinas naturais, macrófagos, monócitos, eosinófilos, células polimorfonucleares, tais como

neutrófilos, granulócitos, mastócitos e basófilos. Algumas células efetoras expressam receptores do Fc (FcRs) ou complementam receptores e realizam funções imunológicas específicas. Em algumas modalidades, uma célula efetora, como, por exemplo, uma célula assassina natural, é capaz de induzir ADCC. Por exemplo, monócitos, macrófagos, neutrófilos, células dendríticas e células de Kupffer que expressam do FcRs estão envolvidos na morte específica de células alvo e/ou na apresentação de antígenos a outros componentes do sistema imunológico, ou na ligação a células que apresentam antígenos. Em algumas modalidades, o ADCC pode ser ainda melhorado pela ativação clássica do complemento conduzida por anticorpos, resultando na deposição de fragmentos C3 ativados na célula alvo. Os produtos de clivagem de C3 são ligantes para receptores de complemento (CRs), como CR3, expressos em células mieloides. O reconhecimento de fragmentos de complemento por CRs em células efetoras pode promover ADCC mediado por receptor do Fc intensificado. Em algumas modalidades, a ativação clássica do complemento conduzida por anticorpo leva a fragmentos C3 na célula alvo. Estes produtos de clivagem C3 podem promover citotoxicidade celular dependente do complemento direto (CDCC). Em algumas modalidades, uma célula efetora pode fagocitar um antígeno alvo, partícula alvo ou célula alvo que pode depender da ligação do anticorpo e mediada por do FcγRs expressos pelas células efetoras. A expressão de um do FcR particular ou receptor de complemento em uma célula efetora pode ser regulada por fatores humorais, como citocinas. Por exemplo, verificou-se que a expressão de do FcγRI é regulada positivamente pelo interferon γ (IFN γ) e/ou G CSF. Esta expressão aumentada aumenta a atividade citotóxica de células portadoras de do FcγRI contra alvos. Uma célula efetora pode fagocitar um antígeno alvo ou fagocitar ou lisar uma célula alvo. Em algumas modalidades, a ativação clássica do complemento conduzida por anticorpo leva a fragmentos C3 na célula alvo. Estes produtos de clivagem C3 podem

promover a fagocitose direta por células efetoras ou indiretamente, aumentando a fagocitose mediada por anticorpos.

[0083] O termo “funções efetoras de do Fc”, tal como aqui utilizado, destina-se a se referir a funções que são uma consequência da ligação de um polipeptídeo ou anticorpo ao seu alvo, como um antígeno, em uma membrana celular em que a função efetora de do Fc é atribuível ao Região do Fc do polipeptídeo ou anticorpo. Exemplos de funções efetoras de do Fc incluem (i) ligação de C1q, (ii) ativação de complemento, (iii) citotoxicidade dependente de complemento (CDC), (iv) citotoxicidade mediada por célula dependente de anticorpo (ADCC), (v) do Fc-gama ligação ao receptor, (vi) fagocitose celular dependente do anticorpo (ADCP), (vii) citotoxicidade celular dependente do complemento (CDCC), (viii) citotoxicidade aumentada do complemento, (ix) ligação ao receptor do complemento de um anticorpo opsonizado mediado pelo anticorpo, (x) opsonização, (xi) trogocitose, e (xii) uma combinação de qualquer um de (i) a (xi).

[0084] Conforme usado neste documento, o termo “ativação do complemento” se refere à ativação da via clássica do complemento, que é iniciada por um grande complexo macromolecular chamado de ligação de C1 a complexos anticorpo-antígeno em uma superfície. C1 é um complexo que consiste em 6 proteínas de reconhecimento C1q e um heterotetrâmero de serina proteases, C1r2C1s2. C1 é o primeiro complexo de proteína nos eventos iniciais da cascata de complemento clássica que envolve uma série de reações de clivagem que começa com a clivagem de C4 em C4a e C4b e C2 em C2a e C2b. C4b é depositado e forma junto com C2a uma convertase ativa enzimática chamada C3 convertase, que cliva o componente C3 do complemento em C3b e C3a, que forma uma convertase C5. Esta convertase C5 divide C5 em C5a e C5b e o último componente é depositado na membrana e que, por sua vez, desencadeia os eventos tardios da ativação do complemento, nos quais os componentes terminais do complemento C5b, C6,

C7, C8 e C9 se agrupam no complexo de ataque à membrana (MAC). A cascata do complemento resulta na criação de poros na membrana celular que causa a lise da célula, também conhecida como citotoxicidade dependente do complemento (CDC). A ativação do complemento pode ser avaliada usando a eficácia de C1q, ensaios de CDC cinética de CDC (conforme descrito em WO2013/004842, WO2014/108198) ou pelo método de deposição celular de C3b e C4b descrito em *Beurskens et al., J Immunol 1 de abril de 2012 vol. 188 no. 7, 3532-3541*.

[0085] O termo “citotoxicidade dependente do complemento” (CDC), tal como aqui utilizado, destina-se a se referir ao processo de ativação do complemento mediada por anticorpo levando à lise da célula à qual o anticorpo está ligado, a qual, sem estar ligada pela teoria, é acredita-se ser o resultado de poros na membrana que são criados pela montagem do chamado complexo de ataque à membrana (MAC). Os ensaios adequados para avaliar o CDC são conhecidos na técnica e incluem, por exemplo, ensaios *in vitro* em que soro humano normal é usado como uma fonte de complemento, conforme descrito no Exemplo 3. Um exemplo não limitativo de um ensaio para determinar a lise máxima de células que expressam CD38 como mediadas por um anticorpo CD38, ou o valor EC50, pode compreender as etapas de:

(a) plaquear cerca de 100,000 células que expressam CD38 em 40 µL de meio de cultura suplementado com 0,2% de BSA por poço em uma placa de múltiplos poços;

(b) pré-incubar as células durante 20 minutos com 40 µL de anticorpo CD38 diluído em série (0,0002-10 µg/mL);

(c) incubar cada poço por 45 minutos a 37°C com 20 por cento de soro humano normal reunido;

(d) adicionar um corante de viabilidade e medir a porcentagem de lise celular em um citômetro de fluxo;

(e) determinação da lise máxima e/ou cálculo do valor EC50

usando regressão não linear.

[0086] O termo “citotoxicidade mediada por células dependentes de anticorpos” (“ADCC”), tal como aqui utilizado, destina-se a se referir a um mecanismo de morte de células alvo revestidas com anticorpo por células que expressam receptores do Fc que reconhecem a região constante do anticorpo ligado. Ensaios adequados para avaliar ADCC são conhecidos na técnica e incluem, por exemplo, os ensaios descritos no Exemplo 4. Exemplos não limitativos de ensaios para determinar o ADCC de células que expressam CD38 mediadas por um anticorpo CD38 podem compreender as etapas do Ensaio de liberação ^{51}Cr ou ensaio repórter estabelecido abaixo.

ADCC com ensaio de liberação ^{51}Cr

[0087] (a) plaquear de cerca de 5.000 células que expressam CD38 marcadas com ^{51}Cr (por exemplo, células Daudi) em 50 μL de meio de cultura suplementado com 0,2% de BSA por poço em uma placa de múltiplos poços;

(b) pré-incubar as células durante 15 minutos com 50 μL de anticorpo CD38 diluído em série (0,0002-10 $\mu\text{g/mL}$);

(c) incubar cada poço por 4 horas a 37°C com 500,000 células mononucleares de sangue periférico (PBMCs) recém isoladas por poço;

(d) medir a quantidade de ^{51}Cr liberado em 75 μL de sobrenadante em um contador gama;

(e) calcular a porcentagem de lise celular como $(\text{cpm amostra} - \text{cpm lise espontânea})/(\text{cpm lise máxima} - \text{cpm lise espontânea})$ em que cpm são contagens por minuto.

ADCC com ensaio repórter

[0088] (a) plaquear cerca de 5.000 células que expressam CD38 (por exemplo, células Daudi) em 10 μL em placas de múltiplos poços adequadas para leituras ópticas (por exemplo, OptiPlates de 384 poços da PerkinElmer Inc.) em um meio padrão (por exemplo, RPMI 1640) suplementado com 25%

de soro IgG baixo;

(b) incubar cada poço por 6 horas a 37°C com 10 µL de células Jurkat modificadas expressando de forma estável o receptor do FcγRIIIa, variante V158 (alta afinidade) e um elemento de resposta NFAT que conduz a expressão de luciferase de pirilampo como células efetoras e 10 µL de anticorpo CD38 diluído em série (0,0002-10 µg/mL);

(c) incubar cada poço 5 minutos à temperatura ambiente com 30 µL de substrato de Luciferase e medir a luminescência.

[0089] O termo “fagocitose celular dependente de anticorpo” (“ADCP”), tal como aqui utilizado, destina-se a se referir a um mecanismo de eliminação de células alvo revestidas com anticorpo por internalização por fagócitos. As células alvo revestidas de anticorpos internalizadas estão contidas em uma vesícula chamada fagossomo, que então se funde com um ou mais lisossomos para formar um fagolisossomo. Os ensaios adequados para avaliar ADCP são conhecidos na técnica e incluem, por exemplo, o ensaio de citotoxicidade *in vitro* com macrófagos como células efetoras e microscopia de vídeo como descrito por van Bij *et al. no Journal of Hepatology Volume 53, Issue 4, October 2010, Pages 677-685*, e o ensaio de citotoxicidade *in vitro* descrito no Exemplo 5. Um exemplo não limitativo de um ensaio para determinar as células que expressam ADCP de CD38 mediadas por um CD38 o anticorpo pode compreender as etapas de:

(a) diferenciar monócitos isolados de fresco em macrófagos com 5 dias de incubação em meio contendo GM-CSF;

(b) plaquear cerca de 100,000 macrófagos por poço em uma placa de múltiplos poços em meio de células dendríticas com GM-CSF;

(c) adicionar 20,000 células que expressam CD38 opsonizado com anticorpo CD38 (por exemplo, células Daudi), marcadas com um corante de membrana fluorescente genérico, por poço por 45 minutos a 37°C;

(d) medir a porcentagem de macrófagos positivos para CD14,

CD19-negativos e para corante de membrana em um citômetro de fluxo.

[0090] Tal como aqui utilizado, “trogocitose” se refere a um processo distinguido pela transferência de moléculas da superfície celular de uma célula doadora para uma célula aceitadora, como uma célula efetora. As células aceitadoras típicas incluem células T e B, monócitos/macrófagos, células dendríticas, neutrófilos e células NK. A transferência mediada por trogocitose de uma molécula de superfície celular, como, por exemplo, CD38, de uma célula doadora para uma célula aceitadora também pode resultar na transferência de um complexo anticorpo-antígeno da célula doadora para uma célula aceitadora, ou seja, um anticorpo complexo de antígeno onde um anticorpo está ligado à molécula da superfície celular. Em particular, uma forma especializada de trogocitose pode ocorrer quando as células aceitadoras são células efetoras que expressam o receptor do Fc-gama (FcγR); essas células aceitadoras podem absorver e internalizar complexos imunes associados a células doadoras compostas de anticorpos específicos ligados a antígenos alvo em células doadoras, tipicamente após a ligação de do FcγRs às regiões do Fc dos anticorpos. Os ensaios adequados para avaliar a trogocitose são conhecidos na técnica e incluem, por exemplo, o ensaio no Exemplo 8. Exemplos não limitativos de ensaios para determinar a trogocitose de células que expressam CD38 mediadas por um anticorpo CD38 incluem o seguinte:

Trogocitose (células Daudi):

(a') diferenciar monócitos isolados de fresco em macrófagos com 5 dias de GM-CSF;

(b') plaquear cerca de 100,000 macrófagos por poço em meio de células dendríticas com GM-CSF;

(c') adicionar de cerca de 20,000 células Daudi opsonizadas com anticorpo CD38, marcadas com um corante de membrana fluorescente genérico, por poço por 45 minutos a 37°C;

(d') medir a expressão de CD38 em células Daudi em um citômetro de fluxo, em que uma redução em CD38 em células Daudi opsonizadas com anticorpo CD38 em comparação com um controle indica trogocitose.

Trogocitose (Tregs):

[0091] (a) plaquear cerca de 500,000 PBMCs isolados de fresco por poço em meio de cultura de células O/N a 37°C;

(b) adicionar cerca de 100,000, Tregs opsonizados com anticorpo CD38, marcados com um corante de amina intracelular fluorescente genérico, por poço durante a noite (O/N) a 37°C; e

(c) medir a expressão de CD38 em Tregs em um citômetro de fluxo, em que uma redução em CD38 em Tregs opsonizados com anticorpo CD38 em comparação com um controle indica trogocitose.

[0092] O controle pode ser selecionado pelo especialista com base no propósito específico do estudo ou ensaio em questão. No entanto, exemplos não limitativos de controles incluem (i) a ausência de qualquer anticorpo e (ii) um anticorpo de controle de isótipo. Um exemplo de um anticorpo de controle de isótipo é o anticorpo b12, tendo as sequências VH e VL descritas na Tabela 1. Em algumas modalidades onde se deseja avaliar o efeito de trogocitose de uma variante de anticorpo como aqui descrito, o controle pode ser (iii) um anticorpo parental ou de referência com uma região de ligação ao antígeno diferente e/ou uma região do Fc diferente.

[0093] Em algumas modalidades, na etapa (b), além ou em alternativa ao corante fluorescente de amina intracelular, as Tregs são marcadas com um corante de membrana fluorescente genérico.

[0094] Em algumas modalidades, na etapa (d ') e (c) dos ensaios de trogocitose descritos acima, a redução no anticorpo CD38 nas células do doador também pode ser medida. Por exemplo, nos casos em que o anticorpo CD38 é um anticorpo IgG humano (huIgG), um anticorpo secundário pode ser

usado para detectar huIgG.

[0095] Além das células Daudi (ATCC CCL-213), as células tumorais adequadas para o primeiro ensaio incluem, sem limitação, aquelas listadas na Tabela 2, particularmente aquelas com uma alta expressão de CD38.

[0096] Além de Tregs, células que expressam CD38 adequadas para o segundo ensaio incluem células imunes, como, por exemplo, células NK, células B, células T e monócitos, bem como células tumorais listadas na Tabela 2, particularmente aquelas com uma expressão de CD38 baixa nível.

[0097] O termo “vetor”, tal como aqui utilizado, pretende se referir a uma molécula de ácido nucleico capaz de induzir a transcrição de um segmento de ácido nucleico ligado ao vetor. Um tipo de vetor é um “plasmídeo”, que tem a forma de uma alça de DNA circular de fita dupla. Outro tipo de vetor é um vetor viral, em que o segmento de ácido nucleico pode ser ligado ao genoma viral. Certos vetores são capazes de replicação autônoma em uma célula hospedeira na qual são introduzidos (por exemplo, vetores bacterianos com uma origem de replicação bacteriana e vetores episomais de mamíferos). Outros vetores (tais como vetores de mamíferos não episomais) podem ser integrados no genoma de uma célula hospedeira após a introdução na célula hospedeira e, assim, são replicados junto com o genoma do hospedeiro. Além disso, certos vetores são capazes de direcionar a expressão de genes aos quais estão operativamente ligados. Tais vetores são aqui ditos como “vetores de expressão recombinantes” (ou simplesmente, “vetores de expressão”). Em geral, os vetores de expressão úteis em técnicas de DNA recombinante estão frequentemente na forma de plasmídeos. Na presente especificação, “plasmídeo” e “vetor” podem ser usados indistintamente, pois o plasmídeo é a forma de vetor mais comumente usada. No entanto, a presente invenção pretende incluir outras formas de vetores de expressão, tais como vetores virais (tais como retrovírus defeituosos de replicação, adenovírus e vírus adenoassociados), que desempenham funções

equivalentes.

[0098] O termo “célula hospedeira recombinante” (ou simplesmente “célula hospedeira”), como aqui utilizado, pretende se referir a uma célula na qual um ou mais vetores de expressão foram introduzidos. Por exemplo, a HC e LC de uma variante de anticorpo, conforme descrito neste documento, podem ser codificadas pelo mesmo vetor de expressão e uma célula hospedeira transfectada com o vetor de expressão. Alternativamente, a HC e LC de uma variante de anticorpo como aqui descrito podem ser codificadas por diferentes vetores de expressão e uma célula hospedeira cotransfectada com os vetores de expressão. Deve ser entendido que o termo “célula hospedeira” se destina a se referir não apenas à célula em questão em particular, mas também à progênie de tal célula. Como certas modificações podem ocorrer nas gerações seguintes devido a mutações ou influências ambientais, tal progênie pode não ser, de fato, idêntica à célula-mãe, mas ainda está incluída no escopo do termo “célula hospedeira”, conforme usado neste documento. As células hospedeiras recombinantes incluem, por exemplo, transfectomas, tais como células CHO, células HEK 293, PER.C6, células NS0 e células linfocíticas, e células procarióticas, como E. coli e outros hospedeiros eucarióticos, como células vegetais e fungos.

[0099] O termo “transfectoma”, tal como aqui utilizado, inclui células hospedeiras eucarióticas recombinantes que expressam o Ab ou um antígeno alvo, como células CHO, PER.C6, células NS0, células HEK 293, células vegetais ou fungos, incluindo células de levedura.

[00100] O termo “tratamento” se refere à administração de uma quantidade eficaz de uma variante de anticorpo terapeuticamente ativa da presente invenção com a finalidade de aliviar, melhorar, interromper ou erradicar (curar) sintomas ou estados de doença.

[00101] O termo “quantidade eficaz” ou “quantidade terapeuticamente eficaz” se refere a uma quantidade eficaz, nas dosagens e durante os períodos

de tempo necessários, para atingir um resultado terapêutico desejado. Uma quantidade terapeuticamente eficaz de um anticorpo pode variar de acordo com fatores como o estado da doença, idade, sexo e peso do indivíduo, e a capacidade do anticorpo de induzir uma resposta desejada no indivíduo. Uma quantidade terapeuticamente eficaz é também aquela em que quaisquer efeitos tóxicos ou prejudiciais da variante do anticorpo são superados pelos efeitos terapeuticamente benéficos.

Modalidades específicas da invenção

[00102] Conforme descrito acima, a presente invenção se refere a anticorpos que são variantes do anticorpo C anti-CD38, particularmente aqueles que compreendem uma região do Fc variante que compreende uma mutação em um ou mais resíduos de aminoácidos selecionados a partir do grupo que corresponde a E430, E345 e S440 em um humano Cadeia pesada de IgG1.

[00103] Como mostrado no Exemplo 3, o CDC foi aumentado para todos os três anticorpos CD38 IgG1 testados - A, B e C - após a introdução de uma mutação em E430G. Surpreendentemente, no entanto, a magnitude do aumento de CDC diferiu entre os clones de anticorpo testados. Sem a mutação em E430G, IgG1-B já era um bom indutor de CDC, enquanto IgG1-C e IgG1-A induziram modesto e nenhum CDC, respectivamente. No entanto, após a introdução da mutação em E430G, no entanto, IgG1-C-E430G induziu CDC mais eficaz em comparação com IgG1-B-E430G. Em particular em células tumorais e células T reguladoras que têm níveis de expressão de CD38 mais baixos, os valores de EC50 de IgG1-C-E430G foram menores do que os de IgG1-B-E430G.

[00104] Além disso, uma variante de anticorpo de acordo com a invenção também pode demonstrar ADCC. Por exemplo, como mostrado no Exemplo 4, IgG1-C atingiu uma maior porcentagem de lise máxima em comparação com IgG1-B no ensaio de liberação de ⁵¹Cr e uma ligação

aumentada de do FcγRIIIa no ensaio repórter ADCC em comparação com IgG1-B. A introdução da mutação em E430G reduziu a porcentagem máxima de lise no ensaio de liberação de ^{51}Cr e a ligação de do FcγRIIIa no ensaio repórter ADCC para todos os três anticorpos. IgG1-C-E430G induziu uma lise percentual máxima semelhante em comparação com IgG1-B-E430G e IgG1-A-E430G no ensaio de liberação de ^{51}Cr e ligação do FcγRIIIa semelhante no ensaio repórter ADCC.

[00105] Além disso, a capacidade de um anticorpo anti-CD38 para inibir a atividade da ciclase CD38 pode ser mantida na forma de uma variante de anticorpo de acordo com a invenção. Por exemplo, como mostrado no Exemplo 7, IgG1-C-E430G exibiu inibição mais forte da atividade da ciclase CD38 em comparação com IgG1-B-E430G, o primeiro resultando em uma inibição de cerca de 40% e o último cerca de 25%. Sem estar limitado à teoria, uma inibição mais forte da atividade da ciclase CD38 pode reduzir a produção de cADPR, um segundo mensageiro potente que regula a mobilização de Ca^{2+} do citosol, que por sua vez pode levar à diminuição da mobilização de Ca^{2+} e redução da sinalização de vias a jusante que controlam vários processos, como proliferação e secreção de insulina. Sem estar limitado à teoria, uma inibição mais forte da atividade de ciclase de CD38 pode, assim, afetar, por exemplo, reduzir, a capacidade das células imunossupressoras de suprimir uma resposta imune.

[00106] Outras funcionalidades que podem ser moduladas incluem a trogocitose. Especificamente, a expressão de CD38 em células Daudi foi significativamente reduzida pela cocultura com macrófagos e anticorpo CD38; no entanto, a redução na expressão de CD38 foi mais forte com o anticorpo mutado E430G (Exemplo 8). Surpreendentemente, a expressão de CD38 em células T reguladoras cocultivadas com PBMCs foi reduzida apenas após incubação com anticorpo CD38 mutado em E430G; nenhuma redução na expressão de CD38 foi encontrada quando as células T reguladoras foram

incubadas com o anticorpo B. Sem estar limitado à teoria, a capacidade das variantes do anticorpo de acordo com a presente invenção para induzir trogocitose de células imunes não cancerosas que expressam CD38, particularmente células imunossupressoras, pode, em um paciente com câncer, resultar em um aumento da resposta imune contra células tumorais, independentemente de as células tumorais expressarem CD38 ou não.

[00107] A variante de anticorpo da presente invenção também pode ser capaz de matar células tumorais *in vivo*, como mostrado no Exemplo 9, onde duas doses semanais de IgG1-C-E430G reduziram o crescimento do tumor em dois de cinco modelos DLBCL PDX testados que tinham CD38 mais alto Expressão de mRNA.

[00108] Assim, em um aspecto, a invenção fornece uma ligação variante de anticorpo à CD38 humana, a variante de anticorpo compreendendo uma região de ligação a antígeno que compreende os CDRs VH e VL do anticorpo C conforme estabelecido como SEQ ID NO: 2 (VH-3003-C_CDR1), SEQ ID NO: 3 (VH-3003-C_CDR2), SEQ ID NO: 4 (VH-3003-C_CDR3), SEQ ID NO: 6 (VL-3003-C_CDR1), AAS (VL-3003-C_CDR2) e SEQ ID NO: 7 (VL-3003-C_CDR3) na Tabela 1, e uma região do Fc variante que compreende uma mutação em um ou mais resíduos de aminoácidos selecionados a partir do grupo que corresponde a E430, E345 e S440 em uma cadeia pesada de IgG1 humano.

[00109] Em uma modalidade, a ligação variante do anticorpo aa CD38 humana compreende

(a) uma região de ligação ao antígeno que compreende um CDR1 de VH tendo a sequência conforme estabelecido na SEQ ID NO: 2, um CDR2 de VH tendo a sequência conforme estabelecido na SEQ ID NO: 3, um CDR3 de VH tendo a sequência conforme estabelecido na SEQ ID NO: 4, um CDR1 de VL tendo a sequência conforme estabelecido na SEQ ID NO: 6, um CDR2 de VL tendo a sequência AAS, e um CDR3 de VL tendo a sequência

conforme estabelecido na SEQ ID NO: 7, e

(b) uma região do Fc variante que compreende uma mutação em um ou mais resíduos de aminoácidos selecionados a partir do grupo que corresponde a E430, E345 e S440 em uma cadeia pesada de IgG1 humano, em que os resíduos de aminoácidos são numerados de acordo com o índice da UE.

[00110] Em outras modalidades, a variante do anticorpo também pode ou alternativamente ser distinguida por sequências de aminoácidos específicas ou mutações específicas na região de ligação ao antígeno ou região do Fc e/ou por sua capacidade de induzir funções efetoras ou modular a atividade da enzima CD38. Estes são descritos mais detalhadamente abaixo.

Região de ligação ao antígeno e regiões variáveis

[00111] A região de ligação ao antígeno compreende um ou mais domínios variáveis de anticorpo permitindo a ligação específica a CD38, tal como uma região de VH e uma região de VL. Da mesma forma, as cadeias pesadas e leves compreendem uma região de VH e VL, respectivamente. Na seguinte referência a sequências na região de ligação ao antígeno podem ser aplicadas de forma semelhante a sequências da cadeia pesada e/ou leve de uma variante de anticorpo de acordo com a presente invenção. Vantajosamente, os CDRs, região de VH e/ou região de VL são semelhantes ou idênticos aos do anticorpo C, conforme estabelecido na Tabela 1.

[00112] Em uma modalidade preferida, a região de ligação ao antígeno e/ou as cadeias pesadas e/ou leves compreendem as CDRs do anticorpo C, apresentadas como SEQ ID NO: 2 (VH-3003-C_CDR1), SEQ ID NO: 3 (VH-3003-C_CDR2), SEQ ID NO: 4 (VH-3003-C_CDR3), SEQ ID NO: 6 (VL-3003-C_CDR1), AAS (VL-3003-C_CDR2) e SEQ ID NO: 7 (VL-3003-C_CDR3). Em outra modalidade preferida, as sequências VH e VL são aquelas do anticorpo C, ou seja, a região de VH compreende a sequência da SEQ ID NO: 1 (VH-3003-C) e a região de VL compreende a sequência da

SEQ ID NO: 5 (VL-3003-C).

[00113] No entanto, é bem conhecido na técnica que mutações em VH e VL de um anticorpo podem ser feitas para, por exemplo, aumentar a afinidade de um anticorpo para seu antígeno alvo, reduzir sua imunogenicidade potencial e/ou aumentar o rendimento de anticorpos expressos por uma célula hospedeira. Por conseguinte, em algumas modalidades, anticorpos que compreende variantes das sequências de CDR, VH e/ou VL do anticorpo C também estão contemplados, particularmente variantes funcionais da região de VL e/ou VH do anticorpo C. As variantes funcionais podem diferir em um ou mais aminoácidos ácidos em comparação com a sequência parental VH e/ou VL, por exemplo, em um ou mais CDRs, mas ainda permite que a região de ligação ao antígeno retenha pelo menos uma proporção substancial (pelo menos cerca de 50 por cento, 60 por cento, 70 por cento, 80 por cento, 90 por cento, 95 por cento ou mais) da afinidade e/ou especificidade do anticorpo parental. Normalmente, essas variantes funcionais retêm uma identidade de sequência significativa com a sequência parental. Variantes exemplares incluem aquelas que diferem da respectiva região de VH ou VL parental em 12 ou menos, como 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 ou 1 mutação(ões), como substituições, inserções ou deleções de resíduos de aminoácidos. Variantes exemplares incluem aquelas que diferem das regiões VH e/ou VL e/ou CDR das sequências parentais principalmente por substituições conservativas de aminoácidos; por exemplo, 12, tal como 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 ou 1 das substituições de aminoácidos na variante podem ser conservativas. Em alguns casos, um anticorpo que compreende variantes da VH e/ou VL do anticorpo C pode estar associado a uma maior afinidade e/ou especificidade do que o anticorpo parental. Para o propósito da presente invenção, as variantes de VH e/ou VL que permitem uma afinidade e especificidade retidas ou melhoradas do anticorpo na sua ligação a CD38 são particularmente preferidas.

[00114] Por exemplo, o documento WO 2011/154453 A1 divulga anticorpos CD38 que compreende sequências de aminoácidos da região CDR, VH e VL variantes adequadas, em que os resíduos de aminoácidos em certas posições diferem daqueles nas CDRs, VH e VL do anticorpo C como mostrado na Tabela 1. Estas posições representam, portanto, posições candidatas em que mutações nas sequências de CDR, VH e VL podem ser feitas enquanto retém ou melhora a afinidade e especificidade do anticorpo em sua ligação a CD38. Em particular, as posições nas CDRs de VH e VL que podem ser mutadas em variantes funcionais de VH e VL do anticorpo C estão indicadas em SEQ ID NOS: 40 a 43.

[00115] Assim, em algumas modalidades, uma ou mais mutações específicas são feitas nos CDRs conforme estabelecido em SEQ ID NOS: 40 a 43, ou seja, quaisquer variantes funcionais da região de VH e/ou VL compreendem mutações nos CDRs conforme estabelecido em uma ou mais das SEQ ID NO: 40 (CDR1 de VH), SEQ ID NO: 41 (CDR2 de VH), SEQ ID NO: 42 (CDR3 de VH) e SEQ ID NO: 44 (CDR3 de VL). As regiões VH e VL de tal variante de anticorpo podem opcionalmente manter as regiões estruturais originais do anticorpo C. Em uma modalidade específica, a região de ligação ao antígeno compreende as CDRs conforme estabelecido na SEQ ID NO: 40 em que X1 é S (CDR1 de VH), SEQ ID NO: 41 em que X1 é R, X2 é K, X3 é A (CDR2 de VH), SEQ ID NO: 42 em que X1 é A, X2 é D e X3 é V (CDR3 de VH), SEQ ID NO: 43 (CDR1 de VL), AAS (CDR2 de VL) e SEQ ID NO: 44 em que X1 é S (CDR3 de VL). Em uma modalidade específica, a região de ligação ao antígeno compreende os CDRs conforme estabelecido na SEQ ID NO: 40 em que X1 é R (CDR1 de VH), SEQ ID NO: 41 em que X1 é V, X2 é K, X3 é T (CDR2 de VH), SEQ ID NO: 42 em que X1 é T, X2 é A e X3 é F (CDR3 de VH), SEQ ID NO: 43 (CDR1 de VL), AAS (CDR2 de VL) e SEQ ID NO: 44 em que X1 é N (CDR3 de VL). Em uma modalidade específica, a região de ligação ao antígeno compreende os

CDRs conforme estabelecido na SEQ ID NO: 40 em que X1 é S (CDR1 de VH), SEQ ID NO: 41 em que X1 é R, X2 é K, X3 é T (CDR2 de VH), SEQ ID NO: 42 em que X1 é A, X2 é D e X3 é V (CDR3 de VH), SEQ ID NO: 43 (CDR1 de VL), AAS (CDR2 de VL) e SEQ ID NO: 44 em que X1 é S (CDR3 de VL). Em uma modalidade específica, a região de ligação ao antígeno compreende os CDRs conforme estabelecido na SEQ ID NO: 40 em que X1 é R (CDR1 de VH), SEQ ID NO: 41 em que X1 é V, X2 é K, X3 é V (CDR2 de VH), SEQ ID NO: 42 em que X1 é T, X2 é A e X3 é F (CDR3 de VH), SEQ ID NO: 43 (CDR1 de VL), AAS (CDR2 de VL) e SEQ ID NO: 44 em que X1 é N (CDR3 de VL).

[00116] Em algumas modalidades, nenhuma mutação é feita nos CDRs, ou seja, quaisquer variantes funcionais da região de VH e/ou VL retêm as sequências de CDR estabelecidas em SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 ou SEQ ID NO: 6, AAS, SEQ ID NO: 7, respectivamente representando as sequências de CDR1 de VH-3 ou CDR1 de VL-3 do anticorpo C.

[00117] Em uma modalidade, a região de VH compreende SEQ ID NO: 1 ou uma sequência de aminoácidos com pelo menos 80% de identidade, tal como 90%, ou 95%, ou 97%, ou 98%, ou 99%, para com a SEQ ID NO:1. Por exemplo, a VH pode diferir da SEQ ID NO: 1 em 12 ou menos, como 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 ou 1 mutações, como substituições, inserções ou deleções de resíduos de aminoácidos. Em uma modalidade, a região de VH difere da SEQ ID NO: 1 apenas em 12 ou menos, tal como 5 ou menos, tal como 5, 4, 3, 2 ou 1 substituições de aminoácidos. As substituições de aminoácidos podem, por exemplo, ser substituições conservativas de aminoácidos conforme descrito em outro lugar neste documento. Em uma modalidade particular, nenhuma mutação é feita nos CDRs de VH, isto é, qualquer VH variante retém as sequências de CDR C estabelecidas em SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4.

[00118] Em uma modalidade, a região de VL compreende SEQ ID NO: 5 ou uma sequência de aminoácidos com pelo menos 80% de identidade, tal como 90%, ou 95%, ou 97%, ou 98%, ou 99%, para com a SEQ ID NO:5. Por exemplo, a VL pode diferir da SEQ ID NO: 5 em 12 ou menos, como 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 ou 1 mutações, como substituições, inserções ou deleções de resíduos de aminoácidos. Em uma modalidade, a região de VL difere da SEQ ID NO: 5 apenas em 12 ou menos, como 5 ou menos, como 5, 4, 3, 2 ou 1 substituições de aminoácidos. As substituições de aminoácidos podem, por exemplo, ser substituições conservativas de aminoácidos conforme descrito em outro lugar neste documento. Em uma modalidade particular, nenhuma mutação é feita nos CDRs de VL, isto é, qualquer VH variante retém as sequências de CDR C estabelecidas em SEQ ID NO: 6, AAS, SEQ ID NO: 7.

[00119] Em uma modalidade, a variante do anticorpo compreende uma região de VH que compreende a sequência da SEQ ID NO: 1 e uma região de VL que compreende a sequência da SEQ ID NO: 5.

Região do Fc variante e região de CH

[00120] Mutações em resíduos de aminoácidos nas posições correspondentes a E430, E345 e S440 em uma cadeia pesada de IgG1 humano, em que os resíduos de aminoácidos são numerados de acordo com o índice da UE, podem melhorar a capacidade de um anticorpo de induzir CDC (ver, por exemplo, Exemplo 3). Sem estar limitado pela teoria, acredita-se que ao substituir um ou mais aminoácidos nessas posições, a oligomerização do anticorpo pode ser estimulada, modulando assim as funções efetoras de modo a, por exemplo, aumentar a ligação de C1q, ativação do complemento, CDC, ADCP, internalização ou outra função relevante (s) que podem prover eficácia *in vivo*.

[00121] A presente invenção se refere a uma variante de anticorpo que compreende uma região de ligação ao antígeno e uma região do Fc variante.

[00122] Em certas modalidades, uma ligação variante de anticorpo aa

CD38 humana compreende

(a) uma cadeia pesada que compreende uma região de VH que compreende SEQ ID NO: 1 e uma região de CH de IgG1 humano com uma mutação em um ou mais de E430, E345 e S440, os resíduos de aminoácidos sendo numerados de acordo com o índice da UE, e

(b) uma cadeia leve que compreende uma região de VL que compreende SEQ ID NO: 5.

[00123] Uma variante de anticorpo da presente invenção compreende uma região do Fc variante ou uma região de CH de IgG1 humano que compreende uma mutação em um ou mais de E430, E345 e S440. Na seguinte referência às mutações na região do Fc podem ser aplicadas de forma semelhante à (s) mutação(ões) na região de CH de IgG1 humano.

[00124] Conforme descrito neste documento, a posição de um aminoácido a ser mutado na região do Fc pode ser dada em relação a (isto é, “que corresponde a”) sua posição em uma cadeia pesada de IgG1 humano de ocorrência natural (tipo selvagem), quando numerada de acordo com para o índice da UE. Portanto, se a região do Fc parental já contém uma ou mais mutações e/ou se a região do Fc parental for, por exemplo, uma região do Fc IgG2, IgG3 ou IgG4, a posição do aminoácido que corresponde a um resíduo de aminoácido, tal como, por exemplo, E430 em uma cadeia pesada de IgG1 humano numerada de acordo com o índice da UE pode ser determinado por alinhamento. Especificamente, a região do Fc parental está alinhada com uma sequência de cadeia pesada de IgG1 humano de tipo selvagem de modo a identificar o resíduo na posição que corresponde a E430 na sequência de cadeia pesada de IgG1 humano. Qualquer sequência de aminoácidos da região constante de IgG1 humano de tipo selvagem pode ser útil para este propósito, incluindo qualquer um dos diferentes alótipos de IgG1 humano estabelecidos na Tabela 1. Isso é ilustrado na Figura 1, que mostra um alinhamento entre dois alótipos de IgG1 humano diferentes - IgG1m(f) e IgG1m(a) - e IgG2,

IgG3 e IgG4 humana de tipo selvagem, especificamente dos segmentos correspondentes aos resíduos P247 a K447 em uma cadeia pesada de IgG1 humano, em que os resíduos de aminoácidos são numerados de acordo com a UE índice.

[00125] Por conseguinte, nos parágrafos restantes desta seção e em outros lugares aqui, a menos que especificado de outra forma ou contradito pelo contexto, as posições de aminoácidos ditas são aquelas correspondentes a resíduos de aminoácidos em uma cadeia pesada de IgG humana de tipo selvagem, em que os resíduos de aminoácidos são numerados de acordo com o índice da UE:

Em modalidades separadas e específicas, a região do Fc variante e/ou a região de CH de IgG1 humano compreende uma mutação em apenas um de E430, E345 e S440; em E430 e E345; em E430 e S440; em E345 e S440; ou em todos os E430, E345 e S440. Em algumas modalidades, a região do Fc variante e/ou a região de CH de IgG1 humano compreende uma mutação em apenas um de E430, E345 e S440; em E430 e E345; em E430 e S440; em E345 e S440; ou em todos os E430, E345 e S440, com a condição de que qualquer mutação em S440 seja S440W ou S440Y. Em outras modalidades separadas e específicas, a mutação é uma substituição de aminoácido. Em uma modalidade, a mutação é uma substituição de aminoácido em apenas um de E430X, E345X e S440X; em E430X e E345X; em E430X e S440X; em E345X e S440X; ou em todos os E430X, E345X e S440X, de preferência com a condição de que qualquer mutação em S440X seja S440Y ou S440W. Mais preferencialmente, as mutações E430X, E345X e S440X são selecionadas separadamente de E430G, E345K, E430S, E430F, E430T, E345Q, E345R, E345Y, S440Y e S440W.

[00126] Em uma modalidade, a mutação em um ou mais resíduos de aminoácidos é selecionada a partir do grupo que consiste em E430G, E345K, E430S, E430F, E430T, E345Q, E345R, E345Y, S440Y e S440W.

[00127] Em uma modalidade preferida, a mutação em um ou mais resíduos de aminoácidos é selecionada a partir do grupo que corresponde a E430G, E345K, E430S e E345Q.

[00128] Em uma modalidade, a mutação está em um resíduo de aminoácido que corresponde a E430, tal como uma substituição de aminoácido, E430X, por exemplo, selecionado daqueles correspondentes a E430G, E430S, E430F ou E430T. Em uma modalidade preferida, a mutação em um ou mais resíduos de aminoácidos compreende E430G. Em outra modalidade preferida, a mutação em um ou mais resíduos de aminoácidos compreende E430S, opcionalmente em que nenhuma mutação é feita nos resíduos de aminoácidos correspondentes a E345 e S440. Em uma modalidade particularmente preferida, a mutação em um ou mais resíduos de aminoácidos consiste em E430G, isto é, nenhuma mutação é feita nos resíduos de aminoácidos correspondentes a E345 e S440.

[00129] Em uma modalidade, a mutação está em um resíduo de aminoácido que corresponde a E345, tal como uma substituição de aminoácido, E345X, por exemplo, selecionado daqueles correspondentes a E345K, E345Q, E345R e E345Y. Em uma modalidade preferida, a mutação em um ou mais resíduos de aminoácidos compreende E345K. Em outra modalidade preferida, a mutação em um ou mais resíduos de aminoácidos compreende E345Q, opcionalmente em que nenhuma mutação é feita nos resíduos de aminoácidos correspondentes a E430 e S440. Em uma modalidade particularmente preferida, a mutação em um ou mais resíduos de aminoácidos consiste em E345K, isto é, nenhuma mutação é feita nos resíduos de aminoácidos correspondentes a E430 e S440.

[00130] Em uma modalidade, a mutação está em um resíduo de aminoácido que corresponde a S440, tal como uma substituição de aminoácido, S440X, tipicamente selecionada daqueles correspondentes a S440Y e S440W. Em uma modalidade preferida, a mutação em um ou mais

resíduos de aminoácidos compreende S440W, opcionalmente em que nenhuma mutação é feita nos resíduos de aminoácidos correspondentes a E430 e E345. Em uma modalidade preferida, a mutação em um ou mais resíduos de aminoácidos compreende S440Y, opcionalmente em que nenhuma mutação é feita nos resíduos de aminoácidos correspondentes a E430 e E345.

[00131] De preferência, a variante do anticorpo compreende uma região do Fc variante de acordo com qualquer uma das seções anteriores, cuja região do Fc variante é uma variante de uma região do Fc de IgG humana selecionada do grupo que consiste em uma região do Fc de IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 humana. Ou seja, a mutação em um ou mais resíduos de aminoácidos correspondentes a E430, E345 e S440 é/são feitas em uma região do Fc parental que é uma região do Fc de IgG humana selecionada do grupo que consiste em um do Fc de IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 região. De preferência, a região do Fc parental é uma região do Fc de IgG humana de ocorrência natural (tipo selvagem), tal como uma região do Fc de IgG1, IgG2, IgG3 ou IgG4 de tipo selvagem humana, ou um isótipo misto das mesmas. Assim, a região do Fc variante pode, exceto para a mutação recitada (em um ou mais resíduos de aminoácidos selecionados a partir do grupo que corresponde a E430, E345 e S440), ser um isótipo de IgG1, IgG2, IgG3 ou IgG4 humano, ou um isótipo misto isótipo deste.

[00132] Em uma modalidade, a região do Fc parental e/ou região de CH de IgG1 humano é um isótipo de IgG1 humano de tipo selvagem.

[00133] Assim, a região do Fc variante pode, exceto para a mutação recitada (em um ou mais resíduos de aminoácidos selecionados a partir do grupo que corresponde a E430, E345 e S440), ser uma região do Fc de IgG1 humano.

[00134] Em uma modalidade específica, a região do Fc parental e/ou região de CH de IgG1 humano é um isótipo de IgG1m(f) de tipo selvagem

humano.

[00135] Em uma modalidade específica, a região do Fc parental e/ou região de CH de IgG1 humano é um isótipo de IgG1m(z) de tipo selvagem humano.

[00136] Em uma modalidade específica, a região do Fc parental e/ou região de CH de IgG1 humano é um isótipo de IgG1m(a) de tipo selvagem humano.

[00137] Em uma modalidade específica, a região do Fc parental e/ou região de CH de IgG1 humano é um isótipo de IgG1m(x) de tipo selvagem humano.

[00138] Em uma modalidade específica, a região do Fc parental e/ou região de CH de IgG1 humano é uma IgG1 de tipo selvagem humano de um alótipo misto, tal como IgG1m (za), IgG1m (zax), IgG1m (fa) ou semelhantes.

[00139] Assim, a região do Fc variante e/ou região de CH de IgG1 humano podem, exceto para a mutação recitada (em um ou mais resíduos de aminoácidos selecionados a partir do grupo que corresponde a E430, E345 e S440), ser uma IgG1m humana (f), Alótipo IgG1m(a), IgG1m(x), IgG1m(z) ou um alótipo misto de quaisquer dois ou mais dos mesmos.

[00140] Em uma modalidade específica, a região do Fc parental e/ou região de CH de IgG1 humano é um isótipo de IgG1m(za) de tipo selvagem humano.

[00141] Em uma modalidade específica, a região do Fc parental é um isótipo IgG2 de tipo selvagem humano.

[00142] Em uma modalidade específica, a região do Fc parental é um isótipo IgG3 de tipo selvagem humano.

[00143] Em uma modalidade específica, a região do Fc parental é um isótipo IgG4 de tipo selvagem humano.

[00144] As sequências de aminoácidos da região de CH de exemplos

específicos de isótipos de IgG humana de tipo selvagem e alótipos de IgG1 são apresentados na Tabela 1. Em algumas modalidades, a região do Fc parental compreende o CH2-CH3 ou, opcionalmente, os segmentos de dobradiça-CH2-CH3 de tais sequências de aminoácidos da região de CH de tipo selvagem.

[00145] Assim, em uma modalidade específica, a região do Fc parental é um isótipo de IgG1 de tipo selvagem humano que compreende os resíduos de aminoácidos correspondentes a 231-447 em uma cadeia pesada de IgG1 humano de acordo com a numeração EU. Por exemplo, a região do Fc parental pode compreender os resíduos de aminoácidos 114 a 330 (numeração direta) de uma sequência selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22 e SEQ ID NO: 23. Em uma modalidade específica, a região do Fc parental é um isótipo de IgG1 de tipo selvagem humano que compreende os resíduos de aminoácidos correspondentes a 216-447 em uma cadeia pesada de IgG1 humano de acordo com a numeração EU. Por exemplo, a região do Fc parental pode compreender os resíduos de aminoácidos 99 a 330 (numeração direta) de uma sequência selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22 e SEQ ID NO: 23. Conforme descrito em outro lugar neste documento para a produção de anticorpos terapêuticos, o aminoácido C-terminal K447 pode às vezes ser deletado ou removido. Portanto, a região do Fc parental pode compreender os resíduos de aminoácidos 114 a 329 (numeração direta) ou os resíduos de aminoácidos 99 a 329 (numeração direta) de SEQ ID NO: 45.

[00146] Em uma modalidade específica, a região do Fc variante é uma variante de um isótipo de IgG1 de tipo selvagem humano que compreende os resíduos de aminoácidos correspondentes a 231-447 em uma cadeia pesada de IgG1 humano de acordo com a numeração EU. Por exemplo, a região do Fc variante pode compreender os resíduos de aminoácidos 114 a 330 (numeração

direta) de uma sequência selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32 e SEQ ID NO: 33. Em outra modalidade, a região do Fc variante pode compreender os resíduos de aminoácidos 114 a 329 (numeração direta) de SEQ ID NO: 46.

[00147] Em uma modalidade específica, a região do Fc variante é uma variante de um isótipo de IgG1 de tipo selvagem humano que compreende os resíduos de aminoácidos correspondentes a 216-447 em uma cadeia pesada de IgG1 humano de acordo com a numeração EU. Por exemplo, a região do Fc variante pode compreender os resíduos de aminoácidos 99 a 330 (numeração direta) de uma sequência selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32 e SEQ ID NO: 33. Em outra modalidade, a região do Fc variante pode compreender os resíduos de aminoácidos 99 a 329 (numeração direta) da SEQ ID NO: 46.

[00148] Assim, a presente invenção pode ser aplicada a moléculas de anticorpo possuindo uma cadeia pesada de IgG1 humano, tal como uma cadeia pesada de IgG1 humano que compreende uma sequência de aminoácidos da região de CH de IgG1 humano que compreende SEQ ID NO: 19 (IgGm (za)). Assim, o humano A região de CH de IgG1 pode compreender, exceto para a mutação recitada, a sequência de SEQ ID NO: 19.

[00149] A presente invenção também pode ser aplicada a moléculas de anticorpo possuindo uma cadeia pesada de IgG1 humano, tal como uma cadeia pesada de IgG1 humano que compreende uma sequência de aminoácidos da região de CH de IgG1 humano que compreende SEQ ID NO: 20 (IgGm (f)) ou SEQ ID NO: 45. Assim, a região de CH de IgG1 humano pode compreender, exceto para a mutação recitada, a sequência de SEQ ID

NO: 20. Em outra modalidade, a região de CH de IgG1 humano pode compreender, exceto para a mutação recitada, a sequência de SEQ ID NO: 45.

[00150] A presente invenção também pode ser aplicada a moléculas de anticorpo possuindo uma cadeia pesada de IgG1 humano, tal como uma cadeia pesada de IgG1 humano que compreende uma sequência de aminoácidos da região de CH de IgG1 humano que compreende SEQ ID NO: 21 (IgGm (z)). Assim, a região de CH de IgG1 humano pode compreender, exceto para a mutação recitada, a sequência de SEQ ID NO: 21.

[00151] A presente invenção também pode ser aplicada a moléculas de anticorpo possuindo uma cadeia pesada de IgG1 humano, tal como uma cadeia pesada de IgG1 humano que compreende uma sequência de aminoácidos da região de CH de IgG1 humano que compreende SEQ ID NO: 22 (IgGm (a)). Assim, a região de CH de IgG1 humano pode compreender, exceto para a mutação recitada, a sequência de SEQ ID NO: 22.

[00152] A presente invenção também pode ser aplicada a moléculas de anticorpo possuindo uma cadeia pesada de IgG1 humano, tal como uma cadeia pesada de IgG1 humano que compreende uma sequência de aminoácidos da região de CH de IgG1 humano que compreende SEQ ID NO: 23 (IgG1m(x)). Assim, a região de CH de IgG1 humano pode compreender, exceto para a mutação recitada, a sequência de SEQ ID NO: 23.

[00153] Em outras modalidades separadas e específicas, a região de CH de IgG1 humano compreende uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NO: 24 a SEQ ID NO: 33 e SEQ ID NO: 45.

[00154] Em uma modalidade específica, a região de CH de IgG1 humano compreende SEQ ID NO: 24 (IgG1m(f) -E430G) ou SEQ ID NO: 46, opcionalmente em que a cadeia leve compreende um CL que compreende SEQ ID NO: 37.

[00155] Em uma modalidade específica, a variante do anticorpo é um

anticorpo monoespecífico que compreende duas HCs que são idênticas na sequência de aminoácidos e duas LCs que são idênticas na sequência de aminoácidos.

[00156] A presente invenção também pode ser aplicada a moléculas de anticorpo possuindo uma cadeia pesada de IgG2 humana, tal como uma cadeia pesada de IgG2 humana que compreende uma sequência de aminoácidos da região de CH de IgG2 humana que compreende SEQ ID NO: 34.

[00157] A presente invenção também pode ser aplicada a moléculas de anticorpo possuindo uma cadeia pesada de IgG3 humana, tal como uma cadeia pesada de IgG3 humana que compreende uma sequência de aminoácidos da região de CH de IgG3 humana que compreende SEQ ID NO: 35.

[00158] A presente invenção também pode ser aplicada a moléculas de anticorpo possuindo uma cadeia pesada de IgG4 humana, tal como uma cadeia pesada de IgG4 humana que compreende uma sequência de aminoácidos da região de CH de IgG4 humana que compreende SEQ ID NO: 36.

[00159] No entanto, regiões do Fc variantes que compreende uma ou mais mutações adicionais, isto é, mutações em um ou mais outros resíduos de aminoácidos diferentes daqueles correspondentes a E430, E345 e S440 em uma cadeia pesada de IgG1 humano quando numeradas de acordo com o índice da UE, também são contempladas para as variantes de anticorpos aqui descritas. Também ou alternativamente, a região do Fc pode ser um isótipo misto, por exemplo, onde diferentes regiões CH derivam de diferentes isótipos IgG. Consequentemente, como descrito em mais detalhes abaixo, a região do Fc parental pode já compreender uma ou mais mutações adicionais em comparação com uma região do Fc de IgG humana de tipo selvagem (de ocorrência natural) ou pode ser um isótipo misto.

[00160] Em uma modalidade, a região do Fc parental na qual uma mutação em um ou mais resíduos de aminoácidos selecionados a partir do grupo que corresponde a E430, E345 e S440 é introduzida, é uma região do Fc de IgG humana que compreende uma ou mais mutações adicionais em comparação com um IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 humana de tipo selvagem região do Fc, por exemplo, conforme estabelecido em uma das SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35 e SEQ ID NO: 36. Expressa de uma maneira alternativa, a região do Fc variante que compreende uma mutação em E430, E345 e/ou S440 pode diferir também em uma ou mais mutações adicionais de uma região do Fc de referência, tal como uma referência IgG1, IgG2, IgG3 humana de tipo selvagem e Região do Fc de IgG4, por exemplo, conforme estabelecido em uma das SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35 e SEQ ID NO: 36. Por exemplo, exceto para a mutação em um ou mais resíduos de aminoácidos selecionados a partir do grupo que corresponde a E430, E345 e S440, a região do Fc variante pode diferir da região do Fc de tipo selvagem em 12 ou menos, tal como 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 ou 1 mutações, tais como substituições, inserções ou deleções de resíduos de aminoácidos. Por exemplo, o aminoácido Lys (K) do terminal C na posição 447 (numeração da UE) pode ter sido deletado. Algumas células hospedeiras que são utilizadas para a produção de um anticorpo podem conter enzimas capazes de remover a Lys na posição 447, e tal remoção pode não ser homogênea. Os anticorpos terapêuticos podem, portanto, ser produzidos sem a Lys (K) C-terminal para aumentar a homogeneidade do produto. Os métodos para a produção de anticorpos sem a Lys (K) C-terminal são bem conhecidos por um versado na técnica e incluem a engenharia genética do ácido nucleico que expressa o dito anticorpo, métodos enzimáticos e uso de células hospedeiras específicas. Assim, por exemplo, a região do Fc parental pode compreender a sequência

conforme estabelecido na SEQ ID NO: 45.

[00161] De preferência, qualquer uma ou mais mutações adicionais não reduzem a capacidade do anticorpo conforme descrito neste documento, ou seja, um anticorpo que compreende uma mutação em um ou mais resíduos de aminoácidos selecionados a partir do grupo que corresponde a E430, E345 e S440 em uma IgG1 humano cadeia pesada, para induzir CDC e/ou ADCC. Mais preferencialmente, qualquer uma dessas ou mais mutações adicionais não reduzem a capacidade do anticorpo de induzir CDC. Mais preferencialmente, qualquer uma ou mais mutações adicionais não reduzem a capacidade do anticorpo de induzir qualquer um de CDC e ADCC. Os candidatos para uma ou mais mutações adicionais podem, por exemplo, ser testados em ensaios CDC ou ADCC, por exemplo, conforme descrito neste documento, como nos Exemplos 3 e 4. Por exemplo, o CDC de um anticorpo conforme descrito neste documento, por exemplo, IgG1-C-E430G, pode ser testado no ensaio do Exemplo 3 ou um ensaio conforme descrito na próxima seção (ou um ensaio semelhante) com e sem candidatos específicos para uma ou mais mutações adicionais, de modo a determinar o efeito do candidato mutação(ões) adicional(is) na capacidade do anticorpo de induzir CDC. Da mesma forma, o ADCC de um anticorpo como aqui descrito, por exemplo, IgG1-C-E430G, pode ser testado no ensaio do Exemplo 4 ou um ensaio como descrito na próxima seção (ou um ensaio semelhante) com e sem um candidato específico para uma mutação adicional de modo a determinar o efeito da mutação adicional candidata na capacidade do anticorpo de induzir ADCC.

[00162] De preferência, em uma variante de anticorpo compreendendo duas HCs e dois LCs, as regiões do Fc na primeira e na segunda HC são idênticas, de modo que a região do Fc, na forma dimerizada, é um homodímero

[00163] No entanto, em algumas modalidades, em uma variante de

anticorpo compreendendo duas HCs e duas LCs, a região do Fc na primeira HC pode diferir em um ou mais aminoácidos da região do Fc na segunda HC, de modo que a região do Fc, na forma dimerizada, é um heterodímero. Por exemplo, a mutação em um ou mais resíduos de aminoácidos selecionados a partir do grupo que corresponde a E430, E345 e S440 em uma cadeia pesada de IgG1, em que os resíduos de aminoácidos são numerados de acordo com o índice da UE, podem estar presentes apenas em um dos Regiões do Fc. Consequentemente, em algumas modalidades, uma região do Fc pode ser SEQ ID NO: 45 ou uma região do Fc de IgG de tipo selvagem humano selecionada de SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35 e SEQ ID NO: 36, enquanto a outra região do Fc pode ser idêntica, exceto por uma mutação nos ditos um ou mais resíduos de aminoácidos selecionados a partir do grupo que corresponde a E430, E345 e S440 em uma cadeia pesada de IgG1.

[00164] Em uma modalidade, a variante de anticorpo de acordo com qualquer aspecto ou modalidade aqui é, exceto para as mutações recitadas, um anticorpo humano.

[00165] Em uma modalidade, a variante de anticorpo de acordo com qualquer aspecto ou modalidade aqui é, exceto para as mutações recitadas, um anticorpo de comprimento total, tal como um anticorpo de comprimento total humano.

[00166] Em uma modalidade, a variante de anticorpo de acordo com qualquer aspecto ou modalidade aqui é, exceto para as mutações recitadas, um anticorpo bivalente, tal como um anticorpo bivalente humano, tal como um anticorpo bivalente de comprimento total humano.

[00167] Em uma modalidade, a variante de anticorpo de acordo com qualquer aspecto ou modalidade aqui é, exceto para as mutações recitadas, um anticorpo monoclonal, tal como um anticorpo monoclonal humano, tal como um anticorpo monoclonal bivalente humano, tal como um monoclonal

bivalente humano de comprimento total anticorpo.

[00168] Em uma modalidade preferida, a variante de anticorpo de acordo com qualquer aspecto ou modalidade aqui é, exceto para as mutações citadas, um anticorpo IgG1, tal como um anticorpo IgG1 de comprimento total, tal como um anticorpo IgG1 humano de comprimento total, opcionalmente um anticorpo IgG1 κ monoclonal de comprimento total humano bivalente de comprimento, anticorpo κ , por exemplo um anticorpo IgG1m(f) κ monoclonal de comprimento total humano bivalente.

[00169] Uma variante de anticorpo de acordo com a presente invenção está vantajosamente em um formato monoespecífico bivalente, que compreende duas regiões de ligação ao antígeno que se ligam ao mesmo epítipo. No entanto, formatos biespecíficos em que uma das regiões de ligação ao antígeno se liga a um epítipo diferente também são contemplados. Assim, a variante de anticorpo de acordo com qualquer aspecto ou modalidade aqui pode, a menos que contradito pelo contexto, ser um anticorpo monoespecífico ou um anticorpo biespecífico.

[00170] Assim, em uma modalidade, a variante de anticorpo de acordo com qualquer aspecto ou modalidade aqui é, exceto para as mutações recitadas, um anticorpo monoespecífico, tal como um anticorpo monoespecífico humano, tal como um anticorpo monoespecífico de comprimento total humano, tal como um humano completo - anticorpo monoclonal bivalente monoespecífico de comprimento total, como um anticorpo monoclonal bivalente monoespecífico humano de comprimento total.

[00171] Em outra modalidade, a variante de anticorpo de acordo com qualquer aspecto ou modalidade aqui é, exceto para as mutações recitadas, um anticorpo biespecífico, tal como um anticorpo biespecífico de comprimento total, opcionalmente um anticorpo IgG1, κ bivalente e biespecífico de comprimento total.

Modulação de funções

[00172] A variante de anticorpo de acordo com qualquer aspecto ou modalidade aqui pode tipicamente induzir um ou mais, de preferência todos, de CDC, ADCC, ADCP, apoptose na presença, mas não na ausência de um agente de reticulação do Fc, trogocitose ou qualquer combinação dos mesmos, de células alvo que expressam a CD38 humana, tipicamente na presença de complemento e células efectoras.

[00173] A variante de anticorpo de acordo com qualquer aspecto ou modalidade aqui pode modular tipicamente a atividade enzimática de CD38.

[00174] Em uma outra modalidade, a variante de anticorpo de acordo com qualquer aspecto ou modalidade aqui pode induzir um ou mais de CDC, ADCC, ADCP, apoptose na presença, mas não ausência de um agente de reticulação do Fc, trogocitose e modular a atividade enzimática de CD38, ou qualquer combinação dos mesmos.

Citotoxicidade dependente do complemento (CDC):

[00175] Em uma modalidade, a variante de anticorpo conforme descrita aqui induz CDC. Em particular, as variantes de anticorpos da presente invenção podem mediar um CDC aumentado quando ligado a CD38, por exemplo, na superfície de uma célula que expressa CD38 ou membrana celular, em comparação com um controle. O controle pode ser, por exemplo, um anticorpo de referência com sequências de aminoácidos (tipicamente sequências de aminoácidos de cadeia pesada e leve) idênticas à variante do anticorpo, exceto por uma ou mais mutações em E430, E345 e/ou S440 no variante de anticorpo. Alternativamente, o controle pode ser um anticorpo de referência com sequências de aminoácidos (tipicamente sequências de aminoácidos de cadeia pesada e leve) idênticas à variante do anticorpo, exceto para diferentes sequências de VH e VL. Tal anticorpo de referência poderia, por exemplo, em vez disso, ter as sequências VH e VL do anticorpo B ou A, como mostrado na Tabela 1. De preferência, as sequências VH e VL do

anticorpo de referência são aquelas do anticorpo B. Alternativamente, o anticorpo de referência pode ser um anticorpo que se liga ao mesmo alvo, mas com diferentes sequências de aminoácidos. Alternativamente, o controle pode ser um anticorpo de controle de isótipo, por exemplo, de modo que as sequências VH e VL sejam aquelas do anticorpo b12 como mostrado na Tabela 1.

[00176] Por conseguinte, em uma modalidade, a variante de anticorpo de acordo com qualquer aspecto ou modalidade aqui descrita induz um CDC superior contra células alvo que expressam CD38 do que um anticorpo de referência, em que o anticorpo de referência compreende as sequências da região de VH e VL do anticorpo C, ou seja, SEQ ID NO: 1 e SEQ ID NO: 5, respectivamente, e as sequências da região de CH e CL idênticas à variante do anticorpo, exceto para uma ou mais mutações em E430, E345 e/ou S440.

[00177] Em outra modalidade, a variante de anticorpo de acordo com qualquer aspecto ou modalidade aqui descrita induz um CDC superior contra células alvo que expressam CD38 do que um anticorpo de referência, em que o anticorpo de referência compreende as sequências da região de VH e VL do anticorpo C, ou seja, SEQ ID NO:1 e SEQ ID NO: 5, respectivamente, e as sequências da região de CH e CL de SEQ ID NO: 20 (IgGm(f)) e SEQ ID NO: 37 (kappa), respectivamente.

[00178] Em outra modalidade, a variante de anticorpo de acordo com qualquer aspecto ou modalidade aqui descrita induz um CDC superior contra células alvo que expressam CD38 do que um anticorpo de referência, em que o anticorpo de referência compreende as sequências da região de VH e VL do anticorpo B, ou seja, SEQ ID NO:8 e SEQ ID NO: 9, respectivamente, e sequências da região de CH e CL idênticas à variante do anticorpo.

[00179] Em outra modalidade, a variante de anticorpo de acordo com qualquer aspecto ou modalidade aqui descrita induz um CDC superior contra células alvo que expressam CD38 do que um anticorpo de referência, em que

o anticorpo de referência compreende as sequências da região de VH e VL do anticorpo A, ou seja, SEQ ID NO:10 e SEQ ID NO: 11, respectivamente, e as sequências da região de CH e CL idênticas à variante do anticorpo.

[00180] Em outra modalidade, a variante de anticorpo de acordo com qualquer aspecto ou modalidade aqui descrita induz um CDC superior contra células alvo que expressam CD38 do que um anticorpo de referência, em que o anticorpo de referência compreende as sequências da região de VH e VL do anticorpo b12, ou seja, SEQ ID NO:12 e SEQ ID NO: 16, respectivamente, e as sequências da região de CH e CL idênticas à variante do anticorpo.

[00181] Em uma modalidade específica, a resposta de CDC é descrita como lise máxima, em que uma lise máxima mais elevada reflete um CDC aumentado. Em uma modalidade específica, a resposta de CDC é descrita como EC50 (a concentração na qual metade da lise máxima é observada), em que uma EC50 mais baixa indica um CDC aumentado. Em uma modalidade específica, as células alvo que expressam CD38 são células tumorais, como células de linfoma. Exemplos não limitativos de células alvo de linfoma incluem (indicando, entre parênteses, uma fonte comercial):

- células Daudi (ATCC CCL-213);
- células Ramos (ATCC CRL-1596);
- células REH (DSMZ ACC 22);
- células Wien-133 (BioAnaLab, Oxford, U.K.);
- RS4; 11 células (DSMZ ACC 508);
- NALM-16 (DSMZ ACC 680);
- U266 (ATCC TIB-196);
- RC-K8 (DSMZ ACC 561);
- SU-DHL-8;
- Oci-Ly-7;
- Oci-Ly-19;
- Oci-Ly-18;

- Raji;
- DOHH-2;
- SU-DHL-4;
- WSU-DLCL-2;
- Z-138;
- JVM-13;
- Jeko-1;
- 697;
- Granta 519;
- DB;
- Pfeiffer.

[00182] As células alvo que expressam CD38 também podem ser uma célula AML, tal como uma selecionada dentre as que consistem em, mas não se limitam a: THP1, monomac6, Oci-AML3, KG-1, ML2, U937, Nomo-1, AML-193, MEGAL, MOLM13, HL-60 e Oci-M1.

[00183] Em outra modalidade específica, as células alvo que expressam CD38 são células tumorais, tais como células de linfoma ou células de mieloma, em que o número médio aproximado de moléculas de CD38 por célula está em um dos seguintes intervalos, opcionalmente quando determinado conforme descrito no Exemplo 1:

- 150.000-250.000, tal como cerca de 200.000;
- 200.000-300.000, tal como cerca de 260.000;
- 80.000-180.000, como cerca de 130.000;
- 50.000-150.000, como cerca de 100.000;
- 40.000-120.000, como cerca de 80.000;
- 30.000-70.000, como cerca de 50.000;
- 10.000-20.000, como cerca de 15.000;
- 5.000-15.000, como cerca de 10.000.

[00184] Em uma modalidade, a variante de anticorpo de acordo com

qualquer aspecto ou modalidade, conforme descrito aqui, induz um CDC aumentado contra células alvo que expressam CD38 em comparação com um anticorpo de referência, em que o anticorpo de referência compreende as sequências da região de VH e VL do anticorpo B, ou seja, SEQ ID NO: 8 e SEQ ID NO: 9, respectivamente, e as sequências da região de CH e CL idênticas à variante do anticorpo, em que a resposta de CDC é EC50 e as células alvo que expressam CD38 são selecionadas de NALM-16 (DSMZ ACC 680), U266 (ATCC TIB-196) e RC-K8 (DSMZ ACC 561).

[00185] Em uma modalidade preferida, a variante de anticorpo de acordo com qualquer aspecto ou modalidade conforme descrito aqui induz um CDC aumentado contra células alvo que expressam CD38 em comparação com um anticorpo de referência, em que o anticorpo de referência compreende as sequências da região de VH e VL do anticorpo C, ou seja, SEQ ID NO: 1 e SEQ ID NO: 5, respectivamente, e as sequências da região de CH e CL de SEQ ID NO: 20 (IgGm (f)) e SEQ ID NO: 37 (kappa), respectivamente, em que a resposta de CDC é a lise máxima e as células alvo que expressam CD38 são selecionadas a partir de células Daudi (ATCC CCL-213) e células Ramos (ATCC CRL-1596). A variante do anticorpo pode, em particular, resultar em pelo menos 50%, tal como pelo menos 60% ou pelo menos 70% mais lise máxima do que o anticorpo de referência.

[00186] Qualquer método ou ensaio *in vitro* ou *in vivo* conhecido pelo especialista e adequado para avaliar a capacidade de um anticorpo, tal como um anticorpo IgG, para induzir CDC contra células alvo que expressam CD38 pode ser usado. De preferência, o ensaio compreende, em parte relevante, as etapas do ensaio de CDC descrito no Exemplo 3.

[00187] Um exemplo não limitativo de um ensaio para determinar a lise máxima de células que expressam CD38, mediada por um anticorpo CD38, ou o valor EC50, pode compreender as etapas de:

(a) plaquear cerca de 100,000 células que expressam CD38 em

40 µL de meio de cultura suplementado com 0,2% de BSA por poço em uma placa de múltiplos poços;

(b) pré-incubar as células durante 20 minutos com 40 µL de anticorpo CD38 diluído em série (0,0002-10 µg/mL);

(c) incubar cada poço por 45 minutos a 37°C com 20 por cento de soro humano normal reunido;

(d) adicionar um corante de viabilidade e medir a porcentagem de lise celular em um citômetro de fluxo;

(e) determinação da lise máxima e/ou cálculo do valor EC50 usando regressão não linear.

[00188] As células tumorais adequadas para este ensaio incluem, sem limitação, aquelas listadas na Tabela 2, tais como células Daudi (ATCC CCL-213).

[00189] Em certas modalidades, a variante de anticorpo induz CDC contra células Daudi (ATCC No. CCL-213) ou células Ramos (ATCC No. CRL-1596) resultando em uma lise máxima de pelo menos 50%, tal como pelo menos 60%, tal como em pelo menos 70% maior do que aquela obtida com um anticorpo de referência diferindo apenas na ausência da mutação em um ou mais resíduos de aminoácidos selecionados a partir do grupo que corresponde a E430, E435 e S440 em uma cadeia pesada de IgG1 humano, em que os resíduos de aminoácidos são numerados de acordo com o índice da UE. Em uma modalidade, o anticorpo de referência compreende as sequências da região de VH e VL do anticorpo C, ou seja, SEQ ID NO: 1 e SEQ ID NO: 5, respectivamente e as sequências da região de CH e CL da SEQ ID NO: 20 (IgGm (f)) e SEQ ID NO: 37 (kappa), respectivamente.

Citotoxicidade mediada por células dependentes de anticorpos (ADCC):

[00190] Em uma modalidade, a variante de anticorpo de acordo com qualquer aspecto ou modalidade aqui induz ADCC. Em algumas modalidades, as variantes de anticorpos da presente invenção podem mediar

ADCC quando ligadas a CD38, por exemplo, na superfície de uma célula que expressa CD38 ou membrana celular. Os anticorpos anti-CD38 que compreende uma mutação em E430G foram encontrados para induzir níveis ligeiramente mais baixos de ADCC em comparação com o mesmo anticorpo sem uma mutação em E430G. As variantes de anticorpos da presente invenção podem mediar ADCC superior quando ligado a CD38, por exemplo, na superfície de uma célula que expressa CD38 ou membrana celular, do que um controle, em que o controle pode ser, por exemplo, um anticorpo de referência com amino sequências de ácido (tipicamente sequências de aminoácidos de cadeia pesada e leve) idênticas à variante do anticorpo, exceto para diferentes sequências de VH e VL. Tal anticorpo de referência poderia, por exemplo, em vez disso, ter as sequências VH e VL do anticorpo B ou A, como mostrado na Tabela 1. De preferência, as sequências VH e VL do anticorpo de referência são aquelas do anticorpo B. Alternativamente, o controle pode ser um anticorpo de controle de isótipo, por exemplo, de modo que as sequências VH e VL sejam aquelas do anticorpo b12 como mostrado na Tabela 1.

[00191] Por conseguinte, em uma modalidade, a variante de anticorpo de acordo com qualquer aspecto ou modalidade aqui descrita, induz um ADCC superior contra células alvo que expressam CD38 do que um anticorpo de referência, em que o anticorpo de referência compreende as sequências da região de VH e VL do anticorpo B, ou seja, SEQ ID NO: 8 e SEQ ID NO: 9, respectivamente e as sequências da região de CH e CL idênticas à variante do anticorpo. Em uma modalidade específica, a resposta de ADCC é a lise máxima, em que uma lise máxima mais alta reflete um ADCC mais alto. Em uma modalidade específica, a resposta ADCC é avaliada em um ensaio que determina a ligação de do FcγRIIIa, em que uma ligação mais alta indica um ADCC mais alto. Em uma modalidade específica, as células alvo que expressam CD38 são células tumorais. Exemplos não limitativos de células

alvo incluem Daudi, Wien-133, Granta 519, MEC-2 e as linhas de células tumorais listadas na Tabela 2.

[00192] Em uma modalidade, a variante de anticorpo de acordo com qualquer aspecto ou modalidade aqui descrita induz um ADCC superior contra células Daudi que expressam CD38 em comparação com um anticorpo de referência, em que o anticorpo de referência compreende as sequências da região de VH e VL do anticorpo B, ou seja, SEQ ID NO: 8 e SEQ ID NO: 9, respectivamente e as sequências da região de CH e CL idênticas à variante do anticorpo, opcionalmente em que a resposta ADCC é lise máxima ou ligação do FcγRIIIa.

[00193] Em uma modalidade, a variante de anticorpo de acordo com qualquer aspecto ou modalidade aqui descrita induz um ADCC superior contra células Daudi que expressam CD38 em comparação com um anticorpo de referência, em que o anticorpo de referência compreende as sequências da região de VH e VL do anticorpo b12, ou seja, SEQ ID NO: 12 e SEQ ID NO: 16, respectivamente e as sequências da região de CH e CL idênticas à variante do anticorpo, opcionalmente em que a resposta ADCC é lise máxima ou ligação do FcγRIIIa.

[00194] Qualquer método ou ensaio *in vitro* ou *in vivo* conhecido pelo especialista e adequado para avaliar a capacidade de um anticorpo, tal como um anticorpo IgG, para induzir ADCC contra células alvo que expressam CD38 pode ser usado. De preferência, o ensaio compreende, em parte relevante, as etapas do ensaio de citotoxicidade celular dependente de anticorpo de liberação de ⁵¹Cr ou o bioensaio repórter ADCC descrito no Exemplo 4. Exemplos não limitativos de ensaios para determinar o ADCC de células que expressam CD38 como mediados por um anticorpo CD38 pode compreender as etapas do ensaio de liberação de ⁵¹Cr ou o ensaio repórter estabelecido abaixo.

ADCC com versão ⁵¹Cr:

[00195] (a) plaquear cerca de 5.000 células que expressam CD38 marcadas com ^{51}Cr (por exemplo, células Daudi) em 50 μL de meio de cultura suplementado com 0,2% de BSA por poço em uma placa de múltiplos poços;

(b) pré-incubar as células durante 15 minutos com 50 μL de anticorpo CD38 diluído em série (0,0002-10 $\mu\text{g/mL}$);

(c) incubar cada poço por 4 horas a 37°C com 500,000 células mononucleares de sangue periférico (PBMCs) recém isoladas por poço;

(d) medir a quantidade de ^{51}Cr liberado em 75 μL de sobrenadante em um contador gama;

(e) calcular a porcentagem de lise celular como $(\text{cpm amostra} - \text{cpm lise espontânea})/(\text{cpm lise máxima} - \text{cpm lise espontânea})$ em que cpm são contagens por minuto.

ADCC com ensaio repórter:

[00196] (a) plaquear cerca de 5.000 células Daudi em 10 μL em placas de múltiplos poços adequadas para leituras ópticas (por exemplo, OptiPlates de 384 poços da PerkinElmer Inc.) em um meio padrão (por exemplo, RPMI 1640) suplementado com 25% de soro de baixa IgG;

(b) incubar cada poço por 6 horas a 37°C com 10 μL de células Jurkat modificadas expressando de forma estável o receptor do $\text{Fc}\gamma\text{RIIIa}$, variante V158 (alta afinidade) e um elemento de resposta NFAT que conduz a expressão de luciferase de pirilampo como células efetoras e 10 μL de anticorpo CD38 diluído em série (0,0002-10 $\mu\text{g/mL}$);

(c) incubar cada poço 5 minutos à temperatura ambiente com 30 μL de substrato de Luciferase e medir a luminescência.

Fagocitose celular dependente de anticorpos (ADCP):

[00197] Em uma modalidade, a variante de anticorpo de acordo com qualquer aspecto ou modalidade aqui induz ADCP. Em algumas modalidades, as variantes de anticorpos da presente invenção podem mediar ADCP quando

ligadas a CD38, por exemplo, na superfície de uma célula que expressa CD38 ou membrana celular. As variantes de anticorpos da presente invenção podem mediar um ADCP superior quando ligado a CD38, por exemplo, na superfície de uma célula que expressa CD38 ou membrana celular, do que um controle em que o controle é um anticorpo de controle de isótipo, por exemplo, de modo que o As sequências VH e VL são aquelas do anticorpo b12 como mostrado na Tabela 1.

[00198] Por conseguinte, em uma modalidade, a variante de anticorpo de acordo com qualquer aspecto ou modalidade aqui descrita, induz um ADCP superior contra células alvo que expressam CD38 do que um anticorpo de referência, em que o anticorpo de referência difere da variante de anticorpo apenas em uma ou mais mutações em E430, E345 e/ou S440 no variante de anticorpo. Em uma modalidade alternativa, o anticorpo de referência compreende as sequências da região de VH e VL do anticorpo b12, isto é, SEQ ID NO: 12 e SEQ ID NO: 16, respectivamente e as sequências da região de CH e CL idênticas à variante do anticorpo.

[00199] Em uma modalidade específica, as células alvo que expressam CD38 são células tumorais, como células de mieloma ou linfoma. Exemplos não limitativos de células alvo que são células tumorais incluem aqueles listados na Tabela 2.

[00200] Qualquer método ou ensaio *in vitro* ou *in vivo* conhecido pelo especialista e adequado para avaliar a capacidade de um anticorpo, tal como um anticorpo IgG, para induzir ADCP contra células alvo que expressam CD38 pode ser usado. De preferência, o ensaio compreende, em parte relevante, as etapas do ensaio ADCP à base de macrófagos descrito no Exemplo 5. Em particular, o ensaio para determinar o ADCP de células que expressam CD38 como mediada por um anticorpo CD38 pode compreender as etapas estabelecidas abaixo:

ADCP:

[00201] (a) diferenciar monócitos isolados de fresco em macrófagos com 5 dias de incubação em meio contendo GM-CSF;

(b) plaquear cerca de 100,000 macrófagos por poço em uma placa de múltiplos poços em meio de células dendríticas com GM-CSF;

(c) adicionar 20,000 células que expressam CD38 opsonizado com anticorpo CD38 (por exemplo, células Daudi), marcadas com um corante de membrana fluorescente genérico, por poço por 45 minutos a 37°C;

(d) medir a porcentagem de macrófagos positivos para CD14, CD19-negativos e para corante de membrana em um citômetro de fluxo.

Apoptose:

[00202] A variante de anticorpo para uso de acordo com a invenção pode, em uma modalidade, não induzir apoptose na ausência de um agente de reticulação do Fc. Em uma outra modalidade, a variante de anticorpo pode induzir apoptose na presença de um agente de reticulação do Fc, mas não na ausência de um agente de reticulação do Fc.

[00203] Em uma modalidade, o agente de reticulação do Fc é um anticorpo.

[00204] Em uma modalidade, a apoptose pode ser determinada conforme descrito no Exemplo 6.

Trogocitose:

[00205] Em uma modalidade, a variante de anticorpo, conforme divulgado aqui, induz trogocitose, tal como trogocitose de CD38 de células de doador que expressam CD38 para células aceitadoras. As células aceitadoras típicas incluem células T e B, monócitos/macrófagos, células dendríticas, neutrófilos e células NK. De preferência, as células aceitadoras são linfócitos que expressam receptores Fc-gama-(Fcγ), tais como, por exemplo, macrófagos ou PBMCs. Em particular, as variantes de anticorpos da presente invenção podem mediar um aumento da trogocitose em comparação com um controle. O controle pode ser, por exemplo, um anticorpo de referência com

seqüências de aminoácidos (tipicamente seqüências de aminoácidos de cadeia pesada e leve) idênticas à variante do anticorpo, exceto por uma ou mais mutações em E430, E345 e/ou S440 no anticorpo variante. Em outra modalidade, o controle é um anticorpo de referência com seqüências de aminoácidos (tipicamente seqüências de aminoácidos de cadeia pesada e leve) idênticas à variante do anticorpo, exceto para diferentes seqüências de VH e VL. Por exemplo, o controle pode ser um anticorpo de controle de isótipo, por exemplo, de modo que as seqüências VH e VL sejam aquelas do anticorpo b12 como mostrado na Tabela 1.

[00206] Os ensaios adequados para avaliar a trogocitose são conhecidos na técnica e incluem, por exemplo, o ensaio no Exemplo 8. Exemplos não limitativos de ensaios para determinar a trogocitose de células que expressam CD38 mediadas por um anticorpo CD38 incluem o seguinte:

Trogocitose (células Daudi):

[00207] (a') diferenciar monócitos isolados de fresco em macrófagos com 5 dias de GM-CSF;

(b') plaquear cerca de 100,000 macrófagos por poço em meio de células dendríticas com GM-CSF;

(c') adicionar de cerca de 20,000 células Daudi opsonizadas com anticorpo CD38, marcadas com um corante de membrana fluorescente genérico, por poço por 45 minutos a 37°C;

(d') medir a expressão de CD38 em células Daudi em um citômetro de fluxo, em que uma redução em CD38 em células Daudi opsonizadas com anticorpo CD38 em comparação com um controle indica trogocitose.

Trogocitose (Tregs):

[00208] (a) plaquear cerca de 500,000 PBMCs isolados de fresco por poço em meio de cultura de células O/N a 37°C;

(b) adicionar cerca de 100,000, Tregs opsonizados com

anticorpo CD38, marcados com um corante de amina intracelular fluorescente genérico, por poço durante a noite (O/N) a 37°C; e

(c) medir a expressão de CD38 em Tregs em um citômetro de fluxo, em que uma redução em CD38 em Tregs opsonizados com anticorpo CD38 em comparação com um controle indica trogocitose.

[00209] Além das células Daudi (ATCC CCL-213), as células tumorais adequadas para o primeiro ensaio incluem, sem limitação, aquelas listadas na Tabela 2, particularmente aquelas com uma alta expressão de CD38. Além disso, células que expressam CD38 adequadas para o segundo ensaio incluem, além de Tregs, células imunes, tais como, por exemplo, células NK, células B, células T e monócitos, bem como células tumorais listadas na Tabela 2, particularmente aquelas com um baixo nível de expressão de CD38.

[00210] Por conseguinte, em uma modalidade, a variante de anticorpo de acordo com qualquer aspecto ou modalidade aqui descrita induz um nível mais alto de trogocitose de uma célula alvo que expressa CD38 do que um anticorpo de referência, em que o anticorpo de referência compreende as sequências da região de VH e VL do anticorpo C, isto é, SEQ ID NO: 1 e SEQ ID NO: 5, respectivamente, e as sequências da região de CH e CL idênticas à variante do anticorpo, exceto para uma ou mais mutações em E430, E345 e/ou S440.

[00211] Em algumas modalidades, a variante de anticorpo de acordo com qualquer aspecto ou modalidade aqui descrita induz um nível mais alto de trogocitose de células alvo que expressam CD38 do que um anticorpo de referência, em que o anticorpo de referência compreende as sequências da região de VH e VL do anticorpo B, ou seja, SEQ ID NO: 8 e SEQ ID NO: 9, respectivamente e as sequências da região de CH e CL idênticas à variante do anticorpo.

[00212] Em algumas modalidades, a variante de anticorpo de acordo com qualquer aspecto ou modalidade aqui descrita induz um nível mais alto

de trogocitose de células alvo que expressam CD38 do que um anticorpo de referência, em que o anticorpo de referência compreende as sequências da região de VH e VL do anticorpo A, ou seja, SEQ ID NO: 10 e SEQ ID NO: 11, respectivamente e as sequências da região de CH e CL idênticas à variante do anticorpo.

[00213] Em algumas modalidades, a variante de anticorpo de acordo com qualquer aspecto ou modalidade aqui descrita induz uma trogocitose de nível mais alto de células alvo que expressam CD38 do que um anticorpo de referência, em que o anticorpo de referência compreende as sequências da região de VH e VL do anticorpo b12, ou seja, SEQ ID NO: 12 e SEQ ID NO: 16, respectivamente e as sequências da região de CH e CL idênticas à variante do anticorpo.

Modulação da atividade da enzima CD38

[00214] A variante de anticorpo de acordo com qualquer aspecto ou modalidade aqui pode, tipicamente, modular uma ou mais atividades enzimáticas de CD38 humana. Em uma modalidade, a variante de anticorpo, conforme descrito neste documento, tem um efeito inibidor na atividade de ciclase de CD38, por exemplo, em comparação com um controle, por exemplo, um anticorpo de controle de isótipo, como o anticorpo b12. Por exemplo, a variante de anticorpo pode ter um efeito inibidor sobre a atividade da ciclase da CD38 expressa por uma célula, como uma célula tumoral, e/ou um efeito inibitório sobre a CD38 isolado, como um fragmento solúvel de CD38 (por exemplo, SEQ ID NO: 39).

[00215] Qualquer método ou ensaio *in vitro* ou *in vivo* conhecido pelo especialista e adequado para avaliar a capacidade de um anticorpo anti-CD38 para inibir a atividade da ciclase de CD38 pode ser usado. Os ensaios adequados para testar a atividade da ciclase da CD38 são, por exemplo, descritos em WO 2006/099875 A1 e WO 2011/154453 A1. De preferência, o método compreende, na parte relevante, as etapas do ensaio específico

descrito no Exemplo 6, testando a atividade da ciclase usando sal de sódio de dinucleotídeo de nicotinamida guanina (NGD) como substrato para CD38. NGD, que não é fluorescente, é ciclizado por CD38 a um análogo fluorescente de cADPR, GDP-ribose cíclica (ver, por exemplo, Comb, Chem High Throughput Screen. Jun 2003; 6 (4): 367-79A). Um exemplo não limitativo de um ensaio compreende as seguintes etapas para determinar a inibição da atividade da ciclase CD38:

(a) semear 200,000 células Daudi ou Wien133 em 100 μ L de Tris-HCL 20 mM por poço; ou semear 0,6 μ g/mL de CD38 solúvel marcado com His (SEQ ID NO: 39) em 100 μ L de Tris-HCL 20 mM por poço em uma placa de múltiplos poços;

(b) adicionar 1 μ g/mL de anticorpo CD38 e 80 μ M de NGD a cada poço;

(c) medir a fluorescência até que um *plateau* seja atingido (por exemplo; 5, 10 ou 30 minutos); e

(d) determinar a porcentagem de inibição em comparação com um controle, tal como um poço incubado com um anticorpo de controle de isótipo.

[00216] Em uma modalidade, em tal ensaio, uma variante de anticorpo é capaz de inibir a atividade da ciclase da CD38, especificamente a porcentagem máxima de conversão de NGD, com pelo menos cerca de 40%, tal como pelo menos cerca de 50%, tal como pelo menos cerca de 60%, tal como entre cerca de 40% a cerca de 60%, em comparação com um controle, tipicamente atividade de ciclase de CD38 na presença de um anticorpo de controle de isótipo. Por exemplo, o anticorpo de controle de isótipo pode compreender as sequências da região de VH e VL do anticorpo b12, isto é, SEQ ID NO: 12 e SEQ ID NO: 16, respectivamente, e as sequências da região de CH e CL idênticas à variante do anticorpo. Em uma modalidade específica, o ensaio utiliza hisCD38 (SEQ ID NO: 39) para determinar a atividade da

ciclase.

[00217] Em algumas modalidades, a variante de anticorpo de acordo com qualquer aspecto ou modalidade aqui descrita tem uma inibição aumentada (ou seja, mais eficaz) da atividade da ciclase CD38 em comparação com um anticorpo de referência, em que o anticorpo de referência compreende as sequências da região de VH e VL do anticorpo B, isto é, SEQ ID NO: 8 e SEQ ID NO: 9, respectivamente e as sequências da região de CH e CL idênticas à variante do anticorpo.

[00218] Em algumas modalidades, a variante de anticorpo de acordo com qualquer aspecto ou modalidade aqui descrita tem uma inibição aumentada (ou seja, mais eficaz) da atividade de ciclase de CD38 em comparação com um anticorpo de referência, em que o anticorpo de referência compreende as sequências da região de VH e VL do anticorpo A, isto é, SEQ ID NO: 10 e SEQ ID NO: 11, respectivamente e as sequências da região de CH e CL idênticas à variante do anticorpo.

[00219] Além disso, em algumas modalidades, uma variante de anticorpo, conforme descrito neste documento, induz a apoptose de células que expressam CD38 na presença, mas não na ausência, de anticorpos de reticulação do Fc. Estas funcionalidades podem ser medidas em um ensaio que compreende, em parte relevante, as etapas do ensaio de apoptose descrito no Exemplo 6. Em uma modalidade, um ensaio de apoptose pode compreender as etapas de:

(a) plaquear 100,000 células tumorais que expressam CD38 em 100 μ L de meio de cultura suplementado com 0,2% de BSA por poço;

(b) incubar cada poço O/N a 37°C com anticorpo CD38 diluído em série (0,0002-10 μ g/mL) e 10 μ g/mL de cabra anti-IgG1 humano;

(c) medir a porcentagem de células mortas em um citômetro de fluxo.

Conjugados

[00220] Em um aspecto, a presente invenção se refere a uma variante de anticorpo que é conjugada a um fármaco, agente citotóxico, toxina, radiomarcador ou radioisótopo.

[00221] Em uma modalidade, são providas variantes de anticorpos que compreende um ou mais aminoácidos radiomarcados. Uma variante radiomarcada pode ser usada para fins de diagnóstico *in vitro*, fins de diagnóstico *in vivo*, fins terapêuticos ou uma combinação dos mesmos. Exemplos não limitativos de radiomarcadores para anticorpos incluem ³H, ¹⁴C, ¹⁵N, ³⁵S, ⁹⁰Y, ⁹⁹Tc, ¹²⁵I, ¹³¹I e ¹⁸⁶Re. Métodos para a preparação de aminoácidos radiomarcados e derivados de peptídeos relacionados são conhecidos na técnica, (ver, por exemplo, *Junghans et al., Em Cancer Chemotherapy and Biotherapy 655-686* (2ª Ed., Chafner e Longo, eds., Lippincott Raven (1996)) e US 4.681.581, US 4.735.210, US 5.101.827, US 5.102.990 (US RE35.500), US 5.648.471 e US 5.697.902. Por exemplo, um radioisótopo de um halogênio, como iodo ou bromo, pode ser conjugado pelo método de cloramina-T.

[00222] Em uma modalidade, a variante de anticorpo da presente invenção é conjugada a um radioisótopo ou a um quelato contendo radioisótopo. Por exemplo, a variante pode ser conjugada a um ligante quelante, por exemplo, DOTA, DTPA ou tiuxetano, que permite que o anticorpo seja complexado com um radioisótopo. A variante pode também ou alternativamente compreender ou ser conjugada com um ou mais aminoácidos radiomarcados ou outra molécula radiomarcada. Uma variante radiomarcada pode ser usada para fins diagnósticos e terapêuticos. Em uma modalidade, a variante da presente invenção é conjugada com um emissor alfa. Exemplos não limitativos de radioisótopos emissores de alfa incluem ²¹³Bs, ²²⁵Ac e ²²⁷Th.

[00223] Em uma modalidade, a variante de anticorpo é anexada a um ligante quelante, por exemplo, tiuxetano, que permite que a variante do

anticorpo seja conjugada com um radioisótopo.

Ácidos nucleicos

[00224] Os anticorpos são bem conhecidos como agentes terapêuticos que podem ser usados no tratamento de várias doenças. Outro método para a administração de um anticorpo a um indivíduo em necessidade inclui a administração de um ácido nucleico ou uma combinação de ácidos nucleicos que codificam o dito anticorpo para a expressão *in vivo* do dito anticorpo.

[00225] Portanto, em um aspecto, a presente invenção também se refere a um ácido nucleico que codifica a cadeia pesada de uma variante de anticorpo de acordo com a presente invenção, em que a dita cadeia pesada compreende uma região de VH que compreende uma CDR1 VH tendo a sequência conforme estabelecido na SEQ ID NO:2, um CDR2 de VH tendo a sequência conforme estabelecido na SEQ ID NO: 3, um CDR3 de VH tendo a sequência conforme estabelecido na SEQ ID NO: 4 e uma região de CH de IgG1 humano com uma mutação em um ou mais de E430, E345 e S440, sendo os resíduos de aminoácidos numerados de acordo com o índice da UE.

[00226] Em uma modalidade, a variante de anticorpo da presente invenção é codificada por um ácido nucleico. Assim, as sequências de nucleotídeos que codificam a variante de anticorpo da presente invenção estão presentes em um ácido nucleico ou na mesma molécula de ácido nucleico.

[00227] Em outra modalidade, a variante de anticorpo da presente invenção é codificada por uma combinação de ácidos nucleicos, tipicamente por dois ácidos nucleicos. Em uma modalidade, a dita combinação de ácidos nucleicos compreende um ácido nucleico que codifica a cadeia pesada da dita variante de anticorpo e um ácido nucleico que codifica a cadeia leve da dita variante de anticorpo.

[00228] Em algumas modalidades, a presente invenção se refere a um ácido nucleico ou uma combinação de ácidos nucleicos que codificam uma variante de anticorpo compreendendo:

a) uma cadeia pesada que compreende uma região de VH que compreende um CDR1 de VH tendo a sequência conforme estabelecido na SEQ ID NO: 2, um CDR2 de VH tendo a sequência conforme estabelecido na SEQ ID NO: 3, um CDR3 de VH tendo a sequência como definido adiante na SEQ ID NO: 4 e uma região de CH de IgG1 humano com uma mutação em um ou mais de E430, E345 e S440, os resíduos de aminoácidos sendo numerados de acordo com o índice da UE;

b) uma cadeia leve que compreende uma região de VL que compreende um CDR1 de VL tendo a sequência conforme estabelecido na SEQ ID NO: 6, um CDR2 de VL tendo a sequência AAS, e um CDR3 de VL tendo a sequência conforme estabelecido na SEQ ID NO: 7.

[00229] Em uma modalidade, a variante de anticorpo da presente invenção é codificada por um ácido nucleico. Assim, as sequências de nucleotídeos que codificam a variante de anticorpo da presente invenção estão presentes em um ácido nucleico ou na mesma molécula de ácido nucleico.

[00230] Em outra modalidade, a variante de anticorpo da presente invenção é codificada por uma combinação de ácidos nucleicos, tipicamente por dois ácidos nucleicos. Em uma modalidade, a dita combinação de ácidos nucleicos compreende um ácido nucleico que codifica a cadeia pesada da dita variante de anticorpo e um ácido nucleico que codifica a cadeia leve da dita variante de anticorpo.

[00231] Conforme descrito acima, os ácidos nucleicos podem ser usados como um meio para prover proteínas terapêuticas, tais como anticorpos, a um indivíduo com necessidade dos mesmos.

[00232] Em algumas modalidades, o dito ácido nucleico pode ser ácido desoxirribonucleico (DNA). Os DNAs e métodos de preparação de DNA adequados para a expressão *in vivo* de proteínas terapêuticas, tais como anticorpos, são bem conhecidos por um versado na técnica e incluem, mas não estão limitados ao descrito por *Patel A et al., 2018, Cell Reports 25,*

1982-1993.

[00233] Em algumas modalidades, o dito ácido nucleico pode ser ácido ribonucleico (RNA), tal como RNA mensageiro (mRNA). Em algumas modalidades, o mRNA pode compreender apenas nucleotídeos de ocorrência natural. Em algumas modalidades, o mRNA pode compreender nucleotídeos modificados, em que modificado se refere aos ditos nucleotídeos sendo quimicamente diferentes dos nucleotídeos de ocorrência natural. Em algumas modalidades, o mRNA pode compreender nucleotídeos de ocorrência natural e modificados.

[00234] Diferentes ácidos nucleicos adequados para a expressão *in vivo* de proteínas terapêuticas, tais como anticorpos, em um indivíduo são bem conhecidos por um versado na técnica. Por exemplo, um mRNA adequado para a expressão de um anticorpo terapêutico em um indivíduo, muitas vezes compreende um quadro de leitura aberta (ORF), flanqueado por regiões não traduzidas (UTRs) que compreende sequências específicas, e as extremidades 5' e 3' sendo formadas por uma estrutura cap e uma cauda poli (A) (ver, por exemplo, Schlake *et al.*, 2019, Molecular Therapy Vol. 27 No 4 April).

[00235] Exemplos de métodos para otimização de RNA e moléculas de RNA adequadas, e. mRNA, para expressão *in vivo* incluem, mas não estão limitados àqueles descritos em US 9.254.311; US9.221.891; US20160185840 e EP3118224.

[00236] Os ácidos nucleicos nus que são administrados a um indivíduo para expressão *in vivo* são propensos à degradação e/ou de causar uma resposta imunogênica no indivíduo. Além disso, para a expressão *in vivo* do anticorpo codificado pelo ácido nucleico, o dito ácido nucleico é tipicamente administrado em uma forma adequada para o ácido nucleico entrar nas células do indivíduo. Existem diferentes métodos de dispensação de um ácido nucleico para expressão *in vivo* e incluem ambos os métodos envolvendo meios mecânicos e químicos. Por exemplo, tais métodos podem envolver

eletroporação ou tatuagem do ácido nucleico na pele (Patel *et al.*, 2018, Cell Reports 25, 1982-1993). Outros métodos adequados para a administração do ácido nucleico a um indivíduo envolvem a administração do ácido nucleico em uma formulação adequada. Assim, a presente invenção também se refere a um veículo de dispensação que compreende um ácido nucleico da presente invenção.

[00237] Em algumas modalidades, o dito veículo de dispensação pode compreender um ácido nucleico que codifica uma cadeia pesada de uma variante de anticorpo de acordo com a presente invenção. Assim, em uma modalidade, o dito ácido nucleico pode codificar uma cadeia pesada que compreende uma região de VH que compreende um CDR1 de VH tendo a sequência conforme estabelecido na SEQ ID NO: 2, um CDR2 de VH tendo a sequência conforme estabelecido na SEQ ID NO: 3, a CDR3 de VH tendo a sequência conforme estabelecido na SEQ ID NO: 4 e uma região de CH de IgG1 humano com uma mutação em um ou mais de E430, E345 e S440, os resíduos de aminoácidos sendo numerados de acordo com o índice da UE.

[00238] Em algumas modalidades, a presente invenção também se refere a um veículo de dispensação que compreende um ácido nucleico que codifica uma cadeia leve de uma variante de anticorpo de acordo com a presente invenção. Assim, em uma modalidade, o dito ácido nucleico pode codificar uma cadeia leve que compreende uma região de VL que compreende um CDR1 de VL tendo a sequência conforme estabelecido na SEQ ID NO: 6, um CDR2 de VL tendo a sequência AAS e um CDR3 de VL tendo a sequência como definido adiante na SEQ ID NO: 7.

[00239] A presente invenção também se refere a uma mistura de veículos de dispensação que compreende um veículo de dispensação que compreende um ácido nucleico que codifica uma cadeia pesada de uma variante de anticorpo de acordo com a presente invenção e um veículo de dispensação que compreende um ácido nucleico que codifica uma cadeia leve

de uma variante de anticorpo de acordo com a presente invenção. Assim, em uma modalidade, a dita mistura de veículos de dispensação compreende um veículo de dispensação que compreende um ácido nucleico que codifica uma cadeia pesada que compreende uma região de VH que compreende um CDR1 de VH com a sequência conforme estabelecido na SEQ ID NO: 2, um CDR2 de VH tendo a sequência como definido apresentada na SEQ ID NO: 3, um CDR3 de VH tendo a sequência conforme estabelecido na SEQ ID NO: 4 e uma região de CH de IgG1 humano com uma mutação em um ou mais de E430, E345 e S440, os resíduos de aminoácidos sendo numerados de acordo para o índice da UE; e um veículo de dispensação que compreende um ácido nucleico que codifica uma cadeia leve que compreende uma região de VL que compreende um CDR1 de VL tendo a sequência conforme estabelecido na SEQ ID NO: 6, um CDR2 de VL tendo a sequência AAS, e um CDR3 de VL tendo a sequência como definido adiante na SEQ ID NO: 7.

[00240] Em algumas modalidades, o dito veículo de dispensação compreende um ácido nucleico ou uma combinação de ácidos nucleicos que codificam a cadeia pesada e uma cadeia leve nucleica de uma variante de anticorpo de acordo com a presente invenção.

[00241] Assim, em uma modalidade, o dito veículo de dispensação pode compreender um ácido nucleico que codifica uma cadeia pesada que compreende uma região de VH que compreende um CDR1 de VH tendo a sequência conforme estabelecido em SEQ ID NO: 2, um CDR2 de VH tendo a sequência conforme estabelecido em SEQ ID NO:3, um CDR3 de VH tendo a sequência conforme estabelecido na SEQ ID NO: 4 e uma região de CH de IgG1 humano com uma mutação em um ou mais de E430, E345 e S440, os resíduos de aminoácidos sendo numerados de acordo com o índice da UE; e uma cadeia leve que compreende uma região de VL que compreende um CDR1 de VL tendo a sequência conforme estabelecido na SEQ ID NO: 6, um CDR2 de VL tendo a sequência AAS, e um CDR3 de VL tendo a sequência

conforme estabelecido na SEQ ID NO: 7. Assim, as sequências de ácido nucleico que codificam a cadeia pesada e leve da variante do anticorpo de acordo com a presente invenção estão presentes em uma (a mesma) molécula de ácido nucleico.

[00242] Em outra modalidade, o dito veículo de dispensação pode compreender um ácido nucleico que codifica uma cadeia pesada que compreende uma região de VH que compreende um CDR1 de VH tendo a sequência conforme estabelecido na SEQ ID NO: 2, um CDR2 de VH tendo a sequência conforme estabelecido na SEQ ID NO: 3, um CDR3 de VH tendo a sequência conforme estabelecido na SEQ ID NO: 4 e uma região de CH de IgG1 humano com uma mutação em um ou mais de E430, E345 e S440, os resíduos de aminoácidos sendo numerados de acordo com o índice da UE; e um ácido nucleico que codifica uma cadeia leve que compreende uma região de VL que compreende um CDR1 de VL tendo a sequência conforme estabelecido na SEQ ID NO: 6, um CDR2 de VL tendo a sequência AAS, e um CDR3 de VL tendo a sequência conforme estabelecido na SEQ ID NÃO: 7. Assim, as sequências de ácido nucleico que codificam a cadeia pesada e leve da variante do anticorpo de acordo com a presente invenção estão presentes em moléculas de ácido nucleico separadas ou diferentes.

[00243] Em algumas modalidades, o dito veículo de dispensação pode ser uma formulação lipídica. Os lipídios da formulação podem ser partícula (s), como nanopartículas lipídicas (LNPs). O ácido nucleico ou combinação de ácidos nucleicos do presente pode ser encapsulado dentro da dita partícula, e, dentro da dita LNP.

[00244] Diferentes formulações lipídicas adequadas para administração de um ácido nucleico a um indivíduo para expressão *in vivo* são bem conhecidas de um especialista na técnica. Por exemplo, a dita formulação lipídica pode compreender tipicamente lipídios, aminolipídios ionizáveis, PEG-lipídios, colesterol ou qualquer combinação dos mesmos.

[00245] Várias formas e métodos para a preparação de formulações lipídicas adequadas para administração de um ácido nucleico a um indivíduo para a expressão de um anticorpo terapêutico são bem conhecidos na técnica. Exemplos de tais formulações lipídicas incluem, mas não estão limitados àqueles descritos em US20180170866 (Arcturus), EP 2391343 (Arbutus), WO 2018/006052 (Protiva), WO2014152774 (Shire Human Genetics), EP 2 972 360 (Translate Bio), US10195156 (Moderna) e US20190022247 (Acuitas).

Produção da variante de anticorpo

[00246] Em outro aspecto, a presente invenção também se refere a um método para aumentar pelo menos uma função efetora de um anticorpo que compreende sequências de aminoácidos de CDR, de VH e/ou de VL do anticorpo C, que compreende a introdução de uma mutação no anticorpo em um ou mais resíduo(s) de aminoácidos correspondente (s) a E430, E345 e S440 na região do Fc de uma cadeia pesada de IgG1 humano, numerada de acordo com o índice da UE.

[00247] Assim, em certas modalidades, é provido um método para aumentar uma função efetora de um anticorpo parental que compreende uma região do Fc e uma região de ligação ao antígeno que se liga a CD38, tal método compreende a introdução na região do Fc de uma mutação em um ou mais resíduos de aminoácidos selecionados a partir do grupo que corresponde a E430, E345 e S440 na região do Fc de uma cadeia pesada de IgG1 humano, em que os resíduos de aminoácidos são numerados de acordo com o índice da UE; e

em que a região de ligação ao antígeno compreende um CDR1 de VH tendo a sequência conforme estabelecido na SEQ ID NO: 2, um CDR2 de VH tendo a sequência conforme estabelecido na SEQ ID NO: 3, um CDR3 de VH tendo a sequência conforme estabelecido na SEQ ID NO: 4, um CDR1 de VL tendo a sequência conforme estabelecido na SEQ ID NO: 6, um CDR2

de VL tendo a sequência AAS, e um CDR3 de VL tendo a sequência conforme estabelecido na SEQ ID NO: 7.

[00248] Em outras modalidades, é provido um método de produção de uma variante de um anticorpo parental que compreende uma região do Fc e uma região de ligação ao antígeno, opcionalmente a variante com uma função efetora aumentada em comparação com o anticorpo parental, tal método compreende

(a) introduzir na região do Fc uma mutação em um ou mais resíduos de aminoácidos selecionados a partir do grupo que corresponde a E430, E345 e S440 na região do Fc de uma cadeia pesada de IgG1 humano para obter uma variante de anticorpo,

(b) selecionar qualquer variante de anticorpo com uma função efetora aumentada em comparação com o anticorpo parental, e

(c) produzir o dito variante de anticorpo em uma célula hospedeira recombinante,

em que a região de ligação ao antígeno compreende um CDR1 de VH tendo a sequência conforme estabelecido na SEQ ID NO: 2, um CDR2 de VH tendo a sequência conforme estabelecido na SEQ ID NO: 3, um CDR3 de VH tendo a sequência conforme estabelecido na SEQ ID NO: 4, um CDR1 de VL tendo a sequência conforme estabelecido na SEQ ID NO: 6, um CDR2 de VL tendo a sequência AAS, e um CDR3 de VL tendo a sequência conforme estabelecido na SEQ ID NO: 7.

[00249] Em uma modalidade de qualquer um dos métodos acima mencionados, a função efetora é CDC.

[00250] Em uma modalidade de qualquer um dos métodos acima mencionados, a função efetora é trogocitose.

[00251] Em uma modalidade de qualquer um dos métodos acima mencionados, a função efetora é CDC e trogocitose.

[00252] Em uma modalidade de qualquer um dos métodos

mencionados acima, a mutação em um ou mais resíduos de aminoácidos é selecionada a partir do grupo que corresponde a E430G, E430S, E430F, E430T, E345K, E345Q, E345R, E345Y, S440Y e S440W. Por exemplo, a mutação em um ou mais resíduos de aminoácidos pode compreender ou consistir em E430G.

[00253] Em uma modalidade de qualquer um dos métodos acima mencionados, a região do Fc do anticorpo parental é, além da (s) mutação(ões) recitada (s), uma região do Fc de IgG1, IgG2, IgG3 ou IgG4 humana ou uma mistura de isótipo das mesmas. Opcionalmente, que compreende uma região do Fc de uma das sequências estabelecidas como SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 45 e SEQ ID NO: 36. Em uma modalidade particular, a região do Fc do anticorpo parental é uma região do Fc de IgG1 humano. Por exemplo, o anticorpo parental pode ser um anticorpo IgG1 humano de comprimento total, opcionalmente, um anticorpo IgG1 κ monoclonal de comprimento total humano bivalente. Além disso, o anticorpo parental pode ser um anticorpo monoespecífico ou biespecífico, tal como um anticorpo monoespecífico.

[00254] Embora a região do Fc do anticorpo parental seja tipicamente uma sequência de ocorrência natural (tipo selvagem), em algumas modalidades, a região do Fc do anticorpo parental compreende uma ou mais mutações adicionais, conforme descrito em outro lugar neste documento.

[00255] A presente invenção também se refere a um anticorpo obtido ou obtenível de acordo com qualquer um dos métodos descritos acima.

[00256] A invenção também fornece ácidos nucleicos isolados e vetores que codificam uma variante de anticorpo de acordo com qualquer um dos aspectos e modalidades aqui descritos, bem como vetores e sistemas de expressão que codificam as variantes. Os construtos de ácido nucleico, vetores e sistemas de expressão adequados para anticorpos e suas variantes

são conhecidos na técnica e incluem, mas não estão limitados a, aqueles descritos nos Exemplos. Em modalidades em que o variante de anticorpo compreende HC e LC que são polipeptídeos separados, em vez de contidos em um único polipeptídeo (por exemplo, como em uma proteína de fusão scFv-Fc), as sequências de nucleotídeos que codificam as cadeias pesada e leve podem estar presentes no mesmo ou diferentes ácidos nucleicos ou vetores.

[00257] Em um aspecto, a invenção se refere a um ácido nucleico ou um vetor de expressão que compreende

(i) uma sequência de nucleotídeos que codifica uma sequência de cadeia pesada de uma variante de anticorpo de acordo com qualquer uma das modalidades aqui descritas;

(ii) uma sequência de nucleotídeos que codifica uma sequência de cadeia leve de uma variante de anticorpo de acordo com qualquer uma das modalidades aqui descritas; ou

(iii) ambos (i) e (ii).

[00258] Em um aspecto, a invenção se refere a um ácido nucleico ou um vetor de expressão que compreende uma sequência de nucleotídeos que codifica uma sequência de cadeia pesada de uma variante de anticorpo de acordo com qualquer uma das modalidades aqui descritas.

[00259] Em um aspecto, a invenção se refere a uma sequência de ácido nucleico ou um vetor de expressão que compreende uma sequência de nucleotídeos que codifica uma sequência de cadeia pesada e uma sequência de cadeia leve de uma variante de anticorpo de acordo com qualquer uma das modalidades aqui descritas

[00260] Em um aspecto, a invenção se refere a uma combinação de um primeiro e um segundo ácido nucleico ou uma combinação de um primeiro e segundo vetor de expressão, opcionalmente na mesma célula hospedeira, onde o primeiro compreende uma sequência de nucleotídeos de acordo com (i), e o

segundo compreende uma sequência de nucleotídeos de acordo com (ii).

[00261] Um vetor de expressão no contexto da presente invenção pode ser qualquer vetor adequado, incluindo vetores de ácido nucleico cromossômicos, não cromossômicos e sintéticos (uma sequência de ácido nucleico que compreende um conjunto adequado de elementos de controle de expressão). Exemplos de tais vetores incluem derivados de SV40, plasmídeos bacterianos, fago de DNA, baculovírus, plasmídeos de levedura, vetores derivados de combinações de plasmídeos e fago de DNA e vetores de ácido nucleico viral (RNA ou DNA). Em uma modalidade, um ácido nucleico é compreendido em um vetor de DNA ou RNA nu, incluindo, por exemplo, um elemento de expressão linear (conforme descrito em, por exemplo, Sykes e Johnston, *Nat Biotech* 17, 355 59 (1997)), um elemento nucleico compactado vetor de ácido (como descrito em, por exemplo, US 6.077, 835 e/ou WO 00/70087), um vetor de plasmídeo como pBR322, pUC 19/18 ou pUC 118/119, um vetor de ácido nucleico de tamanho mínimo “midge” (como descrito em, por exemplo, Schakowski *et al.*, *Mol Ther* 3, 793 800 (2001)), ou como um construto de vetor de ácido nucleico precipitado, tal como um construto precipitado por CaPO₄ (conforme descrito em, por exemplo, WO200046147, Benvenisty and Reshef, *PNAS USA* 83, 9551 55 (1986), Wigler *et al.*, *Cell* 14, 725 (1978), e Coraro e Pearson, *Somatic Cell Genetics* 7, 603 (1981)). Esses vetores de ácido nucleico e a sua utilização são bem conhecidos na arte (ver, por exemplo, US 5.589.466 e US 5.973.972).

[00262] Em uma modalidade, o vetor é adequado para a expressão da variante de anticorpo em uma célula bacteriana. Exemplos de tais vetores incluem vetores de expressão, tais como BlueScript (Stratagene), vetores pIN (*Van Heeke & Schuster, J Biol Chem* 264, 5503 5509 (1989), vetores pET (Novagen, Madison WI) e semelhantes).

[00263] Um vetor de expressão pode também ou alternativamente ser um vetor adequado para expressão em um sistema de levedura. Qualquer

vetor adequado para expressão em um sistema de levedura pode ser empregado. Os vetores adequados incluem, por exemplo, vetores que compreende promotores constitutivos ou induzíveis, tais como fator alfa, álcool oxidase e PGH (revisado em: F. Ausubel *et al.*, Ed. Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing e Wiley InterScience New York (1987) e Grant *et al.*, Methods in Enzymol 153, 516 544 (1987)).

[00264] Um vetor de expressão pode também ou alternativamente ser um vetor adequado para expressão em células de mamífero, e. um vetor que compreende glutamina sintetase como um marcador selecionável, tal como os vetores descritos em Bebbington (1992) Biotechnology (NY) 10: 169-175.

[00265] Um ácido nucleico e/ou vetor também pode compreender uma sequência de ácido nucleico que codifica uma sequência de secreção/localização, que pode ter como alvo um polipeptídeo, tal como uma cadeia polipeptídica nascente, para o espaço periplasmático ou em meio de cultura de células. Tais sequências são conhecidas na técnica e incluem líder de secreção ou peptídeos de sinal.

[00266] O vetor de expressão pode compreender ou estar associado a qualquer promotor, intensificador e outros elementos facilitadores de expressão adequados. Exemplos de tais elementos incluem promotores de expressão fortes (por exemplo, promotor/intensificador de CMV humano, bem como promotores RSV, SV40, SL3 3, MMTV e LTR de HIV), sequências de terminação poli (A) eficazes, uma origem de replicação para o produto plasmídeo em *E. coli*, um gene de resistência a antibióticos como marcador selecionável e/ou um local de clonagem conveniente (por exemplo, um poliligante). Os ácidos nucleicos também podem compreender um promotor indutível em oposição a um promotor constitutivo, como CMV IE.

[00267] Em uma modalidade, o vetor de expressão que codifica a variante do anticorpo pode ser posicionado e/ou distribuído na célula hospedeira ou animal hospedeiro por meio de um vetor viral.

[00268] A invenção também fornece uma célula hospedeira recombinante que produz uma variante de anticorpo conforme descrito aqui, opcionalmente em que a célula hospedeira compreende o(s) ácido(s) nucleico(s) ou vetor (es) isolado(s) de acordo com a presente invenção. Normalmente, a célula hospedeira foi transformada ou transfectada com o(s) ácido(s) nucleico(s) ou vetor (es). A célula hospedeira recombinante como definido na reivindicação pode ser, por exemplo, uma célula eucariótica, uma célula procariótica ou uma célula microbiana, por exemplo, um transfectoma. Em uma modalidade particular, a célula hospedeira é uma célula eucariótica. Em uma modalidade particular, a célula hospedeira é uma célula procariótica. Em algumas modalidades, o anticorpo é um anticorpo de cadeia pesada. Na maioria das modalidades, no entanto, a variante do anticorpo conterá uma cadeia pesada e uma leve e, assim, a dita célula hospedeira expressa tanto o construto de codificação da cadeia pesada quanto a leve, no mesmo ou em um vetor diferente.

[00269] Exemplos de células hospedeiras incluem células de levedura, bactérias, plantas e mamíferos, tais como CHO, CHO-S, HEK, HEK293, HEK-293F, Expi293F, PER.C6, células NS0, células Sp2/0 ou células linfocíticas. Em uma modalidade, a célula hospedeira é uma célula CHO (Ovário de Hamster Chinês). Por exemplo, em uma modalidade, a célula hospedeira pode compreender um primeiro e segundo construtos de ácido nucleico integrados de forma estável no genoma celular, em que o primeiro codifica a cadeia pesada e o segundo codifica a cadeia leve de uma variante de anticorpo, conforme descrito neste documento. Em outra modalidade, a presente invenção fornece uma célula que compreende um ácido nucleico não integrado, como um plasmídeo, cosmídeo, fagemídeo ou elemento de expressão linear, que compreende uma primeira e uma segunda construção de ácido nucleico conforme especificado acima.

[00270] Em uma modalidade, a dita célula hospedeira é uma célula que

é capaz de glicosilação ligada a Asn de proteínas, e. uma célula eucariótica, tal como uma célula de mamífero, e. uma célula humana. Em uma outra modalidade, a dita célula hospedeira é uma célula não humana que é geneticamente modificada para produzir glicoproteínas com glicosilação semelhante a humana ou humana. Exemplos de tais células são *Pichia pastoris* geneticamente modificada (Hamilton *et al.*, Science 301 (2003) 1244-1246; Potgieter *et al.*, J. Biotechnology 139 (2009) 318-325) e *Lemna minor* geneticamente modificada (Cox *et al.*, Nature Biotechnology 12 (2006) 1591-1597).

[00271] Em uma modalidade, a dita célula hospedeira é uma célula hospedeira que não é capaz de remover eficientemente resíduos de lisina K447 C-terminal de cadeias pesadas de anticorpo. Por exemplo, a Tabela 2 em Liu *et al.* (2008) J Pharm Sci 97: 2426 (aqui incorporado por referência) lista uma série de tais sistemas de produção de anticorpos, e. Sp2/0, NS/0 ou glândula mamária transgênica (cabra), em que apenas a remoção parcial das lisinas C-terminais é obtida. Em uma modalidade, a célula hospedeira é uma célula hospedeira com maquinaria de glicosilação alterada. Tais células foram descritas na técnica e podem ser utilizadas como células hospedeiras nas quais expressam variantes da invenção para assim produzir um anticorpo com glicosilação alterada. Ver, por exemplo, Shields, R.L. *et al.* (2002) J. Biol. Chem. 277: 26733-26740; Umana *et al.* (1999) Nat. Biotech. 17: 176-1, bem como EP1176195; WO03/035835; e WO99/54342. Métodos adicionais para gerar glicoformas modificadas são conhecidos na técnica e incluem, mas não estão limitados aos descritos em Davies *et al.*, 2001, Biotechnol Bioeng 74: 288-294; Shields *et al.*, 2002, J Biol Chem 277: 26733-26740; Shinkawa *et al.*, 2003, J Biol Chem 278: 3466-3473), US6602684, WO00/61739A1; WO01/292246A1; WO02/311140A1; WO 02/30954A1; Tecnologia Potelligent™ (Biowa, Inc. Princeton, N.J.); Tecnologia de engenharia de glicosilação GlycoMab™ (GLYCART biotechnology AG, Zurique, Suíça);

US 20030115614; Okazaki *et al.*, 2004, JMB, 336: 1239-49, bem como aqueles descritos em WO2018/114877 WO2018/114878 e WO2018/114879.

[00272] Ainda em um aspecto adicional, a invenção se refere a um animal ou planta transgênica não humana que compreende ácidos nucleicos que codificam um ou dois conjuntos de uma cadeia pesada humana e uma cadeia leve humana, em que o animal ou planta produz uma variante de anticorpo conforme descrito neste documento.

[00273] Em uma modalidade, é provido um método de produção de uma variante de anticorpo conforme descrito neste documento, que compreende o cultivo da célula hospedeira recombinante em um meio de cultura e sob condições adequadas para a produção da variante de anticorpo e, opcionalmente, purificação ou isolamento da variante de anticorpo da cultura médio.

[00274] Em uma modalidade, é provido um anticorpo obtido ou obtenível pelo método descrito acima.

Composições e kit de peças

[00275] A presente invenção também se refere a uma composição que compreende uma variante de anticorpo de acordo com a presente invenção, um ácido nucleico de acordo com a presente invenção, um vetor de expressão de acordo com a presente invenção ou uma célula hospedeira de acordo com a presente invenção.

[00276] Em uma outra modalidade, a composição de acordo com a presente invenção é uma composição farmacêutica, tipicamente que compreende um carreador farmaceuticamente aceitável. Em uma modalidade, a composição farmacêutica contém uma variante de anticorpo como definido em qualquer aspecto ou modalidade aqui descrita, ou um vetor de expressão como definido em qualquer aspecto ou modalidade aqui descrita.

[00277] Em ainda outra modalidade, a invenção se refere a uma composição farmacêutica que compreende:

- uma variante de anticorpo como definido em qualquer um dos aspectos e modalidades aqui descritos, e
- um carreador farmacêuticamente aceitável.

[00278] As composições farmacêuticas podem ser formuladas de acordo com técnicas convencionais, tais como as descritas em Remington: *The Science and Practice of Pharmacy, 19ª Edição, Gennaro, Ed., Mack Publishing Co., Easton, PA, 1995*. Uma composição farmacêutica da presente invenção pode, por exemplo incluir diluentes, enchimentos, sais, tampões, detergentes (por exemplo, um detergente não iônico, como Tween-20 ou Tween-80), estabilizantes (por exemplo, açúcares ou aminoácidos livres de proteínas), conservantes, fixadores de tecido, solubilizantes e/ou outros materiais adequados para inclusão em uma composição farmacêutica.

[00279] Os carreadores farmacêuticamente aceitáveis incluem todos e quaisquer solventes adequados, meios de dispersão, revestimentos, agentes antibacterianos e antifúngicos, agentes de isotonicidade, antioxidantes e agentes de retardamento de absorção e semelhantes que são fisiologicamente compatíveis com uma variante de anticorpo da presente invenção. Exemplos de carreadores aquosos e não aquosos adequados que podem ser empregados nas composições farmacêuticas da presente invenção incluem água, solução salina, solução salina tamponada com fosfato, etanol, dextrose, polióis (tais como glicerol, propilenoglicol, polietilenoglicol e semelhantes), e misturas adequadas destes, óleos vegetais, soluções coloidais de carboximetilcelulose, goma tragacanta e ésteres orgânicos injetáveis, tais como oleato de etila e/ou vários tampões. Os veículos farmacêuticamente aceitáveis incluem soluções ou dispersões aquosas estéreis e pós estéreis para a preparação extemporânea de soluções ou dispersões injetáveis estéreis. A fluidez adequada pode ser mantida, por exemplo, pelo uso de materiais de revestimento, como a lecitina, pela manutenção do tamanho de partícula necessário no caso de dispersões e pelo uso de surfactantes.

[00280] As composições farmacêuticas também podem compreender antioxidantes farmaceuticamente aceitáveis, por exemplo (1) antioxidantes solúveis em água, tais como ácido ascórbico, cloridrato de cisteína, bissulfato de sódio, metabissulfito de sódio, sulfito de sódio e semelhantes; (2) antioxidantes solúveis em óleo, tais como palmitato de ascorbila, hidroxianisol butilado, hidroxitolueno butilado, lecitina, galato de propila, alfa-tocoferol e semelhantes; e (3) agentes quelantes de metal, tais como ácido cítrico, ácido etilenodiamina tetraacético (EDTA), sorbitol, ácido tartárico, ácido fosfórico e semelhantes.

[00281] As composições farmacêuticas também podem compreender agentes de isotonicidade, tais como açúcares, poliálcoois, tais como manitol, sorbitol, glicerol ou cloreto de sódio nas composições.

[00282] As composições farmacêuticas também podem conter um ou mais adjuvantes apropriados para a via de administração escolhida, tais como conservantes, agentes umectantes, agentes emulsionantes, agentes dispersantes, conservantes ou tampões, que podem aumentar a vida útil ou a eficácia da composição farmacêutica. A composição farmacêutica da presente invenção pode ser preparada com carreadores que irão proteger o anticorpo contra a liberação rápida, tal como uma formulação de liberação controlada, incluindo implantes, adesivos transdérmicos e sistemas de distribuição microencapsulados. Tais carreadores podem incluir gelatina, monoestearato de gliceril, diestearato de gliceril, polímeros biodegradáveis e biocompatíveis, tais como etileno vinil acetato, polianidridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres e ácido polilático sozinho ou com uma cera ou outros materiais bem conhecidos na técnica. Os métodos para a preparação de tais formulações são geralmente conhecidos dos especialistas na técnica.

[00283] As soluções injetáveis estéreis podem ser preparadas incorporando o composto ativo na quantidade necessária num solvente apropriado com um ou uma combinação de ingredientes, e. conforme

enumerado acima, conforme necessário, seguido por microfiltração de esterilização. Geralmente, as dispersões são preparadas incorporando o composto ativo em um veículo estéril que contém um meio de dispersão básico e os outros ingredientes necessários, e. daqueles enumerados acima. No caso de pós estéreis para a preparação de soluções injetáveis estéreis, exemplos de métodos de preparação são secagem a vácuo e liofilização (liofilização) que rendem um pó do ingrediente ativo mais qualquer ingrediente adicional desejado a partir de uma solução previamente esterilizada por filtração.

[00284] Os níveis de dosagem reais dos ingredientes ativos nas composições farmacêuticas podem ser variados de modo a obter uma quantidade do ingrediente ativo que seja eficaz para atingir a resposta terapêutica desejada para um determinado paciente, composição e modo de administração, sem ser tóxico para o paciente. O nível de dosagem selecionado dependerá de uma variedade de fatores farmacocinéticos, incluindo a atividade das composições particulares da presente invenção empregadas, a via de administração, o tempo de administração, a taxa de excreção do composto particular a ser empregado, a duração do tratamento, outras fármacos, compostos e/ou materiais usados em combinação com as composições particulares empregadas, a idade, sexo, peso, condição, saúde geral e histórico médico anterior do paciente a ser tratado e fatores semelhantes bem conhecidos nas artes médicas.

[00285] A composição farmacêutica pode ser administrada por qualquer via e modo adequado. Em uma modalidade, uma composição farmacêutica da presente invenção é administrada por via parenteral. “Administrado por via parenteral”, tal como aqui utilizado, significa modos de administração diferentes da administração enteral e tópica, geralmente por injeção, e incluem epidérmico, intravenoso, intramuscular, intra-arterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardíaco, intradérmico,

intraperitoneal, intratendíneo, transtraqueal, subcutâneo, injeção e infusão subcuticular, intra-articular, subcapsular, subaracnoide, intraespinhal, intracraniana, intratorácica, epidural e intraesternal.

[00286] Em uma modalidade, a composição farmacêutica é administrada por injeção intravenosa ou subcutânea ou infusão.

[00287] A invenção também se refere a kit de peças para uso simultâneo, separado ou sequencial em terapia que compreende uma variante de anticorpo de acordo com a invenção, ou uma composição que compreende uma variante de anticorpo de acordo com a invenção, opcionalmente em que o kit de peças contém mais do que uma dosagem da variante de anticorpo.

[00288] Em uma modalidade, o kit de peças compreende uma variante de anticorpo ou composição em um ou mais recipientes, como frascos.

[00289] Em uma modalidade, o kit de peças compreende uma variante ou composição de anticorpo para uso simultâneo, separado ou sequencial em terapia.

Aplicações terapêuticas

[00290] As variantes de anticorpos da presente invenção têm inúmeras utilidades terapêuticas envolvendo o tratamento de doenças e distúrbios envolvendo células que expressam CD38, por exemplo, células tumorais ou células imunes que expressam CD38. Por exemplo, as variantes do anticorpo podem ser administradas a células em cultura, por exemplo, *in vitro* ou *ex vivo*, ou a indivíduos humanos, por exemplo, *in vivo*, para tratar ou prevenir uma variedade de distúrbios e doenças. Tal como aqui utilizado, o termo “indivíduo” pretende incluir animais humanos e não humanos que podem beneficiar ou responder ao anticorpo. Os indivíduos podem, por exemplo, incluir pacientes humanos com doenças ou distúrbios que podem ser corrigidos ou melhorados pela modulação da função de CD38, tal como atividade enzimática e/ou indução de lise e/ou eliminação/redução do número de células que expressam CD38 e/ou redução do quantidade de CD38 na

membrana celular. Consequentemente, as variantes do anticorpo podem ser utilizadas para induzir *in vivo* ou *in vitro* uma ou mais das seguintes atividades biológicas: CDC de uma célula que expressa CD38 na presença de complemento; inibição da atividade da ciclase CD38; fagocitose ou ADCC de uma célula que expressa CD38 na presença de células efectoras humanas; e trogocitose de células que expressam CD38, tais como células tumorais ou células imunes.

[00291] Assim, em um aspecto, a presente invenção se refere à variante de anticorpo de acordo com a presente invenção, o ácido nucleico ou combinação de ácidos nucleicos de acordo com a presente invenção, o veículo de dispensação de acordo com a presente invenção, o vetor de expressão de acordo com a presente invenção, a célula hospedeira de acordo com a presente invenção, a composição de acordo com a presente invenção ou a composição farmacêutica de acordo com a presente invenção para uso como um medicamento.

[00292] Em um aspecto, a presente invenção se refere ao uso da variante de anticorpo de acordo com a presente invenção, o ácido nucleico ou combinação de ácidos nucleicos de acordo com a presente invenção, o veículo de dispensação de acordo com a presente invenção, o vetor de expressão de acordo com a presente invenção, a célula hospedeira de acordo com a presente invenção, a composição de acordo com a presente invenção ou a composição farmacêutica de acordo com a presente invenção na preparação de um medicamento para tratar ou prevenir uma doença ou distúrbio.

[00293] Em um aspecto, a presente invenção se refere à variante de anticorpo de acordo com a presente invenção, o ácido nucleico ou combinação de ácidos nucleicos de acordo com a presente invenção, o veículo de dispensação de acordo com a presente invenção, o vetor de expressão de acordo com a presente invenção, a célula hospedeira de acordo com a presente invenção, a composição de acordo com a presente invenção ou a

composição farmacêutica de acordo com a presente invenção para uso no tratamento ou prevenção de uma doença ou distúrbio, tal como para uso no tratamento ou prevenção de uma doença ou distúrbio envolvendo células que expressam CD38, por exemplo para uso no tratamento de uma doença envolvendo células que expressam CD38. Em um aspecto, a presente invenção se refere à variante de anticorpo de acordo com a presente invenção, o ácido nucleico de acordo com a presente invenção, o vetor de expressão de acordo com a presente invenção, a célula hospedeira de acordo com a presente invenção, a composição de acordo com a presente invenção, ou a composição farmacêutica de acordo com a presente invenção para uso na indução de uma resposta de CDC contra um tumor que compreende células que expressam CD38.

[00294] Em um aspecto, a presente invenção se refere a um método de tratamento de uma doença ou distúrbio que compreende a administração da variante de anticorpo de acordo com a presente invenção, o ácido nucleico ou combinação de ácidos nucleicos de acordo com a presente invenção, o veículo de dispensação de acordo com a presente invenção, o vetor de expressão de acordo com a presente invenção, a célula hospedeira de acordo com a reivindicação a presente invenção, a composição de acordo com a presente invenção ou a composição farmacêutica de acordo com a presente invenção para um indivíduo em necessidade dela.

[00295] Em um aspecto, a invenção se refere à variante de anticorpo de acordo com qualquer aspecto ou modalidade para uso como um medicamento.

[00296] Em um aspecto, a invenção se refere ao uso da variante de anticorpo de acordo com qualquer aspecto ou modalidade na preparação de um medicamento para tratar ou prevenir uma doença ou distúrbio.

[00297] Em um aspecto, a invenção se refere à variante de anticorpo de acordo com qualquer aspecto ou modalidade para uso no tratamento ou prevenção de uma doença ou distúrbio.

[00298] Em um aspecto, a invenção se refere a um método de tratamento de uma doença ou distúrbio, que compreende a administração da variante de anticorpo de acordo com qualquer aspecto ou modalidade a um indivíduo em necessidade do mesmo, tipicamente em uma quantidade terapeuticamente eficaz e/ou por um tempo suficiente para tratar a doença ou distúrbio.

[00299] Em um aspecto, a invenção se refere a uma composição farmacêutica que compreende a variante de anticorpo de acordo com qualquer aspecto ou modalidade, para uso como um medicamento.

[00300] Em um aspecto, a invenção se refere a uma composição farmacêutica que compreende a variante de anticorpo de acordo com qualquer aspecto ou modalidade para uso no tratamento ou prevenção de uma doença ou distúrbio.

[00301] Em um aspecto, a invenção se refere a um método de tratamento de uma doença ou distúrbio que compreende a administração de uma composição farmacêutica que compreende a variante de anticorpo de acordo com qualquer aspecto ou modalidade a um indivíduo em necessidade, tipicamente em uma quantidade terapeuticamente eficaz e/ou para um tempo suficiente para tratar a doença ou distúrbio.

[00302] Em um aspecto, a presente invenção se refere a um método de tratamento de uma doença ou distúrbio, que compreende as etapas de

- selecionar um indivíduo que sofre da doença ou distúrbio, e
- administrar ao indivíduo a variante de anticorpo de acordo

com qualquer aspecto ou modalidade, ou uma composição farmacêutica que compreende a variante de anticorpo, tipicamente em uma quantidade terapeuticamente eficaz e/ou por um tempo suficiente para tratar a doença ou distúrbio.

[00303] Em uma modalidade, a doença ou distúrbio envolvendo células que expressam CD38 é câncer, isto é, um distúrbio tumorigênico, como um

distúrbio distinguido pela presença de células tumorais ou células imunes que expressam CD38 incluindo, por exemplo, cânceres hematológicos, como linfoma de células B, plasma neoplasias celulares, linfoma de células T/NK, neoplasias mieloides, bem como neoplasias de tumor sólido.

[00304] Em algumas modalidades, a doença ou distúrbio é um câncer envolvendo células tumorais que expressam CD38.

[00305] Em algumas modalidades, a doença ou distúrbio é um câncer envolvendo células imunossupressoras que expressam CD38, tais como células imunossupressoras não cancerosas que expressam CD38.

[00306] Em algumas modalidades, a doença ou distúrbio é um câncer envolvendo células tumorais e células imunossupressoras que expressam CD38.

[00307] Em algumas modalidades, a doença ou distúrbio é um câncer envolvendo células imunossupressoras que expressam CD38 e células tumorais que não expressam CD38.

[00308] Em ainda outras modalidades, a doença ou distúrbio é uma doença ou distúrbio inflamatório e/ou autoimune envolvendo células que expressam CD38.

[00309] Em ainda outras modalidades, a doença ou distúrbio é um distúrbio metabólico envolvendo células que expressam CD38.

Cânceres hematológicos:

[00310] Em um aspecto, a doença ou distúrbio é um câncer hematológico. Exemplos de tais cânceres hematológicos incluem linfomas/leucemias de células B, incluindo leucemia/linfoma linfoblástico de células B precursoras e linfomas não Hodgkin de células B; leucemia promielocítica aguda, leucemia linfoblástica aguda e neoplasias de células B maduras, como leucemia linfocítica crônica de células B (CLL)/linfoma linfocítico pequeno (SLL), leucemia linfocítica aguda de células B, leucemia prolinfocítica de células B, linfoma de células MCL (linfoma de células

MCL)), linfoma folicular (FL), incluindo FL de baixo grau, grau intermediário e alto grau, linfoma cutâneo do centro do folículo, linfoma de células B da zona marginal (tipo MALT, tipo nodal e esplênico), leucemia de células pilosas, células B grandes difusas linfoma (DLBCL), linfoma de Burkitt, plasmocitoma, mieloma de células plasmáticas, leucemia de células plasmáticas, distúrbio linfoproliferativo pós-transplante, macroglobulinemia de Waldenström, leucemias de células plasmáticas e linfoma anaplásico de células grandes (ALCL).

[00311] Exemplos de linfomas não Hodgkin de células B são granulomatose linfomatoide, linfoma de efusão primária, linfoma intravascular de grandes células B, linfoma mediastinal de grandes células B, doenças da cadeia pesada (incluindo doença γ , μ e α), linfomas induzidos por terapia com agentes imunossupressores, tais como linfoma induzido por ciclosporina e linfoma induzido por metotrexato.

[00312] Em uma modalidade da presente invenção, o distúrbio envolvendo células que expressam CD38 é o linfoma de Hodgkin.

[00313] Outros exemplos de distúrbios envolvendo células que expressam CD38 incluem doenças malignas derivadas de células T e NK, incluindo: células T maduras e neoplasias de células NK, incluindo leucemia prolinfocítica de células T, leucemia linfocítica granular grande de células T, leucemia agressiva de células NK, leucemia/linfoma de células T adultas, linfoma extranodal de células NK/T, tipo nasal, linfoma de células T do tipo enteropatia, linfoma de células T hepatoesplênico, linfoma de células T tipo paniculite subcutâneo, linfoma de células NK blástico, Micose fungoide, Síndrome de Sézary, distúrbios linfoproliferativos cutâneos primários de células T CD30 (linfoma C-ALCL anaplásico cutâneo primário, papulose linfomatoide, lesões limítrofes), linfoma angioimunoblástico de células T, linfoma de células T periférico não especificado e linfoma anaplásico de células grandes.

[00314] Exemplos de doenças malignas derivadas de células mieloides incluem leucemia mieloide aguda, incluindo leucemia promielocítica aguda e doenças mieloproliferativas crônicas, incluindo leucemia mieloide crônica.

[00315] Em algumas modalidades, o câncer hematológico é selecionado do grupo que consiste em mieloma múltiplo (MM), leucemia linfocítica crônica (CLL), leucemia linfoblástica aguda (ALL), leucemia mieloide aguda (adultos) (AML), linfoma de células do manto (MCL), linfoma folicular (FL) e linfoma difuso de grandes células B (DLBCL).

[00316] Em algumas modalidades, o câncer é selecionado do grupo que consiste em mieloma múltiplo (MM), leucemia linfocítica crônica (CLL), linfoma de células do manto (MCL), linfoma difuso de grandes células B (DLBCL), leucemia mieloide aguda (adultos) (AML), leucemia linfoblástica aguda (LLA) e linfoma folicular (FL).

[00317] Em algumas modalidades, o câncer é mieloma múltiplo (MM).

[00318] Em algumas modalidades, o câncer é leucemia linfocítica crônica (CLL).

[00319] Em algumas modalidades, o câncer é linfoma de células do manto (MCL).

[00320] Em algumas modalidades, o câncer é linfoma difuso de grandes células B (DLBCL).

[00321] Em algumas modalidades, o câncer é linfoma folicular (FL).

[00322] Em algumas modalidades, o câncer é leucemia mieloide aguda (adultos) (AML).

[00323] Em algumas modalidades, o câncer é leucemia linfoblástica aguda (ALL).

Malignidades de tumor sólido:

[00324] Em um aspecto, a doença ou distúrbio é um câncer que compreende um tumor sólido. Ou seja, o paciente que sofre de câncer tem um tumor sólido.

[00325] Exemplos de tumores sólidos incluem, mas não estão limitados a, melanoma, câncer de pulmão, câncer de pulmão de células não pequenas escamosas (NSCLC), NSCLC não escamosas, câncer colorretal, câncer de próstata, câncer de próstata resistente à castração, câncer de estômago, câncer de ovário, câncer gástrico, câncer de fígado, câncer de pâncreas, câncer de tireoide, carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço, carcinoma de esôfago ou trato gastrointestinal, câncer de mama, câncer de trompa de Falópio, câncer cerebral, câncer uretral, câncer geniturinário, câncer endometrial, cervical câncer, adenocarcinoma de pulmão, carcinoma de células renais (RCC) (por exemplo, um carcinoma de células claras do rim ou um carcinoma de células papilares renais), mesotelioma, carcinoma nasofaríngeo (NPC), um carcinoma do esôfago ou do trato gastrointestinal, ou uma lesão metastática de qualquer pessoa disso.

[00326] Em uma modalidade preferida, o tumor sólido é de um câncer que contém células imunossupressoras, como Tregs, e que expressam CD38. As células T reguladoras (Tregs) podem ter alta expressão de CD38, e Tregs com alta expressão de CD38 são mais imunossupressoras em comparação com Tregs com expressão de CD38 intermediária (*Krejci J. et al. Blood 2016 128: 384-394*). Por conseguinte, sem estar limitado à teoria, a capacidade das variantes de anticorpos de acordo com a invenção para reduzir a quantidade de CD38 expressa em Tregs via trogocitose permite particularmente o tratamento de tumores sólidos em pacientes onde as Tregs expressam CD38. Tregs expressam CD38 quando a expressão de CD38 em Tregs é estatisticamente significativa em comparação com um controle, e, expressão detectada com anticorpo anti-CD38 vs expressão detectada com um anticorpo de controle de isótipo usando métodos bem conhecidos. Isso pode ser testado, por exemplo, tomando uma amostra biológica, como uma amostra de sangue, amostra de medula óssea ou uma biópsia de tumor.

[00327] Assim, em um aspecto, a invenção se refere à variante de

anticorpo de acordo com qualquer aspecto ou modalidade, ou uma composição farmacêutica que compreende a variante de anticorpo, para uso no tratamento ou prevenção de um tumor sólido em um indivíduo que compreende Tregs que expressam CD38.

[00328] Em outro aspecto, a invenção se refere a um método de tratamento de um tumor sólido em um indivíduo, que compreende Tregs que expressam CD38, o método que compreende a administração da variante de anticorpo de acordo com qualquer aspecto ou modalidade ao indivíduo, ou uma composição farmacêutica que compreende a variante de anticorpo, tipicamente em uma quantidade terapeuticamente eficaz e/ou por um tempo suficiente para tratar a doença ou distúrbio.

[00329] Em algumas modalidades, o tumor sólido é melanoma.

[00330] Em algumas modalidades, o tumor sólido é câncer de pulmão.

[00331] Em algumas modalidades, o tumor sólido é câncer de pulmão de células não pequenas escamosas (NSCLC).

[00332] Em algumas modalidades, o tumor sólido é NSCLC não escamosas.

[00333] Em algumas modalidades, o tumor sólido é câncer colorretal.

[00334] Em algumas modalidades, o tumor sólido é câncer de próstata.

[00335] Em algumas modalidades, o tumor sólido é câncer de próstata resistente à castração.

[00336] Em algumas modalidades, o tumor sólido é câncer de estômago.

[00337] Em algumas modalidades, o tumor sólido é câncer de ovário.

[00338] Em algumas modalidades, o tumor sólido é câncer gástrico.

[00339] Em algumas modalidades, o tumor sólido é câncer de fígado.

[00340] Em algumas modalidades, o tumor sólido é câncer pancreático.

[00341] Em algumas modalidades, o tumor sólido é câncer de tireoide.

[00342] Em algumas modalidades, o tumor sólido é carcinoma de

células escamosas da cabeça e pescoço.

[00343] Em algumas modalidades, o tumor sólido é carcinoma do esôfago ou do trato gastrointestinal.

[00344] Em algumas modalidades, o tumor sólido é câncer de mama.

[00345] Em algumas modalidades, o tumor sólido é câncer das trompas de Falópio.

[00346] Em algumas modalidades, o tumor sólido é câncer cerebral.

[00347] Em algumas modalidades, o tumor sólido é câncer uretral.

[00348] Em algumas modalidades, o tumor sólido é câncer geniturinário.

[00349] Em algumas modalidades, o tumor sólido é câncer endometrial.

[00350] Em algumas modalidades, o tumor sólido é câncer cervical.

[00351] Em algumas modalidades, as células tumorais do tumor sólido não apresentam expressão de CD38 detectável. As células tumorais do tumor sólido não têm expressão de CD38 detectável quando a expressão de CD38 em células tumorais isoladas do tumor sólido é estatisticamente insignificante quando comparada com um controle, p. Ex. expressão detectada com anticorpo anti-CD38 vs expressão detectada com um anticorpo de controle de isótipo usando métodos bem conhecidos. Isso pode ser testado, por exemplo, tomando uma amostra biológica, como uma biópsia, do tumor.

[00352] Em algumas modalidades, o câncer está em um paciente que compreende células T reguladoras que expressam CD38.

[00353] Em modalidades específicas, a variante de anticorpo é administrada em uma quantidade terapeuticamente eficaz e/ou por um período de tempo suficiente para tratar o câncer.

Distúrbio metabólica:

[00354] Em um aspecto, a doença ou o distúrbio é um distúrbio metabólico. Ou seja, o paciente sofre de um distúrbio metabólico.

[00355] Em algumas modalidades, o distúrbio metabólico é a amiloidose. A amiloidose é um vasto grupo de doenças definidas pela presença de depósitos de proteínas insolúveis nos tecidos. Seu diagnóstico é baseado em achados histológicos. Em uma outra modalidade, a dita amiloidose pode ser amiloidose AL.

Pacientes:

[00356] A variante de anticorpo da presente invenção pode ser para o uso de tratamento ou prevenção de uma doença ou distúrbio em um indivíduo que recebeu pelo menos uma terapia anterior para a mesma doença ou distúrbio com um ou mais compostos, em que o dito um ou mais compostos são diferentes da variante de anticorpo da presente invenção. Em uma modalidade, a dita doença ou distúrbio pode ser qualquer doença ou distúrbio aqui descrito; tal como um câncer, doença inflamatória e/ou autoimune ou distúrbio envolvendo células que expressam CD38, ou um distúrbio metabólico envolvendo células que expressam CD38.

[00357] Por exemplo, em algumas modalidades, a variante de anticorpo da presente invenção pode ser para o uso de tratamento ou prevenção de uma doença ou distúrbio em um indivíduo que recebeu um tratamento anterior com um inibidor de proteassoma (PI) e/ou uma fármaco imunomoduladora (IMiD). Exemplos de inibidores de proteassoma incluem, mas não estão limitados a bortezomibe, carfilzomibe e ixazomibe. Exemplos de IMiDs incluem, mas não estão limitados a talidomida, lenalidomida e pomalidomida. Em uma outra modalidade, a dita doença ou distúrbio pode ser um câncer ou um tumor, como mieloma múltiplo, linfoma de células do manto ou síndrome mielodisplásica (SMD). Assim, o indivíduo pode ser um paciente com câncer, tal como um paciente com mieloma múltiplo, linfoma de células do manto ou síndrome mielodisplásica (SMD).

[00358] A variante de anticorpo da presente invenção pode ser para o uso de tratamento ou prevenção de uma doença ou distúrbio em um indivíduo

que não teve qualquer tratamento anterior com um anticorpo anti-CD38. Normalmente, tal indivíduo ou paciente é dito como um paciente virgem com anticorpo anti-CD38. Em uma modalidade, o anticorpo anti-CD38 é daratumumabe; isto é, o indivíduo ou paciente não teve qualquer tratamento anterior com daratumumabe. Assim, em uma modalidade, o indivíduo ou paciente é um indivíduo/paciente naïve para daratumumabe. A doença ou distúrbio pode ser um câncer ou tumor, ou uma doença metabólica, tal como amiloidose, de acordo com qualquer aspecto ou modalidade aqui descrita.

[00359] A presente invenção também fornece a variante de anticorpo para o uso de tratamento ou prevenção de uma doença ou distúrbio em um indivíduo que recebeu pelo menos uma terapia anterior que compreende um anticorpo CD38.

[00360] A presente invenção também fornece a variante de anticorpo para uso no tratamento de pacientes com câncer que receberam pelo menos uma terapia anterior que compreende um anticorpo CD38. A presente invenção também fornece a variante de anticorpo para uso no tratamento de pacientes com uma doença metabólica, como amiloidose, que receberam pelo menos uma terapia anterior que compreende um anticorpo CD38. Tal terapia anterior pode ter sido um ou mais ciclos de um programa de tratamento planejado que compreende anticorpo CD38, tal como um ou mais ciclos planejados de anticorpo CD38 como terapia de agente único ou em uma terapia de combinação, bem como uma sequência de tratamentos administrados em uma forma planejada. Em uma modalidade, a terapia anterior era a monoterapia com anticorpo CD38. Em uma modalidade, a terapia anterior era uma terapia de combinação que compreende um anticorpo CD38. Por exemplo, a terapia anterior pode ter sido um anticorpo CD38 em combinação com um inibidor de proteassoma (PI) e um agente imunomodulador. Em algumas modalidades, o anticorpo CD38 é daratumumabe.

[00361] Em alguns aspectos, o paciente com câncer também pode ser aquele em que a administração de daratumumabe como uma monoterapia tem um efeito limitado.

[00362] Em alguns aspectos, o câncer pode ser distinguido como um câncer “refratário” ou “recidivante” a uma terapia anterior. Em uma outra modalidade, a terapia anterior pode compreender um ou mais de um PI, um IMiD e um anticorpo CD38, por exemplo, em que o anticorpo CD38 é daratumumabe. Normalmente, isso indica que a terapia anterior atingiu menos do que uma resposta completa (CR), por exemplo, que o câncer não era responsivo à monoterapia com anticorpo CD38 ou terapia combinada ou que o câncer progrediu dentro de um período de tempo predeterminado após o final de terapia com anticorpos CD38. Exemplos de tais terapias de combinação incluem, mas não estão limitados a, combinação de um anticorpo CD38 com um PI ou um IMiD ou uma combinação de um PI e um IMiD. Da mesma forma, pode indicar que a terapia anterior atingiu menos do que uma resposta completa (CR), por exemplo, que o câncer não era responsivo a um PI, ou um IMiD ou uma terapia combinada dos mesmos, ou que o câncer progrediu dentro de um período de tempo predeterminado após o final da dita terapia. O versado na técnica pode determinar se um câncer é refratário a uma terapia anterior com base no que é conhecido na técnica, incluindo diretrizes disponíveis para cada câncer.

[00363] Por exemplo, no mieloma múltiplo, a doença refratária e recidivante pode ser identificada de acordo com as diretrizes publicadas por Rajkumar, Harousseau *et al.*, Em nome do *International Myeloma Workshop Consensus Panel*, recomendações de consenso para o relato uniforme de ensaios clínicos: relatório do *International Myeloma Workshop Consensus Panel*, *Blood* 2011; 117: 4691-4695:

[00364] O mieloma refratário pode ser definido como doença que não responde durante a terapia primária ou de resgate, ou progride dentro de 60

dias após a última terapia. A doença não responsiva é definida como falha em atingir uma resposta mínima ou desenvolvimento de doença progressiva (DP) durante a terapia. Pode haver 2 categorias de mieloma refratário: “mieloma recorrente e refratário” e “mieloma refratário primário”:

[00365] Mieloma recidivante e refratário pode ser definido como doença que não responde durante a terapia de resgate ou progride dentro de 60 dias da última terapia em pacientes que alcançaram resposta mínima (RM) ou melhor em algum ponto anterior antes de progredir no curso da doença.

[00366] O mieloma refratário primário pode ser definido como doença que não responde em pacientes que nunca alcançaram uma resposta mínima ou melhor com qualquer terapia. Inclui pacientes que nunca alcançaram RM ou melhor, nos quais não há mudança significativa na proteína M e nenhuma evidência de progressão clínica, bem como DP refratário primário, onde os pacientes atendem aos critérios de DP verdadeiro. Ao relatar a eficácia do tratamento para pacientes refratários primários, a eficácia nesses 2 subgrupos (“sem resposta não progressiva” e “progressiva”) deve ser especificada separadamente.

[00367] Mieloma recidivante pode ser definido como mieloma tratado anteriormente que progride e requer o início da terapia de resgate, mas não atende aos critérios para as categorias de “mieloma refratário primário” ou “mieloma recidivante e refratário”.

[00368] Para obter detalhes sobre respostas específicas (CR, PR etc.) no mieloma múltiplo e como testá-las, consulte *Rajkumar, Harousseau et al., 2011* (supra).

[00369] Por conseguinte, em algumas modalidades, a variante de anticorpo de acordo com qualquer aspecto ou modalidade aqui, ou uma composição farmacêutica que compreende a variante de anticorpo, é para uso no tratamento de um câncer que é refratário a um tratamento anterior que compreende um ou mais de um PI, um IMiD e um anticorpo CD38. Em uma

modalidade, o tratamento anterior compreende um anticorpo CD38. Em uma modalidade específica, o câncer é identificado como um câncer refratário antes do uso.

[00370] Em outra modalidade, é provido um método para o tratamento do câncer em um indivíduo, que compreende as etapas de:

(i) identificar o indivíduo como refratário a um tratamento anterior que compreende um ou mais de um PI, um IMiD e um anticorpo CD38, e

(ii) administrar uma quantidade terapeuticamente eficaz da variante de anticorpo de acordo com qualquer aspecto ou modalidade aqui, ou uma composição farmacêutica que compreende a variante de anticorpo ao indivíduo.

[00371] Em uma modalidade, o tratamento anterior compreende um anticorpo CD38.

[00372] Em outra modalidade, é provido um método para o tratamento de câncer refratário a um tratamento anterior que compreende um ou mais de um PI, um IMiD e um anticorpo CD38 em um indivíduo, que compreende a administração de uma quantidade terapeuticamente eficaz da variante de anticorpo de acordo com qualquer aspecto ou modalidade aqui, ou uma composição farmacêutica que compreende a variante de anticorpo para o indivíduo. Em uma modalidade, o tratamento anterior compreende um anticorpo CD38.

[00373] Em algumas modalidades, o PI é selecionado do grupo que consiste em bortezomibe, carfilzomibe e ixazomibe.

[00374] Em algumas modalidades, o IMiD é selecionado do grupo que consiste em talidomida, lenalidomida e pomalidomida.

[00375] Em algumas modalidades, o anticorpo CD38 é daratumumabe.

[00376] Em algumas modalidades, a variante de anticorpo de acordo com qualquer aspecto ou modalidade aqui, ou uma composição farmacêutica

que compreende a variante de anticorpo, é para uso no tratamento de um câncer que é recorrente após um tratamento anterior que compreende um ou mais de um PI, um IMiD e um anticorpo CD38. Em uma modalidade, o tratamento anterior compreende um anticorpo CD38. Em uma modalidade específica, o câncer é identificado como recidivante antes do uso.

[00377] Em outra modalidade, é provido um método para o tratamento do câncer em um indivíduo, que compreende as etapas de:

(i) identificar o indivíduo como tendo uma recaída após um tratamento anterior que compreende um ou mais de um PI, um IMiD e um anticorpo CD38, e

(ii) administrar uma quantidade terapeuticamente eficaz da variante de anticorpo de acordo com qualquer aspecto ou modalidade aqui, ou uma composição farmacêutica que compreende a variante de anticorpo ao indivíduo.

[00378] Em uma modalidade, o tratamento anterior compreende um anticorpo CD38.

[00379] Em outra modalidade, é provido um método para o tratamento de câncer recidivante após um tratamento anterior, que compreende um ou mais de um PI, um IMiD e um anticorpo CD38 em um indivíduo, que compreende a administração de uma quantidade terapeuticamente eficaz da variante de anticorpo de acordo com qualquer aspecto ou modalidade aqui, ou uma composição farmacêutica que compreende a variante de anticorpo para o indivíduo. Em uma modalidade, o tratamento anterior compreende um anticorpo CD38.

[00380] Em algumas modalidades, o PI é selecionado do grupo que consiste em bortezomibe, carfilzomibe e ixazomibe.

[00381] Em algumas modalidades, o IMiD é selecionado do grupo que consiste em talidomida, lenalidomida e pomalidomida.

[00382] Em algumas modalidades, o anticorpo CD38 é daratumumabe.

[00383] Em modalidades específicas, a variante de anticorpo de acordo com a presente invenção é administrada em uma quantidade terapeuticamente eficaz e/ou por um período de tempo suficiente para tratar o câncer refratário ou recidivante.

[00384] Em algumas modalidades, o câncer refratário ou recidivante é um câncer hematológico.

[00385] Em algumas modalidades, o câncer refratário ou recidivante é selecionado do grupo que consiste em mieloma múltiplo (MM), leucemia linfocítica crônica (CLL), leucemia linfoblástica aguda (ALL), leucemia mieloide aguda (adultos) (AML), linfoma de células do manto (MCL), linfoma folicular (FL) e linfoma difuso de grandes células B (DLBCL).

[00386] Em algumas modalidades, o câncer refratário ou recidivante é selecionado do grupo que consiste em mieloma múltiplo (MM), leucemia linfocítica crônica (CLL), linfoma de células do manto (MCL), linfoma difuso de grandes células B (DLBCL) e linfoma folicular (FL).

[00387] Em algumas modalidades, o câncer refratário ou recidivante é mieloma múltiplo (MM).

[00388] Em algumas modalidades, o câncer refratário ou recidivante é a leucemia linfocítica crônica (CLL).

[00389] Em algumas modalidades, o câncer refratário ou recidivante é o linfoma de células do manto (MCL).

[00390] Em algumas modalidades, o câncer refratário ou recidivante é linfoma difuso de grandes células B (DLBCL).

[00391] Em algumas modalidades, o câncer refratário ou recidivante é o linfoma folicular (FL).

[00392] Em algumas modalidades, o câncer refratário ou recidivante é um tumor sólido. Em algumas modalidades, o câncer refratário ou recidivante é selecionado do grupo que consiste em melanoma, câncer de pulmão, câncer de pulmão de células não pequenas escamosas (NSCLC), NSCLC não

escamosas, câncer colorretal, câncer de próstata, câncer de próstata resistente à castração, estômago câncer, câncer de ovário, câncer gástrico, câncer de fígado, câncer de pâncreas, câncer de tireoide, carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço, carcinoma de esôfago ou trato gastrointestinal, câncer de mama, câncer de trompa de Falópio, câncer de cérebro, câncer uretral, câncer geniturinário, câncer endometrial, câncer cervical.

[00393] Em algumas modalidades, o câncer refratário ou recidivante é o melanoma.

[00394] Em algumas modalidades, o câncer refratário ou recidivante é o câncer de pulmão.

[00395] Em algumas modalidades, o câncer refratário ou recidivante é câncer de pulmão de células não pequenas escamosas (NSCLC).

[00396] Em algumas modalidades, o câncer refratário ou recidivante é NSCLC não escamosas.

[00397] Em algumas modalidades, o câncer refratário ou recidivante é o câncer colorretal.

[00398] Em algumas modalidades, o câncer refratário ou recidivante é o câncer de próstata.

[00399] Em algumas modalidades, o câncer refratário ou recidivante é o câncer de próstata resistente à castração.

[00400] Em algumas modalidades, o câncer refratário ou recidivante é câncer de estômago.

[00401] Em algumas modalidades, o câncer refratário ou recidivante é o câncer de ovário.

[00402] Em algumas modalidades, o câncer refratário ou recidivante é o câncer gástrico.

[00403] Em algumas modalidades, o câncer refratário ou recidivante é câncer de fígado.

[00404] Em algumas modalidades, o câncer refratário ou recidivante é o câncer pancreático.

[00405] Em algumas modalidades, o câncer refratário ou recidivante é o câncer de tireoide.

[00406] Em algumas modalidades, o câncer refratário ou recidivante é o carcinoma de células escamosas da cabeça e pescoço.

[00407] Em algumas modalidades, o câncer refratário ou recidivante é carcinoma do esôfago ou do trato gastrointestinal.

[00408] Em algumas modalidades, o câncer refratário ou recidivante é o câncer de mama.

[00409] Em algumas modalidades, o câncer refratário ou recidivante é o câncer das trompas de Falópio.

[00410] Em algumas modalidades, o câncer refratário ou recidivante é câncer cerebral.

[00411] Em algumas modalidades, o câncer refratário ou recidivante é o câncer uretral.

[00412] Em algumas modalidades, o câncer refratário ou recidivante é o câncer geniturinário.

[00413] Em algumas modalidades, o câncer refratário ou recidivante é o câncer endometrial.

[00414] Em algumas modalidades, o câncer refratário ou recidivante é o câncer cervical.

Doenças e distúrbios autoimunes e inflamatórios:

[00415] Em outra modalidade da presente invenção, o distúrbio envolvendo células que expressam CD38 é um distúrbio imune no qual células B que expressam CD38, macrófagos, células plasmáticas, monócitos e células T estão envolvidos, tal como uma doença inflamatória e/ou autoimune. Exemplos de distúrbios imunológicos em que CD38 expressando células B, plasmócitos, monócitos e células T estão envolvidos incluem

distúrbios autoimunes, como psoríase, artrite psoriática, dermatite, esclerodermia sistêmica e esclerose, doença inflamatória intestinal (DII), doença de Crohn, colite ulcerativa, síndrome da angústia respiratória, meningite, encefalite, uveíte, glomerulonefrite, eczema, asma, aterosclerose, deficiência de adesão de leucócitos, esclerose múltipla, síndrome de Raynaud, síndrome de Sjögren, diabetes juvenil, doença de Reiter, doença de Behçet, nefrite por IgA complexa, nefrite por IgA, polineuropatias por IgM, trombocitopenias imunomediadas, como púrpura trombocitopênica idiopática aguda e púrpura trombocitopênica idiopática crônica, anemia hemolítica, miastenia gravis, nefrite lúpica, lúpus eritematoso sistêmico, doença reumatoide, artrite potoemoidea (RA), dermatite reumatoide, artrite potoemoidea (RA) Granulomatose de Wegener, síndrome de Omenn, insuficiência renal crônica, mononucleose infecciosa aguda, esclerose múltipla, HIV e doenças associadas ao vírus do herpes. Outros exemplos são a síndrome da dificuldade respiratória aguda grave e a coreoretinite. Além disso, outras doenças e distúrbios estão incluídos, como aqueles causados por ou mediados por infecção de células B com vírus, como o vírus de Epstein-Barr (EBV).

[00416] Em uma modalidade, o distúrbio envolvendo células que expressam CD38 é a artrite reumatoide.

[00417] Outros exemplos de distúrbios inflamatórios, imunes e/ou autoimunes nos quais autoanticorpos e/ou atividade excessiva de linfócitos B e T são proeminentes e que podem ser tratados de acordo com a presente invenção incluem o seguinte: vasculites e outros distúrbios de vasos, tais como poliangiite microscópica, Síndrome de Churg-Strauss e outras vasculites associadas a ANCA, poliarterite nodosa, vasculite crioglobulinêmica essencial, angiite leucocitoclástica cutânea, doença de Kawasaki, arterite de Takayasu, artrite de células gigantes, púrpura de Henoch-Schönlein, angiite cerebral primária ou isolada, eritema nodoso

oblíquo, púrpura trombocitopênica trombótica (incluindo síndrome hemolíticourêmica) e vasculites secundárias, incluindo vasculite leucocitoclástica cutânea (por exemplo, secundária a hepatite B, hepatite C, macroglobulinemia de Waldenström, neoplasias de células B, artrite reumatoide, síndrome de Sjögren sistêmica); outros exemplos são eritema nodoso, vasculite alérgica, paniculite, doença de Weber-Christian, púrpura hiperglobulinaêmica e doença de Buerger; doenças de pele, como dermatite de contato, dermatose IgA linear, vitiligo, pioderma gangrenoso, epidermólise bolhosa adquirida, pêfigo vulgar (incluindo penfigoide cicatricial e penfigoide bolhoso), alopecia areata (incluindo alopecia universal e alopecia totalis), dermatite herpetiforme e multiforme urticária autoimune crônica (incluindo edema angioneurótico e vasculite urticariforme); citopenias imunomediadas, como neutropenia autoimune e aplasia pura de glóbulos vermelhos; doenças do tecido conjuntivo, como lúpus do SNC, lúpus eritematoso discoide, síndrome CREST, doença mista do tecido conjuntivo, polimiosite/dermatomiosite, miosite de corpos de inclusão, amiloidose secundária, crioglobulinemia tipo I e tipo II, fibromialgia, síndrome do anticorpo fosfolípido, hemofilia secundária, policondrite recorrente, sarcoidose, síndrome do homem rígido e febre reumática; um outro exemplo é a fascite por eosinófilos; artrites, como espondilite anquilosante, artrite crônica juvenil, doença de Still do adulto e síndrome SAPHO; outros exemplos são sacroileite, artrite reativa, doença de Still e gota; distúrbios hematológicos, tais como anemia aplástica, anemia hemolítica primária (incluindo síndrome da aglutinina fria), anemia hemolítica secundária a CLL ou lúpus eritematoso sistêmico; Síndrome POEMS, anemia perniciosa e púrpura hiperglobulinaêmica de Waldenström; outros exemplos são agranulocitose, neutropenia autoimune, doença de Franklin, doença de Seligmann, doença da cadeia pesada gama, síndrome paraneoplásica secundária a timoma e linfomas, uma síndrome paraneoplásica secundária a

timoma e linfomas e formação de inibidor do fator VIII; endocrinopatias, como polendocrinopatia e doença de Addison; outros exemplos são hipoglicemia autoimune, hipotireoidismo autoimune, síndrome de insulina autoimune, tireoidite de Quervain e resistência à insulina mediada por anticorpo receptor de insulina; distúrbios hepato-gastrointestinais, como doença celíaca, doença de Whipple, cirrose biliar primária, hepatite crônica ativa e colangiite esclerosante primária; um outro exemplo é a gastrite autoimune; nefropatias, tais como glomerulonefrite progressiva rápida, nefrite pós-estreptocócica, síndrome de Goodpasture, glomerulonefrite membranosa e nefrite crioglobulinêmica; um outro exemplo é a doença de alteração mínima; distúrbios neurológicos, como neuropatias autoimunes, mononeurite múltipla, síndrome miastênica de Lambert-Eaton, coreia de Sydenham, tabes dorsalis e síndrome de Guillain-Barré; outros exemplos são mielopatia/paraparesia espástica tropical, miastenia gravis, polineuropatia desmielinizante inflamatória aguda e polineuropatia desmielinizante inflamatória crônica; esclerose múltipla; doenças cardíacas e pulmonares, como DPOC, alveolite fibrosante, bronquiolite obliterante, aspergilose alérgica, fibrose cística, síndrome de Löffler, miocardite e pericardite; outros exemplos são pneumonite de hipersensibilidade e síndrome paraneoplásica secundária a câncer de pulmão; distúrbios alérgicos, como asma brônquica e síndrome de hiper-IgE; um outro exemplo é amaurose fugax; distúrbios oftalmológicos, como coriorretinite idiopática; doenças infecciosas, como infecção por parvovírus B (incluindo síndrome de mãos e meias); distúrbios ginecológicos-obstréticos, como aborto recorrente, perda fetal recorrente e retardo de crescimento intrauterino; um outro exemplo é a síndrome paraneoplásica secundária a neoplasias ginecológicas; distúrbios reprodutivos masculinos, como síndrome paraneoplásica secundária a neoplasias testiculares; e distúrbios derivados de transplante, tais como rejeição de aloenxerto e xenoenxerto, e doença de enxerto contra hospedeiro.

[00418] Em uma modalidade, a doença ou distúrbio é a artrite reumatoide.

Regimes de dosagem e combinações

[00419] Os regimes de dosagem nos métodos de tratamento e utilizações acima são ajustados para prover a resposta ideal desejada (por exemplo, uma resposta terapêutica). Por exemplo, um único bolus pode ser administrado, várias doses divididas podem ser administradas ao longo do tempo ou a dose pode ser proporcionalmente reduzida ou aumentada conforme indicado pelas exigências da situação terapêutica. As composições parentéricas podem ser formuladas na forma de dosagem unitária para facilidade de administração e uniformidade de dosagem.

[00420] As dosagens eficientes e os regimes de dosagem para as variantes de anticorpos dependem da doença ou condição a ser tratada e podem ser determinados pelos versados na técnica. Um exemplo de intervalo não limitativo para uma quantidade terapeuticamente eficaz de uma variante de anticorpo da presente invenção é de cerca de 0,001-30 mg/kg.

[00421] Uma variante de anticorpo também pode ser administrada profilaticamente a fim de reduzir o risco de desenvolver câncer, atrasar o início da ocorrência de um evento na progressão do câncer e/ou reduzir o risco de recorrência quando um câncer está em remissão.

[00422] Uma variante de anticorpo também pode ser administrada em uma terapia de combinação, isto é, combinada com outros agentes terapêuticos ou modalidades terapêuticas relevantes para a doença ou condição a ser tratada.

[00423] Consequentemente, em uma modalidade, a variante de anticorpo é para combinação com um ou mais agentes terapêuticos adicionais, como um agente quimioterapêutico, um agente anti-inflamatório ou um agente imunossupressor e/ou imunomodulador, por exemplo, outro anticorpo terapêutico. Essa administração combinada pode ser simultânea, separada ou

sequencial. Para administração simultânea, os agentes podem ser administrados como uma composição ou como composições separadas, conforme apropriado.

[00424] A variante de anticorpo também pode ser usada em combinação com radioterapia e/ou cirurgia e/ou células-tronco periféricas autólogas ou alogênicas ou transplante de medula óssea.

Aplicativos de diagnóstico

[00425] Em outros aspectos, composições de diagnóstico e usos que compreendem a variante de anticorpo de acordo com qualquer aspecto ou modalidade também são contemplados, por exemplo, para doenças envolvendo células que expressam CD38, como exemplificado acima. A variante de anticorpo pode, por exemplo, ser marcada com um agente radioativo (como descrito em outro lugar aqui) ou um agente rádio-opaco. Em uma modalidade, a composição de diagnóstico é um diagnóstico complementar que é usado para rastrear e selecionar aqueles pacientes que se beneficiarão do tratamento com a variante de anticorpo.

[00426] Em uma modalidade, a presente invenção se refere ao uso de uma variante de anticorpo, composição ou kit de peças de acordo com qualquer aspecto ou modalidade aqui para uso em um método de diagnóstico.

[00427] Em uma modalidade, a presente invenção se refere a um método de diagnóstico que compreende a administração de um polipeptídeo, anticorpo, uma composição ou um kit de peças de acordo com qualquer aspecto ou modalidade aqui a pelo menos uma parte do corpo de um humano ou outro mamífero.

[00428] Em outra modalidade, a presente invenção se refere ao uso de uma variante de anticorpo, composição ou kit de peças de acordo com qualquer um dos aspectos ou modalidades aqui na imagem de pelo menos uma parte do corpo de um humano ou outro mamífero.

[00429] Em outra modalidade, a presente invenção se refere a um

método para formação de imagem de pelo menos uma parte do corpo de um humano ou outro mamífero, que compreende a administração de uma variante, uma composição ou um kit de peças de acordo com qualquer aspecto ou modalidades aqui descritas.

Tabela 1 - Sequências de aminoácidos e ácidos nucleicos

| SEQ ID NO: | DESIGNAÇÃO | SEQUÊNCIA |
|------------|-----------------------|---|
| 1 | VH-3003-C | QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCAKF GGTFSSYA IS WVRQAPGQGLEWMGR IIRFLGIAN YAQKFQGRV TLADKSTNTAYMELSSLRSEDTAVYYC AGEPGER DPDAVDI WGQGTMTVTVSS |
| 2 | VH-3003-C_CDR1 | GGTFSSYA |
| 3 | VH-3003-C_CDR2 | IIRFLGIA |
| 4 | VH-3003-C_CDR3 | AGEPGERDPDAVDI |
| 5 | VL(Kappa)-3003-C | DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRAS QGIRSW LAW YQQKPEKAPKSLIYA AASSLQSGVPSRFS SGSGTDF TLTISSLQPEDFATYYC QQYNSYPLT FGGGTKVEIK |
| 6 | VL(Kappa)-3003-C_CDR1 | QGIRSW |
| | VL(Kappa)-3003-C_CDR2 | AAS |
| 7 | VL(Kappa)-3003-C_CDR3 | QQYNSYPLT |
| 8 | VH-3003-B | EVQLLESGLLVQPGGSLRLSCAVS GFTFNSF AMS WVRQAPGKGLEWVSA ISGSGGGT YYADSVKGRF TISRDNSTNTLYLQMNSLRSEDTAVYFC AKDKIL WFGEFVFDY WGQGTMTVTVSS |
| 9 | VL(Kappa)-3003-B | EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRAS QSVSSY LAWY QQKPGQAPRLIY DASN RATGIPARFSGSGSGTDF LTISLLEPEDFAVYYC QORSNWPPT FGQGTVEIK |
| 10 | VH-3003-A | QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCAKS GGTFSSYA F SWVRQAPGQGLEWMGR VIPFLGIAN SAQKFQGR VTITADKSTNTAYMDLSSLRSEDTAVYYC ARDLIA ALGPFDY WGQGTMTVTVSS |
| 11 | VL(Kappa)-3003-A | DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRAS QGISSW LAW YQQKPEKAPKSLIYA AASSLQSGVPSRFS SGSGTDF TLTISSLQPEDFATYYC QQYNSYPRT FGQGTVEI K |
| 12 | VH-gp120-b12 | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCQAS GYRFSNF VI HWVRQAPGQRFQWMGW INPYNGN KEFSAKFQDR VTFTADTSANTAYMELRSLRSADTAVYYC ARVGP YSWDDSPQDNYYMDV WGKGTTVIVSS |
| 13 | VH-gp120-b12_CDR1 | GYRFSNFV |
| 14 | VH-gp120-b12_CDR2 | INPYNGNK |
| 15 | VH-gp120-b12_CDR3 | ARVGYPYSWDDSPQDNYYMDV |
| 16 | VL-gp120-b12 | EIVLTQSPGTLSLSPGERATFSCRSS HSIRSRR VAW YQHKGQAPRLVIH GVS NRASGISDRFSGSGSGTD FTLTITRVEPEDFALYYC QVYGASSY TFGQGTKLE RK |
| 17 | VL-gp120-b12_CDR1 | HSIRSRR |
| | VL-gp120-b12_CDR2 | GVS |
| 18 | VL-gp120-b12_CDR3 | QVYGASSYT |

| | | |
|----|---|---|
| 19 | IgG1m(za) de HC humana de região constante (Entrada Uniprot P01857) | ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK <u>K</u> VEPKSCDKT HTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPSR <u>DEL</u> TKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEA LHNHYTQKSLSLSPGK |
| 20 | IgG1m(f) de HC humana de região constante | ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSCDKT HTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPSR <u>DEL</u> TKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEA LHNHYTQKSLSLSPGK |
| 21 | IgG1m(z) de HC humana de região constante | ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK <u>K</u> VEPKSCDKT HTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPSR <u>DEL</u> TKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEA LHNHYTQKSLSLSPGK |
| 22 | IgG1m(a) de HC humana de região constante | ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSCDKT HTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPSR <u>DEL</u> TKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEA LHNHYTQKSLSLSPGK |
| 23 | IgG1m(x) de HC humana de região constante | ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSCDKT HTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPSR <u>DEL</u> TKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHE <u>G</u> LHNHYTQKSLSLSPGK |
| 24 | IgG1m(f)-E430G de HC humana de região constante | ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSCDKT HTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPSR <u>DEL</u> TKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMH <u>G</u> A LHNHYTQKSLSLSPGK |

| | | |
|----|---|--|
| 25 | IgG1m(f)-E430S de HC humana de região constante | ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKT HTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPSREEMTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHSA LHNHYTQKSLSLSPGK |
| 26 | IgG1m(f)-E430F de HC humana de região constante | ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKT HTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPSREEMTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHFA LHNHYTQKSLSLSPGK |
| 27 | IgG1m(f)-E430T de HC humana de região constante | ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKT HTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPSREEMTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHTA LHNHYTQKSLSLSPGK |
| 28 | IgG1m(f)-E345K de HC humana de região constante | ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKT HTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPRKPQVYTLPPSREEMTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEA LHNHYTQKSLSLSPGK |
| 29 | IgG1m(f)-E345Q de HC humana de região constante | ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKT HTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPRQPQVYTLPPSREEMTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEA LHNHYTQKSLSLSPGK |
| 30 | IgG1m(f)-E345R de HC humana de região constante | ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKT HTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPRRPQVYTLPPSREEMTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEA LHNHYTQKSLSLSPGK |

| | | |
|----|---|--|
| 31 | IgG1m(f)-E345Y de HC humana de região constante | ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKT HTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPRYPQVYTLPPSREEMTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEA LHNHYTQKSLSLSPGK |
| 32 | IgG1m(f)-S440W de HC humana de região constante | ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKT HTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEA LHNHYTQKWLSLSPGK |
| 33 | IgG1m(f)-S440Y de HC humana de região constante | ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKT HTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEA LHNHYTQKYLSPGK |
| 34 | HC humana de região constante IgG2 (Entrada Uniprot P01859) | ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV PSSNFGTQTYTCNVNHHKPSNTKVDKTVKCCVE CPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ FNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLP APIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHN HYTQKSLSLSPGK |
| 35 | HC humana de região constante IgG3 (Entrada Uniprot P01860) | ASTKGPSVFPLAPCSRSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV PSSSLGTQTYTCNVNHHKPSNTKVDKRVELKTPGDT THTCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPR CPEPKSCDTPPPCPRCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTFRVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPS REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESSGQPN NYNTTPPMLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNIFS CSVMHEALHNRTQKSLSLSPGK |
| 36 | IgG4 de HC humana de de região constante (Entrada Uniprot P01861) | ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV PSSSLGTQTYTCNVNHHKPSNTKVDKRVESKYGPPC PSCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQF NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPS SIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD GSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFCFSVMHEALHNH YTQKSLSLSLGK |

| | | |
|----|--|--|
| 37 | LC Kappa humano de região constante | RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPRE AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSS TLTSLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRG EC |
| 38 | CD38 Humano (Entrada Uniprot P28907) | MANCEFSPVSGDKPCCRLSRRAQLCLGVSLVLILV VVLAVVVPWRWQQWSPGTTKRFETVLARCVK YTEIHPEMRHVDCQSVWDAFKGAFISKHPCNITEE DYQPLMKLGTQTVPCNKILLWSRIKDLAQFTQV QRDMFTLEDTLGYLADDLTWCGEFNTSKINYQS CPDWRKDCSNNPVSVFWKTVSRRFAEAACDVVH VMLNGSRSKIFDKNSTFGSVEVHNLQPEKVQTLEA WVIHGGREDSRDLCQDPTIKELESISKRNQFSCKN IYRPDKFLQCVKNPEDSSCTSEI |
| 39 | hisCD38 | HHHHHHRWRQTWSGPGTTKRFETVLARCVKYTE IHPEMRHVDCQSVWDAFKGAFISKHPCNITEEDYQ PLMKLGTQTVPCNKILLWSRIKDLAQFTQVQRD MFTLEDTLGYLADDLTWCGEFNTSKINYQSCPD WRKDCSNNPVSVFWKTVSRRFAEAACDVVHVML NGSRSKIFDKNSTFGSVEVHNLQPEKVQTLEAWVI HGGREDSRDLCQDPTIKELESISKRNQFSCKNYR PDKFLQCVKNPEDSSCTSEI |
| 40 | Variantes de CDR1 de VH | GGTFX ₁ SYA, em que X ₁ é S ou R |
| 41 | Variantes de CDR2 de VH | IIX ₁ FLGX ₂ X ₃ , em que X ₁ é R ou V; X ₂ é I ou K; e X ₃ é A, T ou V, tal como A ou T |
| 42 | Variantes de CDR3 de VH | X ₁ GEPGX ₂ RDPDAX ₃ DI, em que X ₁ é A ou T; X ₂ is E, D ou A, tal como E ou D; e X ₃ é V ou F |
| 43 | CDR1 de VL | QGIRSW |
| | CDR2 de VL | AAS |
| 44 | Variantes de CDR3 de VL | QQYNX ₁ YPLT, em que X ₁ é S ou N |
| 45 | IgG1m(f) de HC humana de região constante sem Lys (K) na posição 447 de acordo com a numeração da UE | ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKT HTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPV LDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEA LHNHYTQKSLSLSPG |
| 46 | HC humana de região constante IgG1m(f)-E430G, sem Lys (K) na posição 447 de acordo com a numeração da UE | ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKT HTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPV LDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHGA LHNHYTQKSLSLSPG |

EXEMPLOS

[00430] A presente invenção é ainda ilustrada pelos seguintes exemplos que não devem ser interpretados como limitativos.

Exemplo 1 - Anticorpos e linhas de célula

Construções de expressão de anticorpo

[00431] Para a expressão de anticorpos humanos e humanizados aqui

utilizados, sequências de cadeia pesada variável (VH) e cadeia leve variável (VL) foram preparadas por síntese de genes (*GeneArt Gene Synthesis; ThermoFisher Scientific*) e clonadas em vetores de expressão pcDNA3.3 (*ThermoFisher Scientific*) contendo uma região constante de uma cadeia pesada (HC) de IgG humana (região constante de IgG1m humana (f) HC: SEQ ID NO: 20) e/ou a região constante da cadeia leve kappa humana (LC): SEQ ID NO: 37. As mutações desejadas foram introduzidas por síntese de genes. As variantes de anticorpo CD38 neste pedido têm sequências VH e VL derivadas de anticorpos CD38 IgG1-A previamente descritos (WO 2006/099875 A1, WO 2008/037257 A2, WO 2011/154453 A1; VH: SEQ ID NO: 10; VL: SEQ ID NO: 11), IgG1-B (WO 2006/099875 A1, WO 2008/037257 A2, WO 2011/154453 A1; VH: SEQ ID NO: 8; VL: SEQ ID NO: 9) e IgG1-C (WO 2011/154453 A1; VH: SEQ ID NO: 1; VL: SEQ ID NO: 5). O anticorpo IgG1 humano b12, um anticorpo específico de gp120 de HIV foi usado como controle negativo em alguns experimentos (*Barbas et al., J Mol Biol. 5 de abril de 1993; 230 (3): 812-23; VH: SEQ ID NO: 12; VL: SEQ ID NO: 16*).

Construções de anticorpos de expressão transitória

[00432] Misturas de DNA de plasmídeo que codificam cadeias pesadas e leves de anticorpos foram transitoriamente transfectadas em células Expi293F (Gibco, Cat No A14635) usando 293fectin (Life Technologies) essencialmente como descrito por Vink *et al.* (Vink *et al.*, 2014 Methods 65 (1): 5-10). As concentrações de anticorpos nos sobrenadantes foram medidas por absorbância a 280 nm. Os sobrenadantes contendo anticorpos foram usados diretamente em ensaios *in vitro*, ou os anticorpos foram purificados como descrito abaixo.

Purificação de anticorpos e avaliação de qualidade

[00433] Os anticorpos foram purificados por cromatografia de afinidade em Proteína A. Os sobrenadantes da cultura foram filtrados em um

filtro de extremidade morta de 0,20 μ M e carregados em colunas MabSelect SuRe de 5 mL (GE Healthcare), lavados e eluídos com citrato de sódio 0,02 M-NaOH, pH 3. Os eluatos foram carregados em uma coluna de dessalinização HiPrep (GE Healthcare) imediatamente após a purificação e os anticorpos foram trocados de tampão por tampão NaH_2PO_4 12,6 mM, NaCl 140 mM, pH 7,4 (B.Braun ou Thermo Fisher). Após a troca do tampão, as amostras foram esterilizadas por filtração em filtros sem saída de 0,2 μ m. As proteínas purificadas foram analisadas por uma série de ensaios bioanalíticos, incluindo eletroforese capilar em géis de dodecilsulfato-poliacrilamida de sódio (CE-SDS) e cromatografia de exclusão de tamanho de alto desempenho (HP-SEC). A concentração foi medida pela absorbância a 280 nm. Os anticorpos purificados foram armazenados a 2-8°C.

[00434] As linhas de célula utilizadas nos Exemplos são descritas na Tabela 2 abaixo. O número médio de moléculas de CD38 e CD59 por célula foi determinado por citometria de fluxo quantitativa (Qifi, DAKO).

Tabela 2: Visão geral das linhas de célula e expressão de CD38 e CD59

| Linha de célula | Tipo de tumor | Catálogo | Fornecedor | ABCs estimados | |
|-----------------|---------------|----------|------------------------|----------------|-------------|
| | | | | CD38 | CD59 |
| SU-DHL-8 | DLBCL | ACC 573 | DSMZ | 415000 | 31.000 |
| Oci-Ly-7 | DLBCL | ACC 688 | DSMZ | 310000 | 81000 |
| Oci-Ly-19 | DLBCL | ACC 528 | DSMZ | 271000 | 28000 |
| Ramos | Burkitt | CRL-1596 | ATCC | 260000 | 7000 |
| Daudi | Burkitt | CCL-213 | ATCC | 200000 | 0 |
| Oci-Ly18 | DLBCL | ACC 699 | DSMZ | 181000 | 40.000 |
| Raji | Burkitt | CCL-86 | ATCC | 170000 | 55000 |
| DOHH2 | FL | ACC 47 | DSMZ | 167000 | 66000 |
| SU-DHL-4 | DLBCL | ACC 495 | DSMZ | 158000 | 147000 |
| WSU-DLCL2 | DLBCL | ACC 575 | DSMZ | 150000 | 96000 |
| Z-138 | MCL | CRL-3001 | ATCC | 133000 | 53000 |
| JVM-13 | MCL | CRL-3003 | ATCC | 130000 | 254000 |
| REH | B-ALL | ACC 22 | DSMZ | 130000 | não testado |
| Jeko-1 | MCL | ACC 553 | DSMZ | 108000 | 31.000 |
| Wien133 | Burkitt | - | BioAnaLab, Reino Unido | 100000 | 0 |
| 697 | B-ALL | ACC 42 | DSMZ | 98000 | 130000 |
| Granta-519 | MCL | ACC 342 | DSMZ | 90000 | 140000 |
| RS4 ; 11 | B-ALL | ACC 508 | DSMZ | 80- 86000 | não testado |
| DB | DLBCL | ACC 539 | DSMZ | 70000 | 200000 |
| NALM-16 | B-ALL | ACC 680 | DSMZ | 50000 | não testado |
| JVM-3 | CLL | ACC 18 | DSMZ | 30000 | não testado |
| U266 | MILÍMETROS | ACC 9 | DSMZ | 15000 | não testado |
| RC-K8 | DLBCL | ACC 561 | DSMZ | 10.000 | não testado |

| | | | | | |
|----------|-------|------------|------|--------|-------------|
| Pfeiffer | DLBCL | CRL-2632 | ATCC | 0 | 100000 |
| THP-1 | AML | ACC 16 | DSMZ | 400000 | 40.000 |
| Oci-AML3 | AML | ACC 582 | DSMZ | 200000 | 40.000 |
| monomac6 | AML | ACC 124 | DSMZ | 200000 | 30000 |
| KG-1 | AML | CCL-246 | ATCC | 180000 | 100000 |
| ML-2 | AML | ACC 15 | DSMZ | 150000 | 10.000 |
| U937 | AML | CRL-1593.2 | ATCC | 130000 | não testado |
| Nomo-1 | AML | ACC 542 | DSMZ | 110000 | 30000 |
| MEGAL | AML | ACC 719 | DSMZ | 100000 | 110000 |
| AML-193 | AML | ACC 549 | DSMZ | 100000 | não testado |
| MOLM-13 | AML | ACC 554 | DSMZ | 90000 | 10.000 |
| HL-60 | AML | CLL-240 | ATCC | 90000 | 10.000 |
| Oci-M1 | AML | ACC 529 | DSMZ | 0 | 200000 |

ABCs = Anticorpos Ligados por Célula

[00435] As origens / fontes das linhas de célula são as seguintes:

| Linha de célula: | Fonte: |
|------------------|--------------------------------|
| Daudi | ATCC; CCL-213 |
| Ramos | ATCC; CRL-1596 |
| Wien-133 | BioAnaLab, Oxford, Reino Unido |
| NALM-16 | DSMZ; ACC 680 |
| U266 | ATCC; TIB-196 |
| RC-K8 | DSMZ; ACC 561 |

Exemplo 2 - Ligação de anticorpos CD38 e variantes dos mesmos a CD38 humana e cynomolgus expresso na superfície celular

[00436] A ligação aa CD38 expresso na superfície celular em células Daudi e NALM16 e PBMCs de macacos *cynomolgus* foi determinada por citometria de fluxo. As células, ressuspensas em RPMI contendo 0,2% de BSA, foram semeadas a 100,000 células/poço em placas de fundo redondo de 96 poços de poliestireno (Greiner bio-one) e centrifugadas por 3 minutos a 300xg, 4°C. Diluições em série (concentração final de anticorpo de 0,005-10 µg/mL em diluições em série 3x) de CD38 ou anticorpos de controle foram adicionadas e as células foram incubadas por 30 minutos a 4°C. As placas foram lavadas/centrifugadas duas vezes usando tampão FACS (PBS/0,1% BSA/0,01% Na-Azida). Em seguida, as células foram incubadas por 30 minutos a 4°C com IgG F (ab') 2 (Jackson) de cabra conjugado com R-ficoeritrina (PE) diluído 1/100 em PBS/0,1% BSA/0,01% Na-Azida ou IgG anti-humano de cabra conjugado com FITC (Southern Biotech) para análise de PBMCs de *cynomolgus*. As células foram lavadas/centrifugadas duas vezes usando tampão FACS, ressuspensas em tampão FACS e analisadas

determinando intensidades fluorescentes médias usando um FACS_Fortessa (BD). As curvas de ligação foram geradas usando análises de regressão não linear (dose-resposta sigmoidal com inclinação variável) no software GraphPad Prism V6.04 (GraphPad Software).

[00437] A **Figura 2** mostra que os anticorpos CD38 IgG1-B, IgG1-C e IgG1-A se ligam de forma dependente da dose a células NALM16 que expressam CD38. A introdução da mutação em E430G que aumenta a hexamerização nestes anticorpos não afetou a ligação.

[00438] A **Figura 3** mostra que o anticorpo CD38 IgG1-A-E430G, mas não IgG1-B-E430G e IgG1-C-E430G, se liga de forma dependente da dose aa CD38 expresso em PBMCs (A) de *cynomolgus*. A ligação média a CD38 expressa em células *cynomolgus* B, T e NK é representada, delimitada com base em FSC e SSC. Como um controle positivo, a ligação a células Daudi que expressam um alto número de cópias de CD38 humana também está representada (B).

Exemplo 3 - Citotoxicidade dependente de complemento (CDC) por anticorpos CD38 mutados em E430G

CDC em linhas de células tumorais

[00439] As células Daudi, Wien133, Ramos, NALM16, U266 e RC-K8 foram ressuspensas em RPMI contendo BSA a 0,2% e plaqueadas em placas de poliestireno de fundo redondo de 96 poços (Greiner bio-one) a uma densidade de 1×10^5 células/poço (40 μ L /bem). Anticorpos CD38, suas variantes e Abs de controle de isótipo foram diluídos em série (concentração final de anticorpo de 0,0002-10 μ g/mL em diluições em série 3x) e 40 μ L de Ab diluído foram adicionados por poço. As células e o Ab foram pré-incubados durante 20 minutos à temperatura ambiente após os quais, 20 μ L de soro humano normal reunido (Sanquin) foram adicionados a cada poço e incubados durante outros 45 minutos a 37°C. Em seguida, as placas foram centrifugadas (3 minutos, 1200 rpm) e o sobrenadante foi descartado. Os

sedimentos celulares foram ressuspensos em tampão FACS suplementado com 0,25 μ M de iodeto de topro-3 (tecnologias Life) e a lise foi detectada medindo a porcentagem de células topro-3 positivas para iodo em um FACS_Fortessa (BD). CDC foi descrito como porcentagem de lise. Os dados apresentados são N = 3 (Daudi e NALM16), N = 2 (células Wien133 e U266) ou N = 1 (RC-K8 e Ramos). Os anticorpos de controle de isótipo foram incluídos apenas em células Daudi e Wien133.

[00440] A **Figura 4** demonstra que os anticorpos CD38 B, C e A sem a mutação em E430G induzem ~ 85, ~ 50 e 0 por cento de lise das células Ramos e Daudi. Nenhuma lise significativa por estes anticorpos CD38 foi observada para qualquer uma das outras linhas de célula testadas. A introdução de uma mutação em E430G nestes anticorpos CD38 resultou em maior atividade de CDC com concentração de anticorpo significativamente mais baixa. Todos os 3 anticorpos com a mutação em E430G induziram até 100% de lise das células Ramos e Daudi. Além disso, em linhas de célula com expressão de CD38 mais baixa, os anticorpos CD38 mutados em E430G foram capazes de induzir CDC máximo (Wien133) ou parcial (NALM16 e U266), enquanto os anticorpos CD38 sem mutação em E430G não induziram CDC. Estes resultados demonstram que CD38 Abs com uma mutação em E430G induz um CDC mais forte e requer menos expressão de CD38 em comparação com os anticorpos CD38 sem mutação em E430G. Em células tumorais com níveis de expressão de CD38 mais baixos (NALM-16, RS4; 11 e REH), IgG1-C-E430G apresentou valores de EC50 mais baixos em comparação com IgG1-B-E430G.

Tabela 3 - Valores EC50 de lise.

Algumas linhagens celulares foram testadas apenas uma vez (Ramos, RS4; 11, REH)

| | Ramos | Daudi | Wien-133 | NALM-16 | U266 | RS4; 11 | REH |
|---------|-------|-------|----------|---------|-------|---------|-------|
| B | 0,126 | 0,183 | 0,199 | - | - | - | - |
| B-E430G | 0,019 | 0,018 | 0,013 | 0,075 | - | 0,243 | 0,054 |
| C | 0,158 | 0,250 | 0,193 | - | - | - | - |
| C-E430G | 0,014 | 0,019 | 0,015 | 0,022 | 0,052 | 0,056 | 0,017 |

| | | | | | | | |
|---------|-------|-------|-------|---|---|---|---|
| UMA | - | - | - | - | - | - | - |
| A-E430G | 0,133 | 0,206 | 0,271 | - | - | - | - |

[00441] O ensaio de CDC descrito acima foi repetido com uma série de outras linhas de células tumorais derivadas de tumores de células B, incluindo DLBCL, linfoma de Burkitt, FL, MCL, B-ALL, CLL ou MM, e os anticorpos IgG1-B, IgG1-B-E430G, IgG1-C-E430G, IgG1-A-E430G e anticorpo de controle de isótipo. A porcentagem de lise foi plotada contra a concentração de anticorpo e a porcentagem máxima de lise e os valores de EC50 foram calculados usando o software Graphpad Prism (GraphPad Software, Inc; versão 8.1.0) e mostrado na Tabela 4. Os resultados também são mostrados na Figura 14.

[00442] A **Figura 14** demonstra que o mAb IgG1-B de CD38 de tipo selvagem induziu a lise de linhas de célula que expressam CD38 elevado; SU-DHL-8, Oci-Ly-7, Oci-Ly-19, Ramos, Daudi, Oci-Ly-18 e Raji, mas não para nenhuma das outras linhagens celulares que expressam menos moléculas de CD38 na membrana. A introdução de uma mutação em E430G em IgG1-B resultou em maior atividade de CDC com concentração de Ab significativamente mais baixa em linhas de células que já eram sensíveis a IgG1-B de tipo selvagem e resultou na lise de linhas de células adicionais com menor número de cópias de CD38 que eram insensíveis a CDC induzido por IgG1-B (por exemplo: DOHH2, SU-DHL-4, WSU-DLCL2, Z-138, JVM-13, REH, Jeko-1, Wien-133, 697, RS4; 11, NALM-16 e JVM-3) Algumas linhagens celulares com expressão de CD38 muito baixa (RC-K8 e Pfeiffer) ou expressão de CD59 muito alta (DB e Granta-519) não mostraram lise após exposição a IgG1-B e IgG1-B-E430G. Em virtualmente todas as linhas de célula testadas, IgG1-C-E430G induziu lise celular em uma concentração de anticorpo mais baixa em comparação com IgG1-B-E430G, enquanto IgG1-A-E430G induziu lise em concentrações muito mais altas de Ab. Isso também é refletido pelos valores mais elevados de EC50 para IgG1-A-E430G na Tabela 4. Isso demonstra que os mAbs CD38 mutados E430G induzem CDC mais

forte em comparação com anticorpos CD38 do tipo selvagem e induzem CDC em células tumorais com níveis de expressão de CD38 mais baixos, nos quais os anticorpos do tipo CD38 não induzem CDC. Além disso, a potência de anticorpos CD38 mutados em E430G para induzir CDC pode variar entre diferentes clones de anticorpos direcionados a CD38.

[00443] A **Figura 15** mostra um resumo de alguns dos valores de EC50 descritos na Tabela 4. Os valores de EC50 de CDC induzidos por anticorpos IgG1-B, IgG1-B-E430G e IgG1-C-E430G em 20 linhas de células tumorais de células B diferentes são mostrados. Cada quadrado, triângulo ou círculo representa uma linha de células tumorais de células B. Os valores de EC50 obtidos com linhas de células AML não foram incluídos porque IgG1-B-E430G não foi testado em linhas de célula de AML.

[00444] O CDC por IgG1-C-E430G também foi avaliado em uma seleção de linhas de células de Leucemia Mieloide Aguda (AML) (Figura 16). Foi realizado como descrito acima para as linhas de células tumorais de células B com a única diferença sendo a (s) linha (s) de células tumorais.

[00445] A **Figura 16** demonstra que o CDC foi induzido por IgG1-C-E430G em todas as linhas de células AML que expressam CD38, enquanto nenhum CDC foi observado em linhas de células AML CD38 negativas. O CDC por IgG1-C-E430G ocorreu em um valor de EC50 muito menor em comparação com IgG1-B, enquanto a lise celular máxima foi maior para IgG1-C-E430G em comparação com IgG1-B (Tabela 4).

Tabela 4 - Lise máxima e valores de EC50 de lise

| Linha de célula | IgG1-C-E430G | | | IgG1-B | | | IgG1-B-E430G | | | N |
|-----------------|---------------|----------------|----------------|---------------|----------------|----------------|---------------|----------------|----------------|---|
| | Ug/mL de EC50 | % máx. de lise | % mín. de lise | Ug/mL de EC50 | % máx. de lise | % mín. de lise | Ug/mL de EC50 | % máx. de lise | % mín. de lise | |
| SU-DHL-8 | 0,009 | 100,0 | 35,4 | 0,040 | 99,8 | 22,8 | 0,009 | 100,0 | 31,0 | 3 |
| Oci-Ly-7 | 0,012 | 99,2 | 21,0 | 0,138 | 91,7 | 18,1 | 0,027 | 98,9 | 19,4 | 3 |
| Oci-Ly-19 | 0,031 | 100,0 | 23,4 | 0,091 | 98,8 | 24,6 | 0,032 | 100,0 | 27,4 | 3 |
| Ramos | 0,013 | 99,5 | 25,0 | 0,108 | 94,0 | 17,1 | 0,020 | 99,3 | 19,4 | 3 |
| Daudi | 0,030 | 96,5 | 17,9 | 0,307 | 89,5 | 11,3 | 0,026 | 96,7 | 19,1 | 4 |
| Oci-Ly18 | 0,057 | 92,5 | 24,5 | 0,212 | 83,3 | 17,3 | 0,088 | 92,3 | 18,8 | 3 |
| Raji | 0,036 | 83,8 | 18,4 | 0,171 | 65,8 | 18,6 | 0,088 | 87,1 | 17,8 | 4 |
| DOHH2 | 0,115 | 50,3 | 19,2 | 0,874 | 29,4 | 19,4 | 0,399 | 49,7 | 20,9 | 3 |
| SU-DHL-4 | 0,073 | 75,5 | 12,0 | ND | 23,5 | 12,5 | 0,165 | 76,6 | 11,8 | 3 |

| | | | | | | | | | | |
|------------|-------|------|------|-------|------|------|-------|------|------|---|
| WSU-DLCL2 | 0,345 | 65,9 | 6,3 | ND | 7,8 | 8,3 | 0,577 | 67,6 | 7,7 | 1 |
| Z-138 | 0,106 | 41,2 | 20,6 | 4,327 | 28,1 | 19,5 | 0,190 | 38,0 | 21,2 | 1 |
| JVM-13 | 0,146 | 43,6 | 13,3 | 0,769 | 30,5 | 13,3 | 0,458 | 44,5 | 13,3 | 3 |
| REH | 0,039 | 58,3 | 22,4 | 0,232 | 30,6 | 18,0 | 0,112 | 58,1 | 19,2 | 3 |
| Jeko-1 | 0,108 | 61,6 | 5,5 | 0,833 | 13,2 | 9,3 | 0,302 | 51,5 | 8,1 | 2 |
| Wien133 | 0,015 | 96,0 | 8,2 | 0,199 | 13,2 | 7,0 | 0,013 | 97,4 | 7,9 | 2 |
| 697 | 0,087 | 57,6 | 10,9 | ND | ND | ND | 0,308 | 65,6 | 11,1 | 3 |
| Granta-519 | ND | 17,4 | 13,5 | ND | 15,5 | 77,8 | ND | 16,7 | 13,1 | 3 |
| RS4;11 | 0,093 | 33,9 | 9,8 | ND | 14,1 | 9,9 | 0,328 | 29,9 | 10,1 | 3 |
| DB | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | 1 |
| NALM-16 | 0,022 | 60,9 | 10,1 | 0,193 | 16,2 | 9,4 | 0,075 | 58,6 | 9,7 | 3 |
| JVM-3 | 0,110 | 42,5 | 11,6 | 0,245 | 19,0 | 12,8 | 0,287 | 40,2 | 12,2 | 2 |
| U266 | 0,052 | 32,5 | 9,6 | 3,889 | 19,1 | 10,8 | ND | ND | 8,7 | 2 |
| RC-K8 | ND | ND | 6,6 | ND | 7,7 | ND | ND | 8,2 | 8,6 | 1 |
| Pfeiffer | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | 2 |
| THP-1 | 0,075 | 81,5 | 12,6 | 0,051 | 42,4 | 6,1 | NT | NT | NT | 3 |
| Oci-AML3 | 0,046 | 90,4 | 0,0 | 1,485 | 26,1 | 0,0 | NT | NT | NT | 3 |
| monomac6 | 0,093 | 83,9 | 14,0 | 0,053 | 54,1 | 0,0 | NT | NT | NT | 3 |
| KG-1 | 0,104 | 77,7 | 0,0 | 1,401 | 26,2 | 2,0 | NT | NT | NT | 3 |
| ML-2 | 0,023 | 99,6 | 5,1 | 0,414 | 95,4 | 0,0 | NT | NT | NT | 3 |
| U937 | 0,057 | 68,6 | 0,0 | 0,140 | 34,3 | 0,0 | NT | NT | NT | 2 |
| Nomo-1 | 0,039 | 95,9 | 6,7 | 1,937 | 28,4 | 1,9 | NT | NT | NT | 3 |
| MEGAL | 0,170 | 30,1 | 0,7 | ND | ND | ND | NT | NT | NT | 3 |
| AML-193 | 0,032 | 89,5 | 0,8 | ND | ND | ND | NT | NT | NT | 2 |
| MOLM-13 | 0,017 | 92,0 | 0,0 | 0,290 | 32,5 | 9,8 | NT | NT | NT | 3 |
| HL-60 | 0,070 | 52,5 | 0,0 | 4,519 | 10,2 | 0,0 | NT | NT | NT | 3 |
| Oci-M1 | ND | ND | ND | ND | ND | ND | NT | NT | NT | 1 |

[00446] A indução de CDC por anticorpos CD38 de tipo selvagem e mutados em E430G usando células T reguladoras também foi determinada. As células T reguladoras foram geradas como descrito no Exemplo 8 (Trogocitose de CD38 de células T reguladoras) e testadas em um ensaio de CDC como descrito acima para as linhas de células tumorais. A porcentagem de lise é mostrada na Figura 17 junto com os valores de EC50.

[00447] A **Figura 17** demonstra que IgG1-B não induziu virtualmente nenhuma lise de células T reguladoras; enquanto IgG1-B-E430G e IgG1-C-E430G induziram lise de células T reguladoras, onde IgG1-C-E430G mostrou um valor EC50 inferior em comparação com IgG1-B-E430G.

CDC em sangue total

[00448] O sangue total de um doador saudável foi coletado em tubos de hirudina para prevenir a coagulação sem interferência com os níveis fisiológicos de cálcio (necessários para CDC). 50 µL/poço foram colocados em placas de cultura de tecidos de fundo plano de 96 poços (Greiner bio-one).

Os anticorpos CD38, suas variantes e Abs de controle foram diluídos em série em RPMI contendo BSA a 0,2% (concentração final de anticorpo de 0,016-10 µg/mL em diluições em série 5x) e 50 µL de Ab diluído foram adicionados por poço e incubados durante a noite a 37°C. Como um controle positivo para CDC em células B, o CD20 Ab IgG1-7D8 foi testado com e sem 60 µg/mL de eculizumabe para bloquear CDC. As células foram transferidas para placas de fundo redondo de 96 poços de poliestireno (Greiner bio-one, centrifugado), centrifugadas (3 minutos, 1200 rpm) e lavadas uma vez com 150 µL de PBS (B.Braun) por poço. Os sedimentos celulares foram ressuspensos em 80 µL de PBS com corante de viabilidade reativo com amina diluída 1000x (BD) e incubados 30 minutos a 4°C. Em seguida, as células foram lavadas com 150 µL de PBS e incubadas com 80 µL de PBS contendo um coquetel de anticorpos de fenotipagem de linfócitos (1: 200 de camundongo anti-CD3-EF450 humano [OKT3, ebiosciência], 1:50 de camundongo anti-CD19-BV711 humano [HIB19, Biolegend] e 1: 100 de camundongo anti-CD56-PE/CF594 humano [NCAM16.2, BD]) por 30 minutos a 4°C. As células foram lavadas com 150 µL de PBS e incubadas 10 minutos a 4°C com 150 µL de solução de lise de eritrócitos (10 mM KHCO₃ [Sigma], 0,01 mM EDTA [Fluka], 155 mM NH₄Cl [Sigma] dissolvido em 1 L de H₂O [B. Braun] e ajustado para pH 7,2). As células foram lavadas com 150 µL de tampão FACS, ressuspensas em 100 µL de tampão FACS e analisadas em um FACS_Fortessa (BD). O número de células NK viáveis (CD56pos, CD3neg e viabilidade reativa de amina dyeneg), células T (CD3pos e dyeneg de viabilidade reativa de amina) e células B (CD19pos e dyeneg de viabilidade reativa de amina) é mostrado na Figura 5. Os dados são mostrados a partir de 1 representante doador em 5 testados.

[00449] A Figura 5 demonstra que os anticorpos CD38 contendo a mutação em E430G induzem CDC mínimo de linfócitos sanguíneos saudáveis. O controle positivo CD20 Ab IgG1-7D8 demonstrou CDC

específico de células B CD20-positivas, que foi completamente bloqueado pelo inibidor do CDC eculizumabe. Os anticorpos IgG1 CD38 de tipo selvagem não induziram CDC de células B, T e NK. Algum CDC foi observado para células NK após incubação com clones B e C contendo a mutação em E430G (aproximadamente 40% de lise de células NK na concentração mais alta com IgG1-B-E430G), mas não células B e T.

[00450] No geral, esses resultados indicam que os anticorpos CD38 mutados em E430G têm ampla atividade de CDC contra um painel de linhas de células tumorais com expressão variável de CD38. Os anticorpos CD38 com uma mutação em E430G também foram testados contra linfócitos obtidos de doadores saudáveis e mostraram induzir apenas até 40% de lise de células NK. As células NK expressam em média 15.000 CD38/célula que é semelhante à linha de células MM U266. Ambos os tipos de células são igualmente sensíveis ao CDC por anticorpos CD38 mutados em E430G, indicando que o CDC por anticorpos CD38 mutados em E430G está correlacionado à expressão de CD38. Sem se limitar à teoria, com base nesses dados, acredita-se que o limite para CDC por anticorpos CD38 mutados em E430G está em torno de 15.000 moléculas de CD38/célula. Enquanto a maioria das linhas de células tumorais de células B expressam níveis mais elevados de CD38 variando de 15.000 a 400.000 moléculas de CD38/célula, os linfócitos saudáveis expressam apenas 2.000-15.000 moléculas de CD38/célula, o que torna essas células menos vulneráveis a CDC por anticorpos CD38 mutados em E430G.

Exemplo 4 - Citotoxicidade celular dependente de anticorpos (ADCC) por anticorpos CD38 mutados em E430G

[00451] A capacidade dos anticorpos CD38 mutados em E430G para induzir citotoxicidade celular dependente de anticorpos (ADCC) foi determinada por um ensaio de liberação de cromo. As células Daudi foram coletadas (5×10^6 células/mL) em 2 mL de meio de cultura (RPMI 1640

suplementado com 0,2% de BSA), ao qual foram adicionados 100 μ Ci ^{51}Cr (Chromium - 51; PerkinElmer). As células foram incubadas em banho-maria a 37°C durante 1 hora com agitação. Após lavagem das células (duas vezes em PBS, 1500 rpm, 5 min), as células foram ressuspensas em meio de cultura e contadas por exclusão de azul de tripano. As células foram diluídas para uma densidade de 1×10^5 células/mL e pipetadas em placas de microtitulação de fundo redondo de 96 poços (Greiner Bio-One) e 50 μ L de uma série de concentrações de (0,005-10 μ g/mL de concentrações finais em 3 vezes diluições) CD38 ou anticorpo de controle de isótipo, diluído em meio de cultura foi adicionado. As células foram pré-incubadas com Ab à temperatura ambiente (RT) durante 15 min.

[00452] Nesse ínterim, células mononucleares de sangue periférico (PBMCs) de voluntários saudáveis (Sanquin) foram isoladas de 45 mL de sangue com heparina recém colhido (leucócitos) usando meio de separação de linfócitos (Bio Whittaker) de acordo com as instruções do fabricante. Após a ressuspensão das células em meio de cultura, as células foram contadas por exclusão com azul de tripano e diluídas até uma densidade de 1×10^7 células/mL.

[00453] Após a pré-incubação das células alvo com Ab, 50 μ L de células efetoras foram adicionadas, resultando em uma razão efetor para células alvo de 100: 1. As células foram incubadas durante 4 horas a 37°C e CO₂ a 5%. Para a determinação da lise máxima, 50 μ L de células Daudi marcadas com ^{51}Cr (5.000 células) foram incubadas com 100 μ L de Triton-X100 a 5%; para a determinação de lise espontânea (lise de fundo), 5.000 células Daudi marcadas com ^{51}Cr foram incubadas em 150 μ L de meio sem qualquer anticorpo ou células efetoras. O nível de lise celular independente do anticorpo foi determinado incubando 5.000 células Daudi com 500.000 PBMCs sem anticorpo. As placas foram centrifugadas (1200 rpm, 10 min) e 75 μ L do sobrenadante foram transferidos para tubos micrônicos, após o que

o ^{51}Cr liberado foi contado usando um contador gama. A porcentagem de lise mediada por anticorpos foi calculada da seguinte forma:

$$\% \text{ de lise específica} = (\text{cpm amostra} - \text{cpm de lise espontânea}) / (\text{cpm de lise máxima} - \text{cpm de lise espontânea})$$

em que cpm são contagens por minuto.

[00454] A **Figura 6** mostra que todos os Abs CD38 foram capazes de induzir a lise de Daudi, conforme indicado pela lise aumentada que foi observada para Abs CD38 em comparação com o controle de isótipo (IgG1-b12-E430G). Já na concentração mais baixa de anticorpos, foi observada lise celular, sugerindo que os anticorpos deveriam ter sido diluídos posteriormente a fim de observar um efeito dependente da dose. Os anticorpos CD38 que contêm uma mutação em E430G mostraram lise máxima mais baixa em comparação com os anticorpos do tipo selvagem.

[00455] O ensaio de liberação de cromo acima foi repetido com células mononucleares de sangue periférico de diferentes voluntários saudáveis (células efetoras), as seguintes células alvo: Daudi, Wien-133, Granta 519 e MEC-2, e com os anticorpos IgG1-B-E430G, IgG1 -B, IgG1-C-E430G, IgG1-C e IgG1-b12-E430G. Os resultados são mostrados na Figura 18.

[00456] A **Figura 18** mostra que todos os Abs CD38 foram capazes de induzir a lise das células Daudi, Wien-133, Granta 519 e MEC-2, conforme indicado pela lise aumentada que foi observada para Abs CD38 em comparação com o controle de isótipo (IgG1-b12-E430G). Na maioria dos casos, foi observada lise de células alvo dependente da dose, mas alguma variação foi observada entre diferentes doadores de PBMC.

[00457] A capacidade dos anticorpos CD38 para induzir ADCC foi ainda avaliada usando um bioensaio repórter ADCC luminescente (Promega, Cat # G7018) que detecta a reticulação de do FcγRIIIa (CD16), como um substituto para ADCC. Como células efetoras, o kit fornece células T humanas Jurkat que são projetadas para expressar de forma estável do

FcγRIIIa (V158) e um elemento de resposta ao fator nuclear de células T ativadas (NFAT) que direciona a expressão da luciferase do pirilampo. Resumidamente, células Daudi ou T reguladoras (5.000 células/poço) foram semeadas em Optiplates brancas de 384 poços (Perkin Elmer) em ADCC Assay Buffer [meio RPMI-1640 [(Lonza, Cat # BE12-115F) suplementado com 3,5% de IgG baixa Soro] e incubado por 6 horas a 37°C/5% CO₂ em um volume total de 30 µL contendo séries de concentração de anticorpos (concentrações finais de 0,5-250 ng/mL em diluições de 3,5 vezes) e células efetoras de bioensaio ADCC descongeladas. Depois de ajustar as placas durante 15 minutos à temperatura ambiente (TA), foram adicionados 30 µL de Reagente de Luciferase do Bio Glo Assay e as placas foram incubadas durante 5 minutos à TA. A produção de luciferase foi quantificada por leitura de luminescência em um *EnVision Multilabel Reader* (Perkin Elmer). Os níveis de fundo foram determinados a partir de poços aos quais apenas células alvo e anticorpo (sem células efetoras) foram adicionados. Como controle negativo, poços contendo apenas células alvo e efetoras (sem anticorpo) foram usados.

[00458] A **Figura 7** mostra os resultados obtidos com as células Daudi, que mostram que os anticorpos CD38 foram altamente eficazes na indução da reticulação de do FcγRIIIa dependente da dose, conforme determinado no ensaio repórter. Os anticorpos CD38 que continham uma mutação em E430G mostraram reticulação máxima inferior em comparação com os respectivos anticorpos de tipo selvagem, o que estava de acordo com os resultados obtidos para o ensaio de liberação de cromo.

[00459] A **Figura 19** mostra os resultados obtidos com as células T reguladoras, que mostram que os anticorpos CD38 foram altamente eficazes na indução da reticulação de do FcγRIIIa dependente da dose, conforme determinado no ensaio repórter. Os anticorpos CD38 que continham uma mutação em E430G mostraram reticulação máxima inferior em comparação

com os respectivos anticorpos de tipo selvagem.

Exemplo 5 - Fagocitose celular dependente de anticorpos (ADCP) por anticorpos CD38 mutados em E430G

[00460] A capacidade dos anticorpos CD38 mutados em E430G para induzir fagocitose celular dependente de anticorpos foi adaptada de Overdijk M.B. *et al.* mAbs 7: 2,311-320. Os macrófagos foram obtidos isolando PBMCs de voluntários saudáveis (Sanquin) usando meio de separação de linfócitos (Bio Whittaker) de acordo com as instruções do fabricante. A partir das PBMCs, os monócitos foram isolados por meio de seleção negativa, usando o kit de isolamento Dynabeads Untouched Human Monocyte (Invitrogen). Os monócitos isolados foram cultivados 3 dias em meio de células dendríticas sem soro (CellGenix GmbH) suplementado com 50 ng/mL de GM-CSF (Invitrogen), seguido por 2 dias em meio de células dendríticas sem soro suplementado com 100 ng/mL de GM-CSF, para induzir a diferenciação de macrófagos. Os macrófagos diferenciados foram separados usando verseno (Life Technologies) e raspagem celular e distinguidos por citometria de fluxo para coloração com CD1a-FITC (BD), CD14-PE/Cy7 (BD), CD40-APC/H7 (BD), CD80-APC (Miltenyi biotec), CD83-PE (BD) e CD86-PerCP-Cy5.5 (Biolegend). Os macrófagos foram semeados a 100,000 células por poço em placas de cultura de fundo plano de 96 poços (Greiner bio-one) e deixados aderir durante a noite a 37°C em meio de células dendríticas sem soro suplementado com 100 ng/mL de GM-CSF.

[00461] As células alvo (Daudi) foram marcadas com PKH-26 (Sigma) de acordo com as instruções do fabricante, opsonizadas com 10 µg/mL de anticorpo CD38 (30 minutos a 4°C), lavadas três vezes com tampão FACS e adicionadas aos macrófagos em um efetor: razão alvo (E: T) de 5: 1. A placa foi girada brevemente a 300 rpm para trazer as células efetoras e células alvo em estreita proximidade e incubada 45 minutos a 37°C. Em seguida, os macrófagos foram coletados usando verseno e corados com CD14-BV605

(biolegend) e CD19-BV711 (biolegend). A fagocitose foi descrita como a porcentagem de macrófagos positivos para CD14 que também eram positivos para PKH-26, mas negativos para CD19 (para excluir macrófagos que estão ligados apenas a células de Daudi), medidos em um citômetro de fluxo (BD).

[00462] A Figura 8 mostra que todos os Abs CD38 foram capazes de induzir ADCP de células Daudi, conforme indicado pelo aumento da porcentagem de macrófagos PKH-29pos, CD14pos e CD19neg que foi observado para Abs CD38 em comparação com os controles de isótipo (IgG1-b12 e IgG1-b12-E430G). Dependendo do doador usado, os anticorpos CD38 que contêm uma mutação em E430G mostraram uma maior porcentagem de macrófagos PKH-29pos, CD14pos e CD19neg em comparação com os anticorpos de tipo selvagem, indicando que a fagocitose mediada por CD38-Ab pode ser aumentada pela introdução da mutação em E430G.

Exemplo 6 - Indução de apoptose por anticorpos CD38 em linhas de células tumorais

[00463] A indução de apoptose por anticorpos CD38 foi investigada por incubação durante a noite de linhas de células tumorais com anticorpo CD38 seguido por análise de vivo/morto em um citômetro de fluxo. As células, ressuspensas em RPMI contendo 0,2% de BSA, foram semeadas a 100,000 células/poço em placas de cultura de tecidos de fundo plano de 96 poços (Greiner bio-one). Diluições em série (0,01-10 µg/mL de concentração final de anticorpo em 4x diluições em série) de CD38 ou anticorpos de controle foram adicionadas na ausência ou presença de 10 µg/mL de IgG1 anti-humano de cabra (Jackson) para prover do reticulação adicional do Fc. As células foram incubadas durante a noite a 37°C, lavadas/centrifugadas duas vezes usando tampão FACS (PBS/0,1% BSA/0,01% Na-Azida) e ressuspensas em tampão FACS suplementado com Topro-3-iodo diluído 1:4000 (Life Technologies). A viabilidade celular foi analisada em um FACS_Fortessa (BD) e descrita como a porcentagem de células apoptóticas

(positivas para topro-3-iodo).

[00464] A **Figura 9** mostra que os anticorpos CD38 de tipo selvagem e mutado em E430G não induziram apoptose por si só, mas a adição de um anticorpo de reticulação do Fc resultou em aproximadamente 30% de apoptose. Nenhuma diferença foi observada entre o tipo selvagem e os anticorpos CD38 mutados em E430G.

Exemplo 7 - Inibição da atividade da enzima CD38 na ausência de PBMCs

Inibição da atividade da ciclase CD38

[00465] CD38 é uma ectoenzima que converte o NAD em cADPR e ADPR. Essas atividades dependem da presença de H₂O. Quando H₂O está presente, o NAD é convertido em ADPR (atividade da glico-hidrolase) e o cADPR é convertido em ADPR (atividade da hidrolase). Cerca de 95% do NAD é convertido em ADPR por meio da atividade (glico)hidrolase. Na ausência de H₂O, a CD38 transforma o NAD em cADPR usando sua atividade ciclase. Para medir a inibição da atividade da enzima CD38, foram usados derivados de NAD que se tornaram fluorescentes após serem processados por CD38.

[00466] A **Figura 10** ilustra as atividades enzimáticas de CD38.

[00467] Primeiro, a inibição da atividade de ciclase de CD38 foi medida usando fosfodiesterase de sal de sódio de dinucleotídeo de nicotinamida guanina (NGD, Sigma) como substrato para CD38. Como fonte de CD38, foram utilizadas linhas de células tumorais com diferentes níveis de expressão de CD38, bem como domínio extracelular de CD38 marcado com his recombinante (hisCD38). Células tumorais (Daudi e Wien133) foram colhidas e lavadas com Tris-HCL 20 mM. As células foram ressuspensas em Tris-HCL 20 mM e 200,000 células/poço foram semeadas em placas opacas brancas de 96 poços (PerkinElmer) em 100 µL/poço. HisCD38 foi semeado a 0,6 µg/mL em 100 µL/poço 20 mM de Tris-HCL. Os anticorpos CD38 foram diluídos para 100 µg/mL em Tris-HCL 20 mM e 10 µL foram adicionados às

células e hisCD38 (a concentração final é de 9 µg/mL) e incubados por 20 minutos à temperatura ambiente. Os poços de controle foram incubados com anticorpo b12 em vez de anticorpo CD38, ou sem nenhum anticorpo. Em seguida, 10 µL (80 µM) de NGD diluído em Tris-HCL 20 mM foram adicionados à placa e a fluorescência foi imediatamente medida no leitor multilabel Envision (PerkinElmer) usando excitação 340 nm e emissão 430 nm. A conversão de NGD foi seguida em tempo real, medindo a fluorescência nos pontos de tempo indicados na Figura 11 até que um platô seja atingido. Para hisCD38, a fluorescência foi medida a cada 3 minutos durante 27 minutos, para células Daudi a fluorescência foi medida após 5, 15, 30, 60, 120 e 185 minutos e para Wien133, a fluorescência foi medida após 5, 15, 30, 60, 150, 220, 300 e 360 minutos. A inibição da atividade da ciclase CD38 foi descrita como a inibição percentual em comparação com o controle, onde o controle é uma amostra com hisCD38 e NGD, mas sem Ab. Um experimento representativo é descrito para cada condição testada.

[00468] A **Figura 11A** demonstra que NGD foi rapidamente convertido através da atividade de hisciclase de CD38. A conversão foi concluída após aproximadamente 9 minutos. Na presença de CD38 Ab B, a porcentagem máxima de conversão de NGD foi reduzida em ~ 25%, na presença de CD38 Ab C a porcentagem máxima de conversão de NGD foi reduzida em ~ 50%, enquanto CD38 Ab A não teve efeito no total volume de negócios da NGD. A inibição da atividade da ciclase CD38 não foi afetada pela presença da mutação em E430G. Resultados semelhantes foram vistos nas Figuras 11B e 11C, onde a conversão de NGD por CD38 presente em células Daudi e Wien133 foi medida. A cinética de conversão de NGD foi um pouco mais lenta nas células Daudi e especialmente nas células Wien133, o que provavelmente está correlacionado com a presença de menos moléculas de CD38. No entanto, a inibição de 25% da atividade de ciclase de CD38 foi induzida por Ab B (~ 25% de inibição) e ~ 40% de inibição da atividade de

ciclase de CD38 foi induzida por Ab C, enquanto Ab A não mostrou nenhum efeito. Anticorpos de tipo selvagem e anticorpos mutados em E430G mostraram resultados semelhantes, indicando que a mutação em E430G não tem impacto na inibição da atividade de ciclase de CD38 mediada por anticorpos.

Exemplo 8 - Trogocitose dependente de anticorpo por anticorpos CD38 mutados em E430G

Trogocitose por anticorpos CD38 mutados em E430G em células Daudi:

[00469] A capacidade dos anticorpos CD38 mutados com E430G para induzir trogocitose em células Daudi foi avaliada. Os macrófagos foram obtidos isolando PBMCs de voluntários saudáveis (Sanquin) usando meio de separação de linfócitos (Bio Whittaker) de acordo com as instruções do fabricante. A partir das PBMCs, os monócitos foram isolados por meio de seleção negativa, usando o kit de isolamento Dynabeads Untouched Human Monocyte (Invitrogen). Os monócitos isolados foram cultivados 3 dias em meio de células dendríticas sem soro (CellGenix GmbH) suplementado com 50 ng/mL de GM-CSF (Invitrogen), seguido por 2 dias em meio de células dendríticas sem soro suplementado com 100 ng/mL de GM-CSF, para induzir a diferenciação de macrófagos. Os macrófagos diferenciados foram separados usando verseno (Life Technologies) e raspagem celular e distinguidos por citometria de fluxo para coloração com CD1a-FITC (BD), CD14-PE/Cy7 (BD), CD40-APC/H7 (BD), CD80-APC (Miltenyi biotec), CD83-PE (BD) e CD86-PerCP-Cy5.5 (Biolegend). Os macrófagos foram semeados a 100,000 células por poço em placas de cultura de fundo plano de 96 poços (Greiner bio-one) e deixados aderir durante a noite a 37°C em meio de células dendríticas sem soro suplementado com 100 ng/mL de GM-CSF.

[00470] As células alvo (Daudi) foram marcadas com PKH-26 (Sigma) de acordo com as instruções do fabricante, opsonizadas com 10 µg/mL de anticorpo CD38 (30 minutos a 4°C), lavadas três vezes com tampão FACS e

adicionadas aos macrófagos em um efetor: razão alvo (E: T) de 5: 1. A placa foi girada brevemente a 300 rpm para trazer as células efetoras e células alvo em estreita proximidade e incubada por 45 minutos a 37°C.

[00471] A **Figura 21** ilustra a configuração do ensaio usada para medir a trogocitose.

[00472] A expressão de CD38 e a coloração de IgG humana foram determinadas em células Daudi por incubação com clone de A CD38 conjugado por FITC e anti-IgG-FITC humano da cabra (Southern Biotech), respectivamente. O clone A de CD38 foi usado para corar CD38 porque este Ab reconhece um epítipo não sobreposto em CD38 em comparação com os clones B e C.

[00473] A **Figura 12** mostra que a expressão de CD38 em células Daudi foi significativamente reduzida após 45 minutos de cocultura com macrófagos e anticorpos CD38. A redução na expressão de CD38 foi mais forte com anticorpos CD38 mutados em E430G. A mesma tendência foi observada para a coloração de IgG humana em células Daudi opsonizadas com anticorpos.

Trogocitose por anticorpos CD38 mutados em E430G em células T reguladoras:

[00474] As células T reguladoras (Tregs) com alta expressão de CD38 são mais imunossupressoras em comparação com Tregs com expressão de CD38 intermediária (Krejci J. *et al.* Blood 2016 128: 384-394). Portanto, estratégias para reduzir a expressão de CD38 em Tregs podem reduzir os efeitos imunossupressores dessas células. Nós investigamos se os anticorpos CD38 mutados em E430G podem reduzir a expressão de CD38 em Tregs por meio de trogocitose. Tregs foram isolados de PBMCs de voluntários saudáveis (Sanquin) usando meio de separação de linfócitos (Bio Whittaker) de acordo com as instruções do fabricante. A partir dos PBMCs, as células T CD4 + foram isoladas por meio de seleção negativa, seguido de

enriquecimento para células T reguladoras CD4 + CD25 +, usando o kit de isolamento Treg (Miltenyi) de acordo com as instruções do fabricante. Posteriormente, as Tregs foram expandidas a 5×10^4 células/mL em meio de células dendríticas sem soro suplementado com 5% de soro humano (Sigma), 1000 U/mL IL-2 (peprotech), 100 ng/mL rapamicina (Sigma) e CD3/CD28 grânulos revestidos (Gibco) em uma proporção grânulo: célula de 4: 1 por 20 dias a 37°C. A cada 3 a 4 dias, a densidade celular foi ajustada para 5×10^5 células/mL usando meio de células dendríticas sem soro suplementado com 1000 U/mL IL-2 e 100 ng/mL de rapamicina. O fenótipo T regulador foi seguido ao longo do tempo usando coloração de citometria de fluxo com os seguintes anticorpos: CCR7-BV785 (Biolegend), CD62L-FITC (BD), CD4-APC/efluor780 (e-biociências), CD25-PerCP/Cy5 (Biolegend), Foxp3-PE/CF594 (BD), CTLA4-efluor660 (e-biociências), CD127-PE/CY7 e CD38-GV605 (Biolegend).

[00475] Para avaliar a trogocitose induzida por Ab CD38 de Tregs, Tregs (células alvo) foram cocultivadas com PBMCs (células efetoras) e a expressão de CD38 foi monitorada nas Tregs. Resumidamente: PBMCs foram isolados de leucocitose (Sanquin) usando meio de separação de linfócitos (Bio Whittaker) de acordo com as instruções do fabricante e semeados em meio RPMI-1640 (Lonza) suplementado com 0,2% de BSA a uma densidade de 5×10^5 células por poço e cultivadas 3 dias para permitir a adesão dos monócitos. Tregs foram marcados com 0,25 μ M de CellTrace far red (CTFR) de acordo com as instruções do fabricante e pré-incubados com Ab CD38 mutados em E430G por 10 minutos a 37°C. Tregs foram lavados e 1×10^5 células opsonizadas com Ab por poço foram transferidas para a placa com PBMCs. Os PBMCs e Tregs foram girados brevemente a 300 rpm para trazer as células em estreita proximidade e incubados por 23 horas a 37°C. A trogocitose de CD38 foi medida analisando a expressão de CD38 com clone A de CD38 de conjugado por FITC em Tregs CTFR-positivos com citometria

de fluxo.

[00476] A **Figura 13** mostra que a expressão de CD38 em células T reguladoras foi reduzida após incubação com anticorpos CD38 mutados em E430G e PBMCs. Sem PBMCs, nenhuma redução da expressão de CD38 nas células T reguladoras foi observada, sugerindo fortemente trogocitose. Além disso, na presença de PBMCs, IgG1-B não induziu trogocitose de CD38, enquanto uma forte redução na expressão de CD38 foi induzida por E430G mutado B e C. Isso sugere que anticorpos CD38 mutados em E430G induzem trogocitose aumentada de CD38.

Exemplo 9: Atividade antitumoral de um anticorpo C CD38 mutado em E430G em modelos de linfoma difuso de células B grandes derivados de pacientes

[00477] Células de Linfoma Difuso de Grandes Células B (DLBCL) derivadas de pacientes foram inoculadas subcutâneas em camundongos CB17.SCID e o tratamento com anticorpo (2 doses semanais de 5 mg/kg de IgG1-C-E430G, injetadas por via intravenosa; PBS foi usado como controle negativo) foi iniciado quando os tumores atingiram um volume médio de aproximadamente 150-250 mm³. Os volumes do tumor foram medidos em duas dimensões usando um calibrador e o volume foi expresso em mm³ usando a fórmula: $V = (L \times W \times W)/2$, onde V é o volume do tumor, L é o comprimento do tumor (a dimensão mais longa do tumor) e W é a largura do tumor (a maior dimensão do tumor perpendicular a L), e representada ao longo do tempo na Figura 20. Cada grupo de tratamento consiste em um único camundongo. Para calcular um valor de resposta, a seguinte fórmula foi usada; (volume de tumor de camundongo tratado com IgG1-C-E430G no dia X - volume de tumor de camundongo tratado com IgG1-C-E430G no dia 0)/(volume de tumor de camundongo de controle no dia X - volume de tumor de camundongo de controle no dia 0)

[00478] X = o último dia no período entre o dia 7 ao dia 25 em que

ambos os animais estavam vivos e a medição do tumor foi realizada.

[00479] Os valores de resposta são apresentados na Tabela 5, bem como a expressão de mRNA de CD38. Os modelos que apresentaram os maiores níveis de mRNA de CD38 também apresentaram a melhor resposta. Isso também pode ser visto a partir dos gráficos na Figura 20. Assim, duas doses semanais de IgG1-C-E430G reduziram o crescimento do tumor em dois dos cinco modelos DLBCL PDX testados que tinham a maior expressão de mRNA de CD38.

Tabela 5 Visão geral da expressão de mRNA de CD38 e valor de resposta calculado para cinco modelos DLBCL PDX. Um valor de resposta baixo indica regressão do tumor.

| Modelo | CD38 (determinado por RNASeq: \log_2 (valor TPM + 1)) | Resposta ($\Delta T / \Delta C$) | Resposta calculada para o dia; |
|---------|---|------------------------------------|--------------------------------|
| Ly12638 | 6.427 | -11% | 15 |
| Ly11212 | 6.066 | -2% | 11 |
| Ly13976 | 6.017 | 54% | 13 |
| Ly13693 | 4.796 | 58% | 22 |
| Ly14862 | 0 | 83% | 11 |

Exemplo 10: IgG1-C-E430G induz potente citotoxicidade mediada por complemento em células mononucleares da medula óssea de pacientes com MM diagnosticados recentemente

[00480] Células mononucleares da medula óssea (BM-MNC) foram isoladas por gradiente de densidade Ficoll-Hypaque de aspirados de medula óssea completa de 3 pacientes com MM recém diagnosticados e 1 paciente com MM recidivante/refratário e congelados a -80°C até o uso. No dia da utilização, as BM-MNC foram descongeladas, as células viáveis foram contadas e plaqueadas em placas de 96 poços. As células foram incubadas com diluições em série (0,01 - 10 $\mu\text{g/mL}$) de IgG1-C-E430G ou Darzalex® por 15 min em temperatura ambiente em um agitador de placa. Como controles negativos, as células não foram tratadas ou foram incubadas com 10 $\mu\text{g/mL}$ de IgG1-b12. Como fonte de complemento, 20% de soro humano normal foi adicionado 45 min antes das medições FACS, nas quais os

números absolutos de células foram determinados usando contas de contagem de citometria de fluxo como uma constante. Para determinar as percentagens gerais de lise, os poços de controle não tratados foram usados como valores de controle. A porcentagem de lise de células de mieloma múltiplo foi determinada em relação aos controles usando a seguinte equação:

$$\% \text{ de lise celular} = (1 - (\text{número de células sobreviventes em amostras tratadas com anticorpos} / \text{número de células sobreviventes em controles não tratados})) \times 100\%$$

[00481] As Figuras 22A e B mostram que IgG1-C-E430G induziu níveis mais elevados de lise em duas amostras de BM-MNC de pacientes com MM recém diagnosticados em comparação com Darzalex®. A lise máxima induzida por IgG1-C-E430G estava na faixa de 84-90% em comparação com uma lise máxima na faixa de 31-55% induzida por Darzalex®. Em duas outras amostras de BM-MNC, uma de um paciente com MM recidivante/refratário que não recebeu Darzalex® como parte da terapia anterior (Figura 22C) e uma de um paciente com MM recém diagnosticado (Figura 22D), nenhuma indução de CDC foi observada com IgG-C-E430G ou Darzalex® (Figura 22C e D).

LISTA DE REFERÊNCIAS

[00482] Cada referência nesta lista, ou citada em outro lugar neste documento, é aqui especificamente incorporada por referência em sua totalidade.

[00483] Antonelli, A., P. Fallahi, *et al.* (2001). “Anti-CD38 autoimmunity in patients with chronic autoimmune thyroiditis or Graves' disease.” *Clin Exp Immunol* 126(3): 426-431.

[00484] Ausiello, C. M., F. Urbani, *et al.* (2000). “Functional topography of discrete domains of human CD38.” *Tissue Antigens* 56(6): 539-547.

[00485] Brezski, R. J. and G. Georgiou (2016). “Immunoglobulin

isotype knowledge and application to do Fc engineering.” *Curr Opin Immunol* 40: 62-69.

[00486] Chatterjee, S., A. Daenthanasanmak, *et al.* (2018). “CD38-NAD(+)Axis Regulates Immunotherapeutic Anti-Tumor T Cell Response.” *Cell Metab* 27(1): 85-100 e108.

[00487] Cotner, T., M. Hemler, *et al.* (1981). “Human T cell proteins recognized by rabbit heteroantisera and monoclonal antibodies.” *Int J Immunopharmacol* 3(3): 255-268.

[00488] Dall'Acqua, W. F., K. E. Cook, *et al.* (2006). “Modulation of the effector functions of a human IgG1 through engineering of its hinge region.” *J Immunol* 177(2): 1129-1138.

[00489] Damle, R. e. a. (1999). “Ig V gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia.” *Blood* 94(6): 1840-1847.

[00490] de Weers, M., Y. T. Tai, *et al.* (2011). “Daratumumabe, a novel therapeutic human CD38 monoclonal antibody, induces killing of multiple myeloma and other hematological tumors.” *J Immunol* 186(3): 1840-1848.

[00491] Deckert, J., M. C. Wetzel, *et al.* (2014). “SAR650984, a novel humanized CD38-targeting antibody, demonstrates potent antitumor activity in models of multiple myeloma and other CD38+ hematologic malignancies.” *Clin Cancer Res* 20(17): 4574-4583.

[00492] Deshpande, D. A., T. A. White, *et al.* (2005). “Altered airway responsiveness in CD38-deficient mice.” *Am J Respir Cell Mol Biol* 32(2): 149-156.

[00493] Desjarlais, J. R. and G. A. Lazar (2011). “Modulation of antibody effector function.” *Exp Cell Res* 317(9): 1278-1285.

[00494] Eissler, N., S. Filosto, *et al.* (2018). “A best in class anti-CD38 antibody with antitumor and immune-modulatory properties.” AACR annual

meeting 2018: Abstract #3812.

[00495] Feng X., Zhang L., *et al.* (2017). “Targeting CD38 Suppresses Induction and Function of T Regulatory Cells to Mitigate Immunosuppression in Multiple Myeloma.” *Clin Cancer Res* 23:4290-4300.

[00496] Ho, H. N., L. E. Hultin, *et al.* (1993). “Circulating HIV-specific CD8+ cytotoxic T cells express CD38 and HLA-DR antigens.” *J Immunol* 150(7): 3070-3079.

[00497] Kaneko, E. and R. Niwa (2011). “Optimizing therapeutic antibody function: progress with do Fc domain engineering.” *BioDrugs* 25(1): 1-11.

[00498] Karakasheva T. A., Waldron T. J., *et al.*, (2015). “CD38-Expressing Myeloid-Derived Suppressor Cells Promote Tumor Growth in a Murine Model of Esophageal Cancer.” *Cancer Res* 75(19):4074-85

[00499] Kestens, L., G. Vanham, *et al.* (1992). “Expression of activation antigens, HLA-DR and CD38, on CD8 lymphocytes during HIV-1 infection.” *AIDS* 6(8): 793-797.

[00500] Keyhani, A., Y. O. Huh, *et al.* (2000). “Increased CD38 expression is associated with favorable prognosis in adult acute leukemia.” *Leuk Res* 24(2): 153-159.

[00501] Konoplev, S., L. J. Medeiros, *et al.* (2005). “Immunophenotypic profile of lymphoplasmacytic lymphoma/Waldenstrom macroglobulinemia.” *Am J Clin Pathol* 124(3): 414-420.

[00502] Krejcik, J., T. Casneuf, *et al.* (2016). “Daratumumab depletes CD38+ immune-regulatory cells, promotes T-cell expansion, and skews T-cell repertoire in multiple myeloma.” *Blood* 128: 384-394.

[00503] Krejcik, J., K. A. Frerichs, *et al.* (2017). “Monocytes and Granulocytes Reduce CD38 Expression Levels on Myeloma Cells in Patients Treated with Daratumumab.” *Clin Cancer Res* 23(24): 7498-7511.

[00504] Lammerts van Bueren, J., D. Jakobs, *et al.* (2014). “Direct *in*

vitro Comparison of Daratumumab with Surrogate Analogs of CD38 Antibodies MOR03087, SAR650984 and Ab79.” *Blood* 124(21): 3474.

[00505] Lande, R., F. Urbani, *et al.* (2002). “CD38 ligation plays a direct role in the induction of IL-1beta, IL-6, and IL-10 secretion in resting human monocytes.” *Cell Immunol* 220(1): 30-38.

[00506] Lee, H. C. and R. Aarhus (1993). “Wide distribution of an enzyme that catalyzes the hydrolysis of cyclic ADP-ribose.” *Biochim Biophys Acta* 1164(1): 68-74.

[00507] Lin, P., R. Owens, *et al.* (2004). “Flow cytometric immunophenotypic analysis of 306 cases of multiple myeloma.” *Am J Clin Pathol* 121(4): 482-488.

[00508] Malavasi, F., A. Funaro, *et al.* (1994). “Human CD38: a glycoprotein in search of a function.” *Immunol Today* 15(3): 95-97.

[00509] Mallone, R. and P. C. Perin (2006). “Anti-CD38 autoantibodies in type 2 diabetes.” *Diabetes Metab Res Rev* 22(4): 284-294.

[00510] Marinov, J., K. Koubek, *et al.* (1993). “Immunophenotypic Significance of the Lymphoid Cd38 Antigen in Myeloid Blood Malignancies.” *Neoplasma* 40(6): 355-358.

[00511] Morandi F., Horenstein A. L., *et al.* (2015). “CD56^{bright}CD16⁻ NK Cells Produce Adenosine through a CD38-Mediated Pathway and Act as Regulatory Cells Inhibiting Autologous CD4⁺ T Cell Proliferation.” *J Immunol* 195:965-972.

[00512] Moore, G. L., H. Chen, *et al.* (2010). “Engineered do Fc variant antibodies with enhanced ability to recruit complement and mediate effector functions.” *MAbs* 2(2): 181-189.

[00513] Patton, D. T., Wilson M. D., *et al.* (2011). “The PI3K p110δ Regulates Expression of CD38 on Regulatory T cells.” *PLoS ONE* 6(3): 1-8

[00514] Parry-Jones, N., E. Matutes, *et al.* (2007). “Cytogenetic abnormalities additional to t(11;14) correlate with clinical features in

leukaemic presentation of mantle cell lymphoma, and may influence prognosis: a study of 60 cases by FISH.” *Br J Haematol* 137(2): 117-124.

[00515] Perfetti, V., V. Bellotti, *et al.* (1994). “AL amyloidosis. Characterization of amyloidogenic cells by anti-idiotypic monoclonal antibodies.” *Lab Invest* 71(6): 853-861.

[00516] Raab, M. S., H. Goldschmidt, *et al.* (2015). “A phase I/IIa study of the human anti-CD38 antibody MOR202 (MOR03087) in relapsed or refractory multiple myeloma (rrMM).” *J Clin Oncol* 33: A8574.

[00517] Ramaschi, G., M. Torti, *et al.* (1996). “Expression of cyclic ADP-ribose-synthetizing CD38 molecule on human platelet membrane.” *Blood* 87(6): 2308-2313.

[00518] Roepcke, S., N. Plock, *et al.* (2018). “Pharmacokinetics and pharmacodynamics of the cytolytic anti-CD38 human monoclonal antibody TAK-079 in monkey - model assisted preparation for the first in human trial.” *Pharmacol Res Perspect* 6(3): e00402.

[00519] Schooten, W. v. (2018). “Multispecific antibodies targeting CD38 and PD-L1 show potent tumor cytotoxicity.” *AACR annual meeting 2018: Abstract #5620*.

[00520] Sondermann, P. and D. E. Szymkowski (2016). “Harnessing do Fc receptor biology in the design of therapeutic antibodies.” *Curr Opin Immunol* 40: 78-87.

[00521] Song, A., K. Myojo, *et al.* (2014). “Evaluation of a fully human monoclonal antibody against multiple influenza A viral strains in mice and a pandemic H1N1 strain in nonhuman primates.” *Antiviral Res* 111: 60-68.

[00522] Suzuki, R., J. Suzumiya, *et al.* (2004). “Aggressive natural killer-cell leukemia revisited: large granular lymphocyte leukemia of cytotoxic NK cells.” *Leukemia* 18(4): 763-770.

[00523] van de Donk (2018). “Immunomodulatory effects of CD38

targeting antibodies.” Immunology Letters 199:16-22

[00524] van de Donk, N. W., M. L. Janmaat, *et al.* (2016). “Monoclonal antibodies targeting CD38 in hematological malignancies and beyond.” Immunol Rev 270(1): 95-112.

[00525] van de Donk, N. W., H. M. Lokhorst, *et al.* (2012). “How I treat plasma cell leukemia.” Blood 120(12): 2376-2389.

[00526] Wang, L., H. Wang, *et al.* (2015). “CD38 expression predicts poor prognosis and might be a potential therapy target in extranodal NK/T cell lymphoma, nasal type.” Ann Hematol 94(8): 1381-1388.

[00527] Wang, X., M. Mathieu, *et al.* (2018). “IgG do Fc engineering to modulate antibody effector functions.” Protein & Cell 9(1): 63-73.

[00528] Zhang, D., A. A. Armstrong, *et al.* (2017). “Functional optimization of agonistic antibodies to OX40 receptor with novel do Fc mutations to promote antibody multimerization.” MAbs 9(7): 1129-1142.

[00529] Zocchi, E., L. Franco, *et al.* (1993). “A single protein immunologically identified as CD38 displays NAD⁺ glycohydrolase, ADP-ribosyl cyclase and cyclic ADP-ribose hydrolase activities at the outer surface of human erythrocytes.” Biochem Biophys Res Commun 196(3): 1459-1465.

[00530] Nijhof *et al.*, Blood 2016; 128(7):959-970
 “Supplemental Methods” to Nijhof *et al.*, 2016
 WO 2006/099875 A1 (Genmab A/S)
 WO 2007/042309 A1 (Morphosys AG)
 WO 2008/047242 A1 (Sanofi Aventis)
 WO 2011/154453 A1 (Genmab A/S)
 WO 2012/092612 A1 (Takeda Pharmaceutical)
 WO 2013/004842 A2 (Genmab A/S)
 WO 2014/108198 A1 (Genmab B.V.)
 WO 2016/210223 A1 (Janssen Biotech, Inc.)
 WO 2018/031258 A1 (Janssen Biotech, Inc.)

REIVINDICAÇÕES

1. Variante de anticorpo, caracterizada pelo fato de que se liga a CD38 humana, a variante de anticorpo compreendendo

(a) uma região de ligação ao antígeno que compreende um CDR1 de VH tendo a sequência conforme estabelecido na SEQ ID NO: 2, um CDR2 de VH tendo a sequência conforme estabelecido na SEQ ID NO: 3, um CDR3 de VH tendo a sequência conforme estabelecido na SEQ ID NO: 4, um CDR1 de VL tendo a sequência conforme estabelecido na SEQ ID NO: 6, um CDR2 de VL tendo a sequência AAS, e um CDR3 de VL tendo a sequência conforme estabelecido na SEQ ID NO: 7, e

(b) uma região do Fc variante que compreende uma mutação em um ou mais resíduos de aminoácidos selecionados a partir do grupo que corresponde a E430, E345 e S440 em uma cadeia pesada de IgG1 humano, em que os resíduos de aminoácidos são numerados de acordo com o índice da UE.

2. Variante de anticorpo de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que compreende uma região de cadeia pesada variável (VH) que compreende SEQ ID NO: 1 ou uma sequência de aminoácidos com pelo menos 80% de identidade, tal como 90%, ou 95%, ou 97%, ou 98%, ou 99%, para com a SEQ ID NO: 1.

3. Variante de anticorpo de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizada pelo fato de que compreende uma região de cadeia leve variável (VL) que compreende SEQ ID NO: 5 ou uma sequência de aminoácidos com pelo menos 80% de identidade, tal como 90% ou 95%, ou 97% ou 98% ou 99%, para com a SEQ ID NO: 5.

4. Variante de anticorpo de acordo com a reivindicação 2 ou 3, caracterizada pelo fato de que a VH difere da SEQ ID NO: 1 em 12 ou menos, tal como 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 ou 1 mutações, como substituições, inserções ou deleções de resíduos de aminoácidos.

5. Variante de anticorpo de acordo com a reivindicação 3 ou 4, caracterizada pelo fato de que a VL difere da SEQ ID NO: 5 em 12 ou menos, tal como 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 ou 1 mutações, tais como substituições, inserções ou deleções de resíduos de aminoácidos.

6. Variante de anticorpo de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizada pelo fato de que compreende uma região de VH que compreende a sequência da SEQ ID NO: 1 e uma região de VL que compreende a sequência da SEQ ID NO: 5.

7. Variante de anticorpo de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizada pelo fato de que a mutação em um ou mais resíduos de aminoácidos é selecionada a partir do grupo que consiste em E430G, E345K, E430S, E430F, E430T, E345Q, E345R, E345Y, S440Y e S440W.

8. Variante de anticorpo de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizada pelo fato de que a mutação em um ou mais resíduos de aminoácidos é selecionada a partir do grupo que corresponde a E430G, E345K, E430S e E345Q.

9. Variante de anticorpo de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizada pelo fato de que a mutação em um ou mais resíduos de aminoácidos compreende E430G.

10. Variante de anticorpo de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizada pelo fato de que a mutação em um ou mais resíduos de aminoácidos consiste em E430G.

11. Variante de anticorpo de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizada pelo fato de que a região do Fc variante compreende uma ou mais mutações adicionais que não reduzem a citotoxicidade dependente do complemento (CDC) e/ou citotoxicidade mediada por células dependentes de anticorpo (ADCC) induzida pela variante de anticorpo sem uma ou mais mutações adicionais.

12. Variante de anticorpo de acordo com a reivindicação 11, caracterizada pelo fato de que uma ou mais mutações adicionais são 12 ou menos, como 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 ou 1 mutações, como substituições, inserções ou deleções de resíduos de aminoácidos.

13. Variante de anticorpo de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizada pelo fato de que a região do Fc variante é, exceto para a mutação recitada, um isótipo de IgG1, IgG2, IgG3 ou IgG4 humano ou um isótipo misto dos mesmos.

14. Variante de anticorpo de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizada pelo fato de que a região do Fc variante é, exceto para a mutação recitada, uma região do Fc de IgG1 humano.

15. Variante de anticorpo de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizada pelo fato de que a região do Fc variante é, exceto para as mutações recitadas, um alótipo de IgG1m(f), IgG1m(a), IgG1m(x), IgG1m(z) humano ou um alótipo misto de quaisquer dois ou mais dos mesmos.

16. Variante de anticorpo de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizado pelo fato de ser um anticorpo bivalente.

17. Variante de anticorpo de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizada pelo fato de que é um anticorpo de comprimento total.

18. Variante de anticorpo de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizada pelo fato de que a variante de anticorpo é, exceto para as mutações recitadas, um anticorpo humano.

19. Variante de anticorpo de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizado pelo fato de ser um anticorpo monoclonal.

20. Variante de anticorpo de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizada pelo fato de que a variante de anticorpo é, exceto para as mutações citadas, um anticorpo IgG1.

21. Variante de anticorpo de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizada pelo fato de que a variante de anticorpo é, exceto para as mutações recitadas, um anticorpo monoclonal de comprimento total humano bivalente IgG1m(f) κ .

22. Variante de anticorpo, caracterizada pelo fato de que se liga a CD38 humana, a variante de anticorpo compreendendo

(a) uma cadeia pesada que compreende uma região de VH que compreende um CDR1 de VH tendo a sequência conforme estabelecido na SEQ ID NO: 2, um CDR2 de VH tendo a sequência conforme estabelecido na SEQ ID NO: 3, um CDR3 de VH tendo a sequência como estabelecido na SEQ ID NO: 4 e uma região de CH de IgG1 humano com uma mutação em um ou mais de E430, E345 e S440, os resíduos de aminoácidos sendo numerados de acordo com o índice da UE;

(b) uma cadeia leve que compreende uma região de VL que compreende um CDR1 de VL tendo a sequência conforme estabelecido em SEQ ID NO: 6, um CDR2 de VL tendo a sequência AAS, e um CDR3 de VL tendo a sequência conforme estabelecido em SEQ ID NO: 7.

23. Variante de anticorpo, caracterizado pelo fato de que se liga a CD38 humana, a variante de anticorpo compreendendo

(a) uma cadeia pesada que compreende uma região de VH que compreende SEQ ID NO: 1 e uma região de CH de IgG1 humano com uma mutação em um ou mais de E430, E345 e S440, em que a numeração do resíduo de aminoácido está de acordo com o índice da UE, e

(b) uma cadeia leve que compreende um VL que compreende SEQ ID NO: 5.

24. Variante de anticorpo de acordo com a reivindicação 22 ou

23, caracterizada pelo fato de que a mutação compreende ou consiste em E430G.

25. Variante de anticorpo de acordo com qualquer uma das reivindicações 22 a 24, caracterizada pelo fato de que a região de CH de IgG1 humano é um alótipo de IgG1m(f), IgG1m(a), IgG1m(x) e IgG1m(z) humano, ou um alótipo misto de quaisquer dois ou mais dos mesmos.

26. Variante de anticorpo de acordo com qualquer uma das reivindicações 22 a 25, caracterizado pelo fato de que o CH compreende, exceto para a mutação recitada, a sequência da SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23 ou SEQ ID NO: 45.

27. Variante de anticorpo de acordo com a reivindicação 26, caracterizada pelo fato de que o CH compreende uma ou mais mutações adicionais.

28. Variante de anticorpo de acordo com a reivindicação 27, caracterizada pelo fato de que a dita uma ou mais mutações adicionais são 12 ou menos, tais como 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 ou 1 mutações, tais como substituições, inserções ou deleções de resíduos de aminoácidos.

29. Variante de anticorpo de acordo com a reivindicação 28, caracterizada pelo fato de que Lys (K) na posição 447 de acordo com a numeração Eu é excluída.

30. Variante de anticorpo de acordo com qualquer uma das reivindicações 22 a 26, caracterizada pelo fato de que a região de CH compreende uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NO: 24 a SEQ ID NO: 33 e SEQ ID NO: 46.

31. Variante de anticorpo de acordo com a reivindicação 30, caracterizada pelo fato de que a região de CH compreende SEQ ID NO: 24 ou SEQ ID NO: 46, opcionalmente em que a cadeia leve compreende um CL que compreende SEQ ID NO: 37.

32. Variante de anticorpo de acordo com qualquer uma das

reivindicações 22 a 31, caracterizado pelo fato de ser um anticorpo bivalente.

33. Variante de anticorpo de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizada pelo fato de que a variante de anticorpo é um anticorpo monoespecífico.

34. Variante de anticorpo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 32, caracterizada pelo fato de que a variante de anticorpo é um anticorpo biespecífico.

35. Variante de anticorpo de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizado pelo fato de que tem um efeito inibidor sobre a atividade da ciclase da CD38 humana.

36. Variante de anticorpo de acordo com a reivindicação 35, caracterizada pelo fato de que inibe a atividade da ciclase da CD38 humana em pelo menos cerca de 40%, tal como pelo menos cerca de 50%, tal como pelo menos cerca de 60%, opcionalmente em que a inibição da atividade da ciclase é determinada por um ensaio que compreende as etapas de:

(a) semear 200,000 células Daudi ou Wien133 em 100 µL de Tris-HCL 20 mM por poço; ou semear 0,6 µg/mL da CD38 humana solúvel marcada com His (SEQ ID NO: 39) em 100 µL de Tris-HCL 20 mM por poço em uma placa de múltiplos poços;

(b) adicionar 1 µg/mL de anticorpo CD38 e 80 µM de NGD a cada poço;

(c) medir a fluorescência até que um *plateau* seja atingido (por exemplo; 5, 10 ou 30 minutos); e

(d) determinar a porcentagem de inibição em comparação com um controle, tal como um poço incubado com um anticorpo de controle de isótipo.

37. Variante de anticorpo de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizada pelo fato de que induz apoptose na presença, mas não na ausência, de um anticorpo de reticulação do Fc.

38. Variante de anticorpo de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizada pelo fato de que a variante de anticorpo induz CDC, ADCC, fagocitose celular dependente de anticorpo (ADCP), trogocitose ou qualquer combinação das mesmas de células que expressam a CD38 humana.

39. Variante de anticorpo de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizada pelo fato de que a variante de anticorpo induz CDC de células que expressam a CD38 humana.

40. Variante de anticorpo de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizada pelo fato de que a variante de anticorpo induz CDC contra células Daudi (ATCC No. CCL-213) ou células Ramos (ATCC No. CRL-1596) resultando em uma lise máxima de pelo menos 50%, tal como pelo menos 60%, tal como pelo menos 70% maior do que aquela obtida com uma variante de anticorpo de referência diferindo apenas na ausência de uma ou mais mutações na região do Fc.

41. Variante de anticorpo de acordo com a reivindicação 40, caracterizada pelo fato de que o CDC é determinado por um ensaio que compreende as etapas de:

(a) plaquear 100,000 células que expressam CD38 em 40 μ L de meio de cultura suplementado com 0,2% de BSA por poço em uma placa de múltiplos poços;

(b) pré-incubar as células durante 20 minutos com 40 μ L de anticorpo CD38 diluído em série (0,0002-10 μ g/mL);

(c) incubar cada poço por 45 minutos a 37°C com 20 por cento de soro humano normal reunido;

(d) adicionar um corante de viabilidade e medir a porcentagem de lise celular em um citômetro de fluxo;

(e) determinar a lise máxima usando regressão não linear.

42. Variante de anticorpo de acordo com qualquer uma das

reivindicações anteriores, caracterizada pelo fato de que a variante de anticorpo é conjugada a um agente citotóxico, um radioisótopo ou um fármaco.

43. Ácido nucleico isolado, caracterizado pelo fato de que codifica a variante de anticorpo como definida em qualquer uma das reivindicações anteriores.

44. Vetor de expressão, caracterizado pelo fato de que compreende o ácido nucleico como definido na reivindicação 43.

45. Ácido nucleico, caracterizado pelo fato de que codifica uma cadeia pesada de uma variante de anticorpo como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 42.

46. Ácido nucleico de acordo com a reivindicação 45, caracterizado pelo fato de que a dita cadeia pesada compreende uma região de VH que compreende um CDR1 de VH tendo a sequência conforme estabelecido na SEQ ID NO: 2, um CDR2 de VH tendo a sequência conforme estabelecido na SEQ ID NO: 3, um CDR3 de VH tendo a sequência conforme estabelecido na SEQ ID NO: 4 e uma região de CH de IgG1 humano com uma mutação em um ou mais de E430, E345 e S440, os resíduos de aminoácidos sendo numerados de acordo com o índice da UE.

47. Ácido nucleico, caracterizado pelo fato de que codifica uma variante de anticorpo como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 42.

48. Combinação de ácidos nucleicos, caracterizado pelo fato de que codificam uma variante de anticorpo como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 42.

49. Veículo de dispensação, caracterizado pelo fato de que compreende o(s) ácido(s) nucleico(s) como definidos em qualquer uma das reivindicações 45 a 48.

50. Veículo de dispensação, caracterizado pelo fato de que

compreende um ácido nucleico que codifica uma cadeia leve de uma variante de anticorpo como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 42.

51. Veículo de dispensação de acordo com a reivindicação 50, caracterizado pelo fato de que a dita cadeia leve compreende uma região de VL que compreende um CDR1 de VL tendo a sequência conforme estabelecido na SEQ ID NO: 6, um CDR2 de VL tendo a sequência AAS, e um CDR3 de VL tendo a sequência conforme estabelecido na SEQ ID NO: 7, e um carreador farmacologicamente aceitável.

52. Veículo de dispensação de acordo com qualquer uma das reivindicações 49 a 51, caracterizado pelo fato de que o dito veículo de dispensação é uma partícula.

53. Veículo de dispensação de acordo com a reivindicação 52, caracterizado pelo fato de que a dita partícula é uma nanopartícula de lipídio (LNP).

54. Veículo de dispensação de acordo com a reivindicação 53, caracterizado pelo fato de que a dita LNP compreende lipídios, aminolipídios ionizáveis, PEG-lipídios, colesterol ou qualquer combinação dos mesmos.

55. Célula hospedeira recombinante, caracterizada pelo fato de que produz uma variante de anticorpo como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 41, opcionalmente em que a célula hospedeira compreende o ácido nucleico como definido na reivindicação 43 ou o vetor de expressão como definido na reivindicação 44.

56. Célula hospedeira recombinante, de acordo com a reivindicação 55, caracterizada pelo fato de que é uma célula eucariótica ou procariótica.

57. Método para produção de uma variante de um anticorpo como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 41, caracterizado pelo fato de que compreende o cultivo da célula hospedeira recombinante como definida na reivindicação 55, em um meio de cultura e sob condições

adequadas para produzir a variante de anticorpo e, opcionalmente, purificar ou isolar a variante de anticorpo do meio de cultura.

58. Método para aumentar pelo menos uma função efetora de um anticorpo parental que compreende uma região do Fc e uma região de ligação ao antígeno que se liga a CD38, tal método caracterizado pelo fato de que compreende a introdução na região do Fc de uma mutação em um ou mais resíduos de aminoácidos selecionados a partir do grupo correspondendo a E430, E345 e S440 na região do Fc de uma cadeia pesada de IgG1 humano, em que os resíduos de aminoácidos são numerados de acordo com o índice da UE;

em que a região de ligação ao antígeno compreende um CDR1 de VH tendo a sequência conforme estabelecido na SEQ ID NO: 2, um CDR2 de VH tendo a sequência conforme estabelecido na SEQ ID NO: 3, um CDR3 de VH tendo a sequência conforme estabelecido na SEQ ID NO: 4, um CDR1 de VL tendo a sequência conforme estabelecido na SEQ ID NO: 6, um CDR2 de VL tendo a sequência AAS, e um CDR3 de VL tendo a sequência conforme estabelecido na SEQ ID NO: 7.

59. Método para produção de uma variante de um anticorpo parental que compreende uma região do Fc e uma região de ligação ao antígeno que se liga a CD38, a variante tendo uma função efetora aumentada em comparação com o anticorpo parental, tal método caracterizado pelo fato de que compreende

(a) introduzir na região do Fc uma mutação em um ou mais resíduos de aminoácidos selecionados a partir do grupo que corresponde a E430, E345 e S440 na região do Fc de uma cadeia pesada de IgG1 humano para obter uma variante de anticorpo,

(b) selecionar qualquer variante de anticorpo com uma função efetora aumentada em comparação com o anticorpo parental, e

(c) produzir o dito variante de anticorpo em uma célula

hospedeira recombinante,

em que a região de ligação ao antígeno compreende um CDR1 de VH tendo a sequência conforme estabelecido na SEQ ID NO: 2, um CDR2 de VH tendo a sequência conforme estabelecido na SEQ ID NO: 3, um CDR3 de VH tendo a sequência conforme estabelecido na SEQ ID NO: 4, um CDR1 de VL tendo a sequência conforme estabelecido na SEQ ID NO: 6, um CDR2 de VL tendo a sequência AAS, e um CDR3 de VL tendo a sequência conforme estabelecido na SEQ ID NO: 7.

60. Método de acordo com a reivindicação 58 ou 59, caracterizado pelo fato de que a função efetora é CDC, trogocitose ou ambas.

61. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 58 a 60, caracterizado pelo fato de que a mutação em um ou mais resíduos de aminoácidos é selecionada a partir do grupo que corresponde a E430G, E345K, E430S, E430F, E430T, E345Q, E345R, E345Y, S440Y e S440W.

62. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 58 a 61, caracterizado pelo fato de que a mutação em um ou mais resíduo(s) de aminoácido compreende ou consiste em E430G.

63. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 58 a 62, caracterizado pelo fato de que a região do Fc do anticorpo parental é uma região do Fc de IgG1, IgG2, IgG3 ou IgG4 humana ou uma mistura de isótipo das mesmas.

64. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 58 a 63, caracterizado pelo fato de que a região do Fc do anticorpo parental é uma região do Fc de IgG1 humano.

65. Método de acordo com a reivindicação 64, caracterizado pelo fato de que o anticorpo parental é um anticorpo IgG1 humano de comprimento total, opcionalmente, um anticorpo IgG1 κ monoclonal de comprimento total humano bivalente.

66. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações

58 a 65, caracterizado pelo fato de que a região do Fc do anticorpo parental compreende uma ou mais mutações adicionais.

67. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 58 a 66, caracterizado pelo fato de que o anticorpo parental é um anticorpo monoespecífico ou biespecífico.

68. Anticorpo, caracterizado pelo fato de ser obtido ou obtenível pelo método como definido em qualquer uma das reivindicações 58 a 67.

69. Composição, caracterizada pelo fato de que compreende uma variante de anticorpo como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 42, 68, um ácido nucleico como definido em qualquer uma das reivindicações 43, 45 a 47, uma combinação de ácidos nucleicos como definida na reivindicação 48, um vetor de expressão como definido na reivindicação 44, um veículo de dispensação como definido em qualquer uma das reivindicações 49 a 54, ou uma célula hospedeira como definida em qualquer uma das reivindicações 55 a 56.

70. Composição farmacêutica, caracterizada pelo fato de que compreende uma variante de anticorpo, como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 42, 68, um ácido nucleico como definido em qualquer uma das reivindicações 43, 45 a 47, uma combinação de ácidos nucleicos como definida na reivindicação 48, um vetor de expressão como definido na reivindicação 44, um veículo de dispensação como definido em qualquer uma das reivindicações 49 a 54, e um carreador farmacêuticamente aceitável.

71. Variante de anticorpo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 42, 68, ácido nucleico de acordo com qualquer uma das reivindicações 43, 45 a 47, combinação de ácidos nucleicos de acordo com a reivindicação 48, vetor de expressão de acordo com a reivindicação 44, a veículo de dispensação de acordo com qualquer uma das reivindicações 49 a 54, ou uma composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 69 a

70, caracterizados pelo fato de ser para utilização como um medicamento.

72. Variante de anticorpo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 42, 68, ácido nucleico de acordo com qualquer uma das reivindicações 43, 45 a 47, combinação de ácidos nucleicos de acordo com a reivindicação 48, vetor de expressão de acordo com a reivindicação 44, veículo de dispensação de acordo com qualquer uma das reivindicações 49 a 54, ou uma composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 69 a 70, caracterizados pelo fato de ser para uso no tratamento de uma doença envolvendo células que expressam CD38.

73. Variante de anticorpo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 42, 68, ácido nucleico de acordo com qualquer uma das reivindicações 43, 45 a 47, combinação de ácidos nucleicos de acordo com a reivindicação 48, vetor de expressão de acordo com a reivindicação 44, um veículo de dispensação de acordo com qualquer uma das reivindicações 49 a 54, ou uma composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 69 a 70, caracterizados pelo fato de ser para uso na indução de uma resposta de CDC contra um tumor que compreende células que expressam CD38.

74. Variante de anticorpo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 42, 68, ácido nucleico de acordo com qualquer uma das reivindicações 43, 45 a 47, combinação de ácidos nucleicos de acordo com a reivindicação 48, vetor de expressão de acordo com a reivindicação 44, veículo de dispensação de acordo com qualquer uma das reivindicações 49 a 54, ou uma composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 69 a 70, caracterizados pelo fato de ser para uso no tratamento ou prevenção de um câncer em um indivíduo que compreende células que expressam a CD38 humana.

75. Variante de anticorpo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 42, 68, ácido nucleico de acordo com qualquer uma das reivindicações 43, 45 a 47, combinação de ácidos nucleicos de acordo com a

reivindicação 48, vetor de expressão de acordo com a reivindicação 44, a veículo de dispensação de acordo com qualquer uma das reivindicações 49 a 54, ou uma composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 69 a 70, caracterizados pelo fato de ser para uso no tratamento de um câncer refratário a uma terapia anterior que compreende um anticorpo CD38.

76. Variante de anticorpo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 42, 68, ácido nucleico de acordo com qualquer uma das reivindicações 43, 45 a 47, combinação de ácidos nucleicos de acordo com a reivindicação 48, vetor de expressão de acordo com a reivindicação 44, veículo de dispensação de acordo com qualquer uma das reivindicações 49 a 54, ou uma composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 69 a 70, caracterizados pelo fato de ser para uso no tratamento de um câncer em recidiva após uma terapia anterior que compreende um anticorpo CD38.

77. Variante de anticorpo para uso como definido na reivindicação 75 ou 76, caracterizada pelo fato de que o anticorpo CD38 é daratumumabe.

78. Variante de anticorpo para uso de acordo com qualquer uma das reivindicações 71 a 77, caracterizada pelo fato de que o câncer é um câncer hematológico.

79. Variante de anticorpo para uso de acordo com a reivindicação 78, caracterizado pelo fato de que o câncer hematológico é selecionado do grupo que consiste em mieloma múltiplo (MM), leucemia linfocítica crônica (CLL), leucemia linfoblástica aguda (ALL), leucemia mieloide aguda (adultos) (AML), linfoma de células do manto, linfoma folicular (FL) e linfoma difuso de grandes células B (DLBCL).

80. Variante de anticorpo para uso de acordo com a reivindicação 79, caracterizado pelo fato de que o câncer é MM.

81. Variante de anticorpo para uso de acordo com a reivindicação 79, caracterizado pelo fato de que o câncer é CLL.

82. Variante de anticorpo para uso de acordo com a reivindicação 79, caracterizado pelo fato de que o câncer é linfoma de células do manto.

83. Variante de anticorpo para uso de acordo com a reivindicação 79, caracterizado pelo fato de que o câncer é DLBCL.

84. Variante de anticorpo para uso de acordo com a reivindicação 79, caracterizado pelo fato de que o câncer é FL.

85. Variante de anticorpo para uso de acordo com a reivindicação 79, caracterizado pelo fato de que o câncer é leucemia mieloide aguda (adultos) (LMA).

86. Variante de anticorpo para uso de acordo com qualquer uma das reivindicações 71 a 77, caracterizado pelo fato de que o câncer compreende um tumor sólido.

87. Variante de anticorpo para uso de acordo com a reivindicação 86, caracterizada pelo fato de que o tumor sólido é melanoma, câncer de pulmão, câncer de pulmão de células não pequenas escamosas (NSCLC), NSCLC não escamosas, câncer colorretal, câncer de próstata, câncer de próstata resistente à castração, câncer de estômago, câncer de ovário, câncer gástrico, câncer de fígado, câncer de pâncreas, câncer de tireoide, carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço, carcinoma de esôfago ou trato gastrointestinal, câncer de mama, câncer de trompa de falópio, câncer de cérebro, câncer uretral, câncer geniturinário, câncer endometrial, câncer cervical, adenocarcinoma de pulmão, carcinoma de células renais (RCC) (por exemplo, um carcinoma de células claras do rim ou um carcinoma de células papilares renais), mesotelioma, carcinoma nasofaríngeo (NPC), um carcinoma do esôfago ou trato gastrointestinal, ou uma lesão metastática de qualquer um deles.

88. Variante de anticorpo para uso de acordo com a reivindicação 87, caracterizada pelo fato de que o tumor sólido é câncer de

pulmão.

89. Variante de anticorpo para uso de acordo com a reivindicação 87, caracterizada pelo fato de que o tumor sólido é câncer de pulmão de células não pequenas (NSCLC) escamosas.

90. Variante de anticorpo para uso de acordo com a reivindicação 87, caracterizada pelo fato de que o tumor sólido é NSCLC não escamosas.

91. Variante de anticorpo para uso de acordo com a reivindicação 87, caracterizada pelo fato de que o tumor sólido é melanoma.

92. Variante de anticorpo para uso de acordo com a reivindicação 87, caracterizada pelo fato de que o tumor sólido é câncer colorretal.

93. Variante de anticorpo para uso de acordo com a reivindicação 87, caracterizado pelo fato de que o tumor sólido é câncer de próstata.

94. Variante de anticorpo para uso de acordo com a reivindicação 87, caracterizado pelo fato de que o tumor sólido é câncer de próstata resistente à castração.

95. Variante de anticorpo para uso de acordo com a reivindicação 87, caracterizado pelo fato de que o tumor sólido é câncer de estômago.

96. Variante de anticorpo para uso de acordo com a reivindicação 87, caracterizada pelo fato de que o tumor sólido é câncer de ovário.

97. Variante de anticorpo para uso de acordo com a reivindicação 87, caracterizado pelo fato de que o tumor sólido é câncer gástrico.

98. Variante de anticorpo para uso de acordo com a reivindicação 87, caracterizada pelo fato de que o tumor sólido é câncer de

fígado.

99. Variante de anticorpo para uso de acordo com a reivindicação 87, caracterizada pelo fato de que o tumor sólido é câncer pancreático.

100. Variante de anticorpo para uso de acordo com a reivindicação 87, caracterizada pelo fato de que o tumor sólido é câncer de tireoide.

101. Variante de anticorpo para uso de acordo com a reivindicação 87, caracterizado pelo fato de que o tumor sólido é carcinoma de células escamosas da cabeça e pescoço.

102. Variante de anticorpo para uso de acordo com a reivindicação 87, caracterizado pelo fato de que o tumor sólido é carcinoma do esôfago ou do trato gastrointestinal.

103. Variante de anticorpo para uso de acordo com a reivindicação 87, caracterizado pelo fato de que o tumor sólido é câncer de mama.

104. Variante de anticorpo para uso de acordo com a reivindicação 87, caracterizado pelo fato de que o tumor sólido é câncer das trompas de falópio.

105. Variante de anticorpo para uso de acordo com a reivindicação 87, caracterizada pelo fato de que o tumor sólido é câncer cerebral.

106. Variante de anticorpo para uso de acordo com a reivindicação 87, caracterizada pelo fato de que o tumor sólido é câncer uretral.

107. Variante de anticorpo para uso de acordo com a reivindicação 87, caracterizado pelo fato de que o tumor sólido é câncer geniturinário.

108. Variante de anticorpo para uso de acordo com a

reivindicação 87, caracterizada pelo fato de que o tumor sólido é câncer endometrial.

109. Variante de anticorpo para uso de acordo com a reivindicação 87, caracterizado pelo fato de que o tumor sólido é câncer cervical.

110. Variante de anticorpo para uso de acordo com qualquer uma das reivindicações 86 a 109, caracterizado pelo fato de que o tumor sólido carece de expressão de CD38 detectável.

111. Variante de anticorpo para uso de acordo com qualquer uma das reivindicações 74 a 110, caracterizado pelo fato de que o câncer está em um paciente que compreende células T reguladoras que expressam CD38.

112. Variante de anticorpo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 42, caracterizado pelo fato de ser para uso no tratamento ou prevenção da artrite reumatoide.

113. Método para tratar uma doença, caracterizado pelo fato de que compreende células que expressam CD38, compreendendo a administração da variante de anticorpo como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 42, 68, um ácido nucleico como definido em qualquer uma das reivindicações 43, 45 a 47, uma combinação de ácidos nucleicos como definida na reivindicação 48, um vetor de expressão como definido na reivindicação 44, um veículo de dispensação como definido em qualquer uma das reivindicações 49 a 54, ou uma composição como definido em qualquer uma das reivindicações 69 a 70, a um paciente em necessidade do mesmo.

114. Método de acordo com a reivindicação 113, caracterizado pelo fato de que a variante de anticorpo ou composição farmacêutica é administrada em uma quantidade terapeuticamente eficaz e/ou por um tempo suficiente para tratar a doença.

115. Método de acordo com a reivindicação 113 ou 114, caracterizado pelo fato de que compreende adicionalmente os recursos como definidos em qualquer uma das reivindicações 73 a 112.

FIG. 1

```

IgG1  247  PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL  306
IgG1f 247  PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL  306
IgG2   PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVL
IgG3   PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFKWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTFRVVSVL
IgG4   PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVL
      *****:*****:*****:*****:*****

IgG1  307  TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLT  366
IgG1f 307  TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT  366
IgG2   TVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT
IgG3   TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT
IgG4   TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLT
      **:*****:*****:*****:*****:*****

IgG1  367  CLVKGFPYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSS  426
IgG1f 367  CLVKGFPYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSS  426
IgG2   CLVKGFPYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSS
IgG3   CLVKGFPYPSDIAVEWESSGQPENNYNTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNIFSCS
IgG4   CLVKGFPYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFCSS
      *****:*****:*****:*****:*****

IgG1  427  VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK  447
IgG1f 427  VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK  447
IgG2   VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
IgG3   VMHEALHNRFTQKSLSLSPGK
IgG4   VMHEALHNHYTQKSLSLSLGK
      *****:***** **

```

FIG. 2

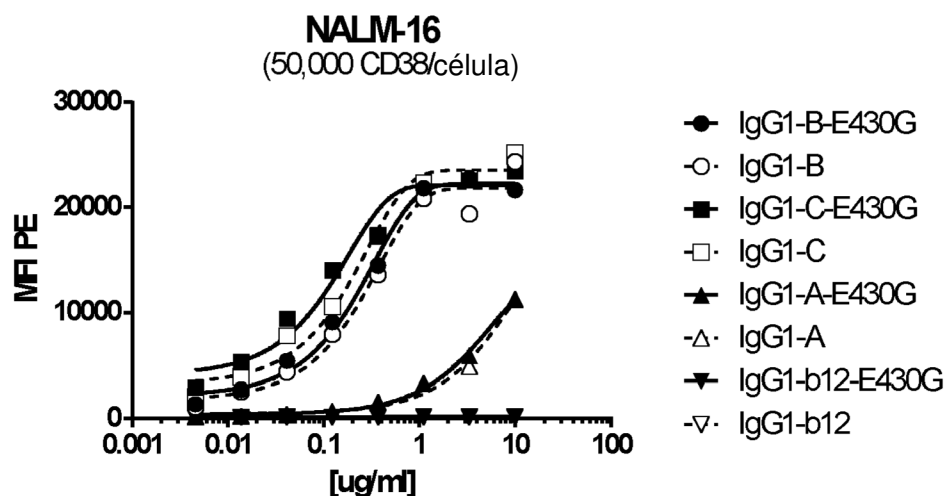


FIG. 3A

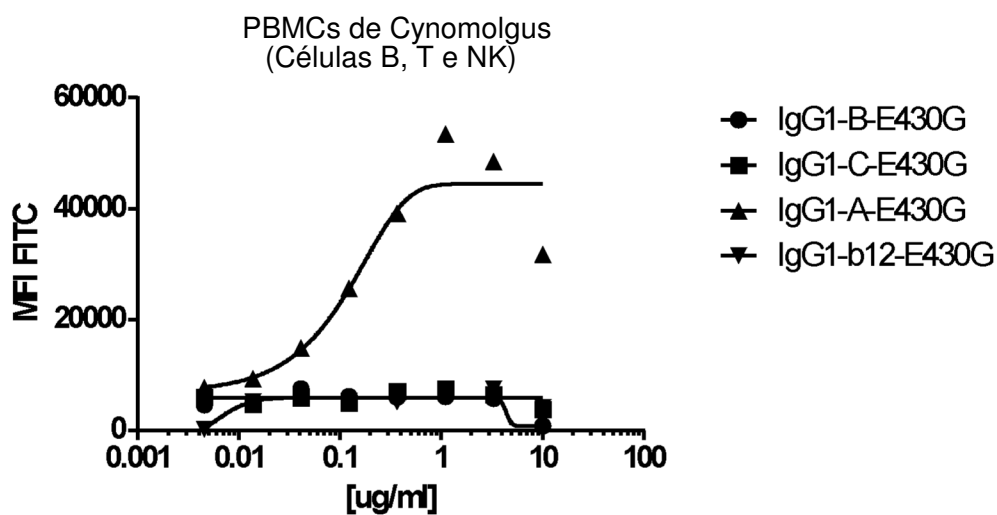


FIG. 3B

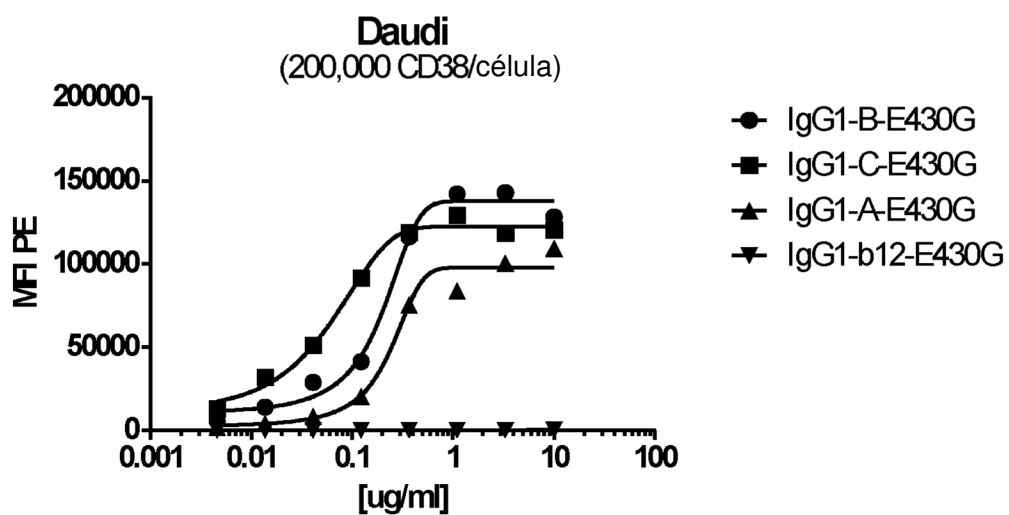


FIG. 4

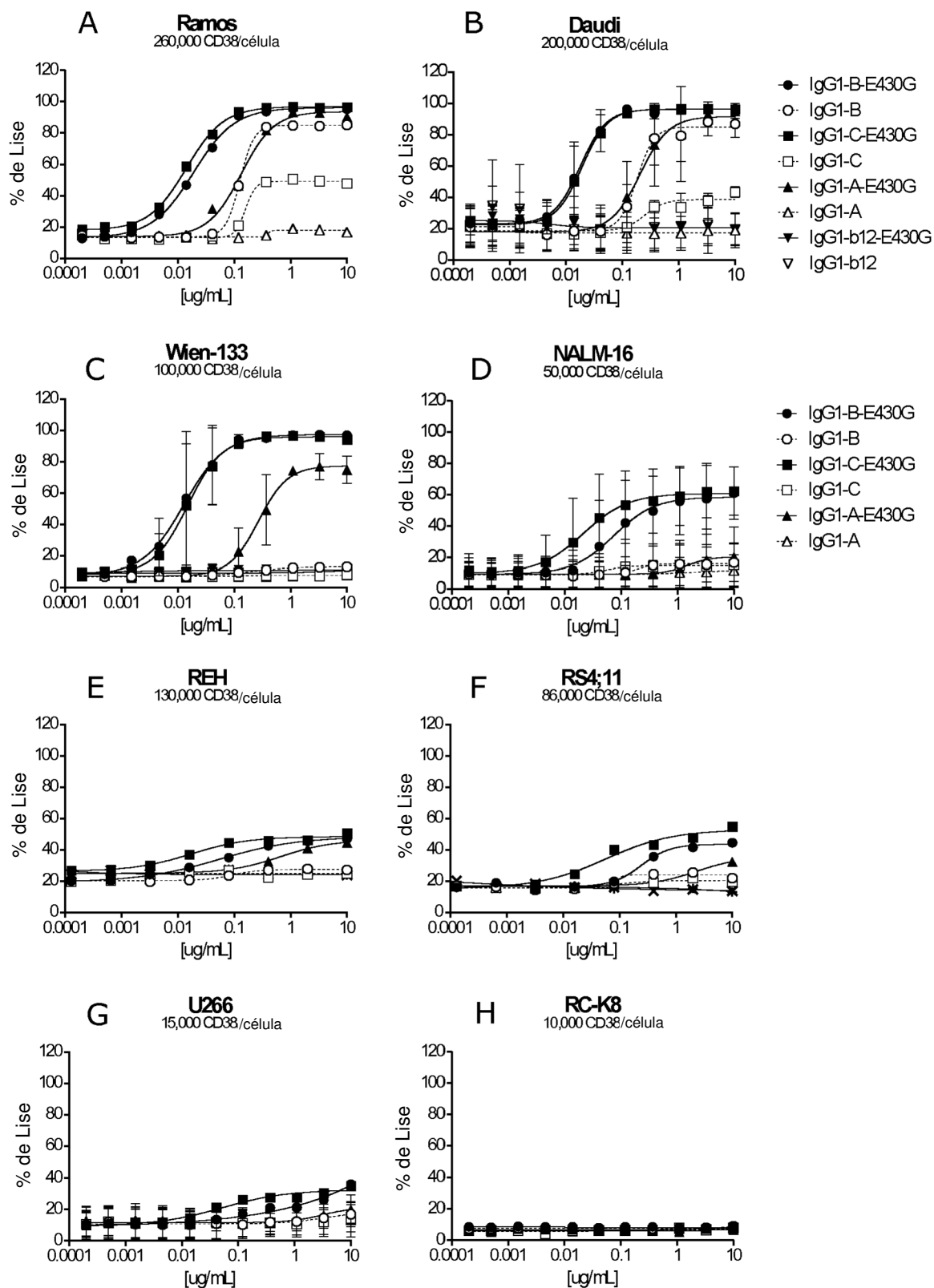


FIG. 5

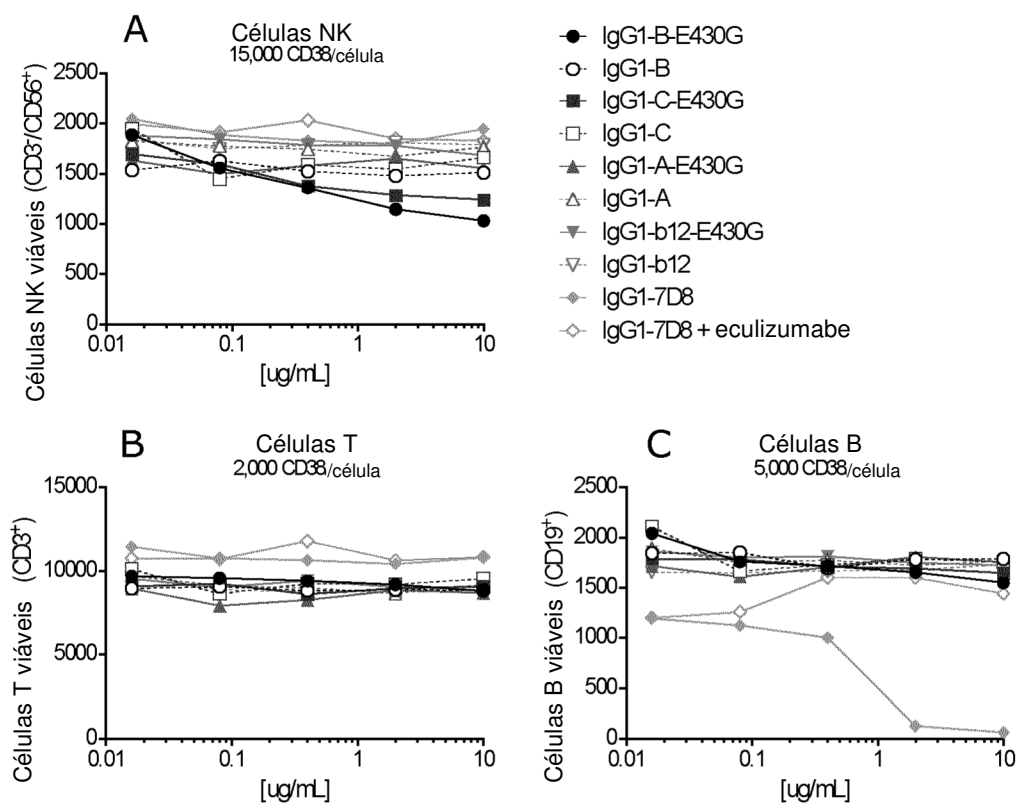


FIG. 6

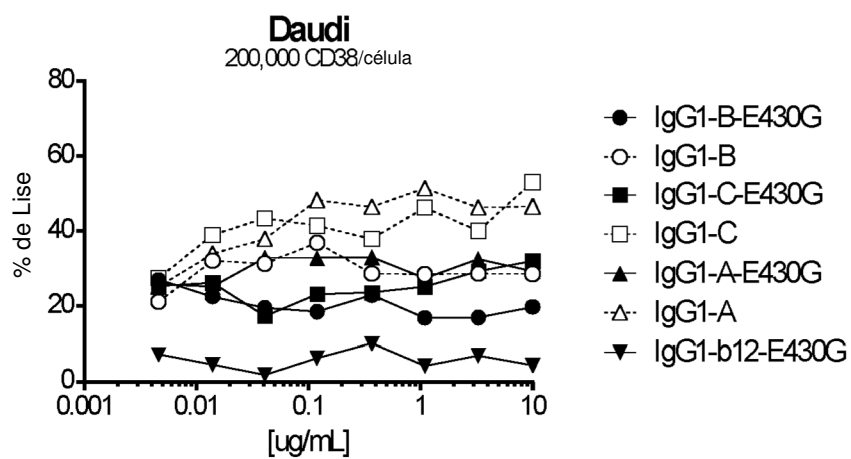


FIG. 7

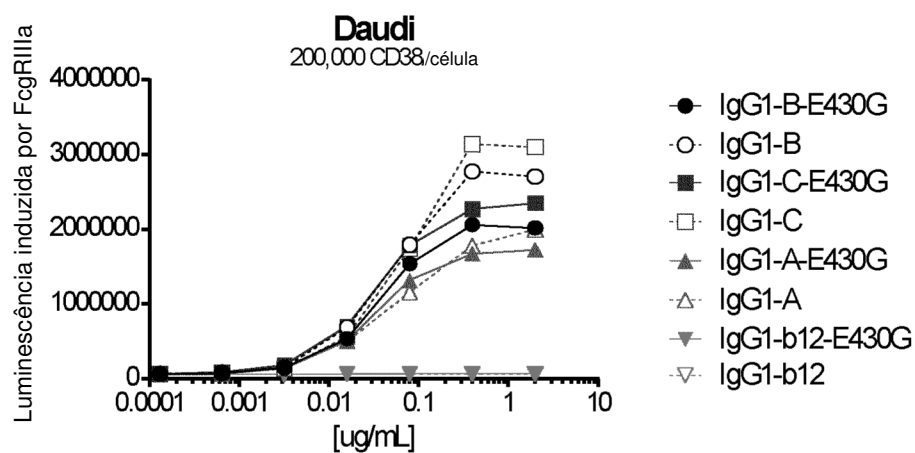


FIG. 8

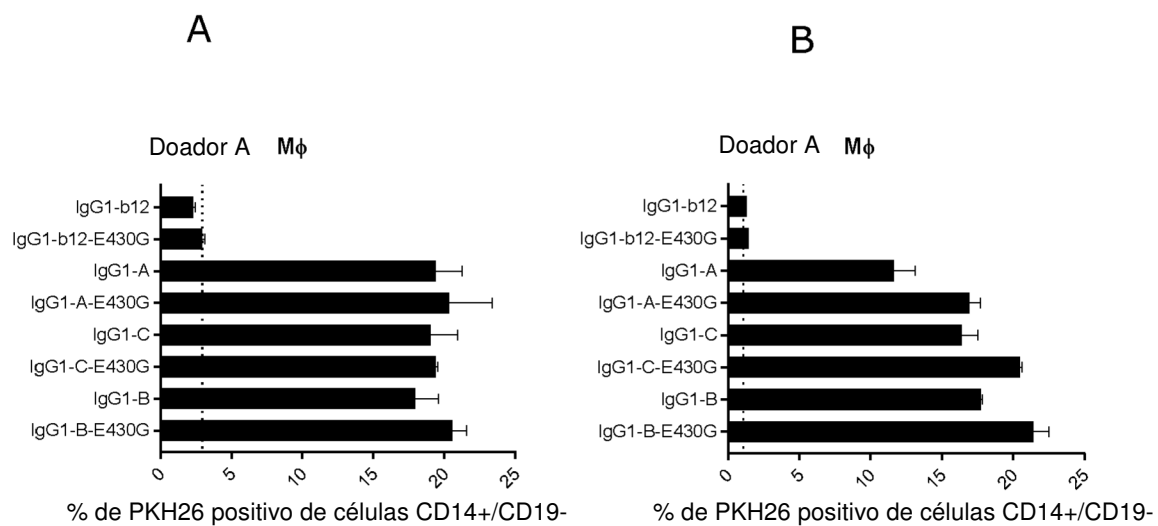


FIG. 9

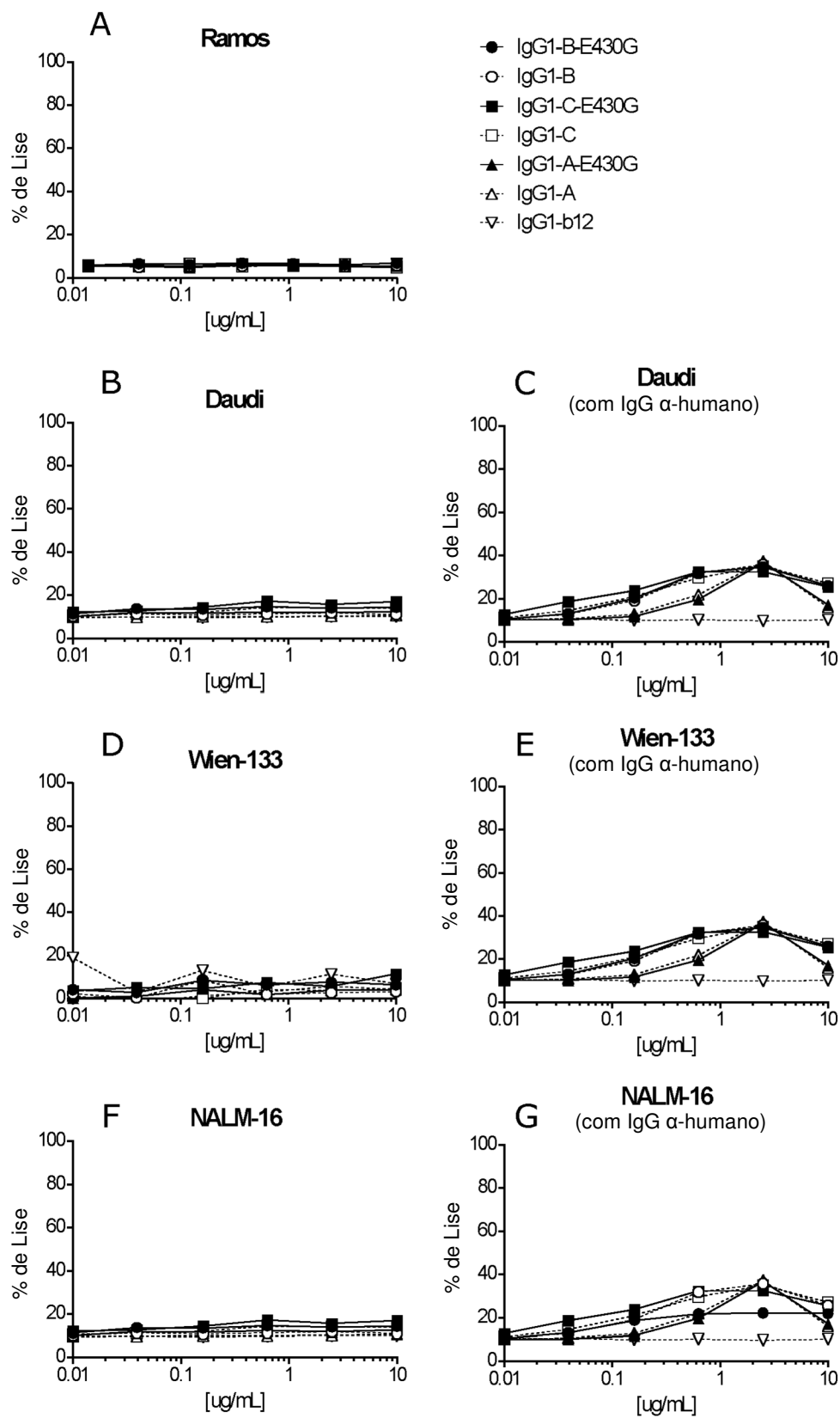


FIG. 10

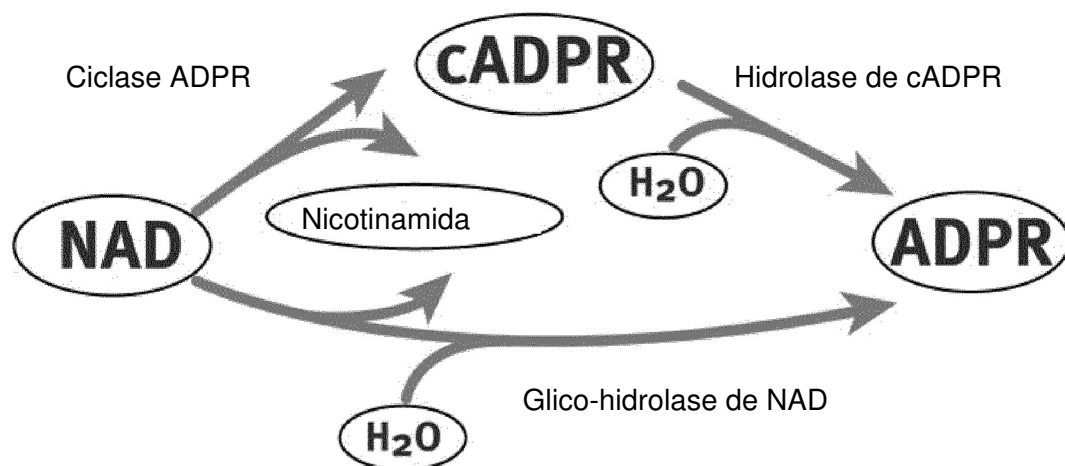


FIG. 11

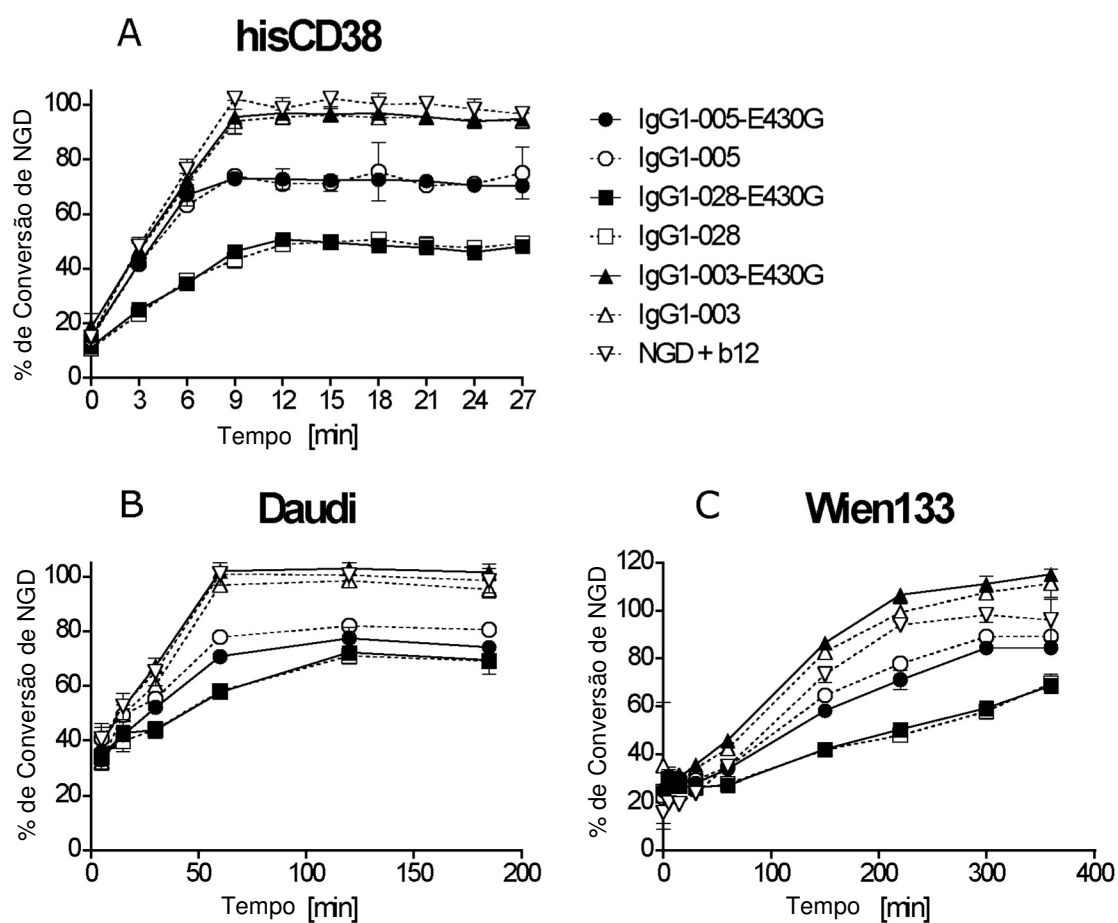


FIG. 12

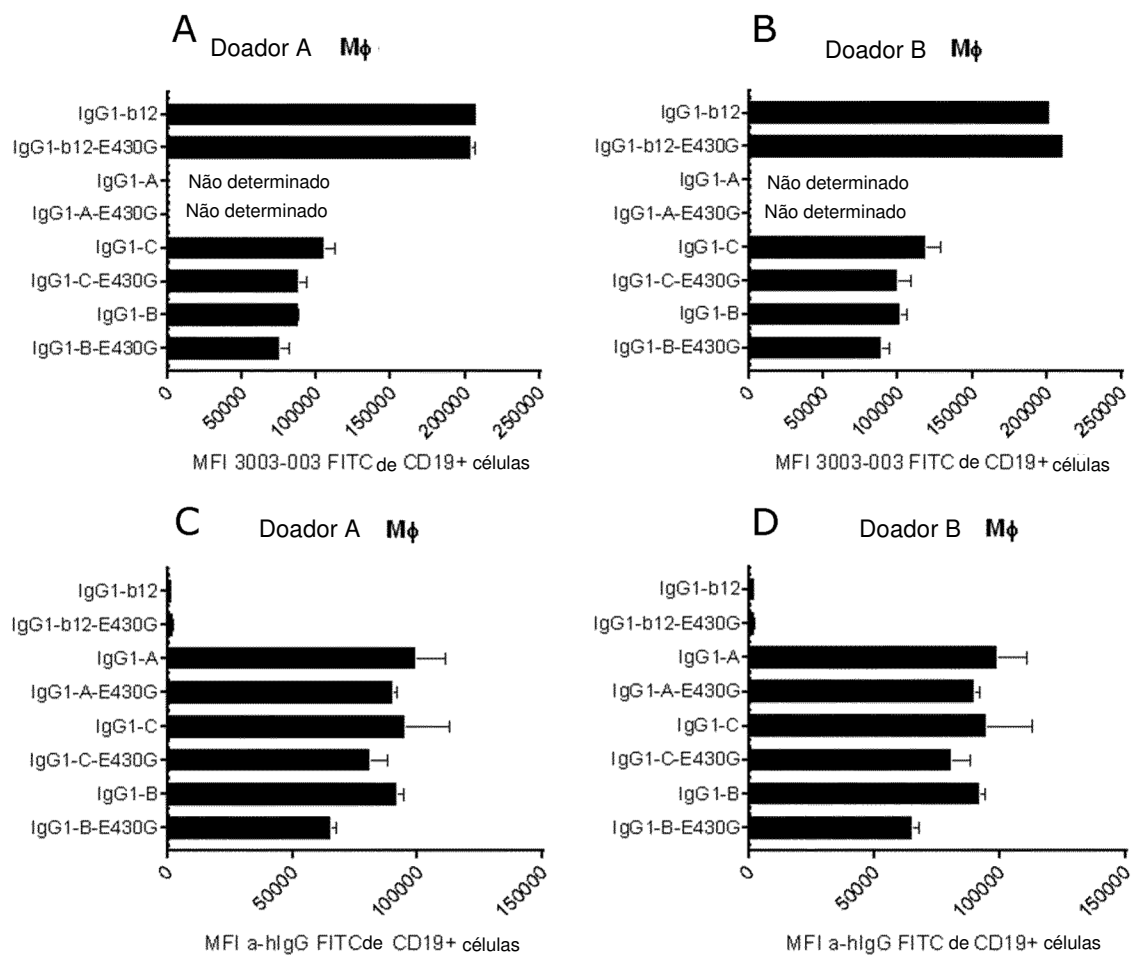


FIG. 13

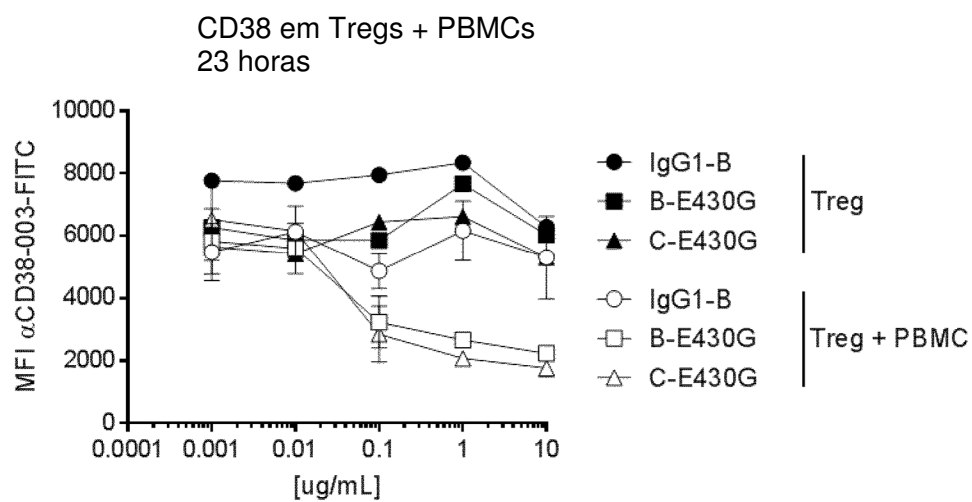


FIG. 14

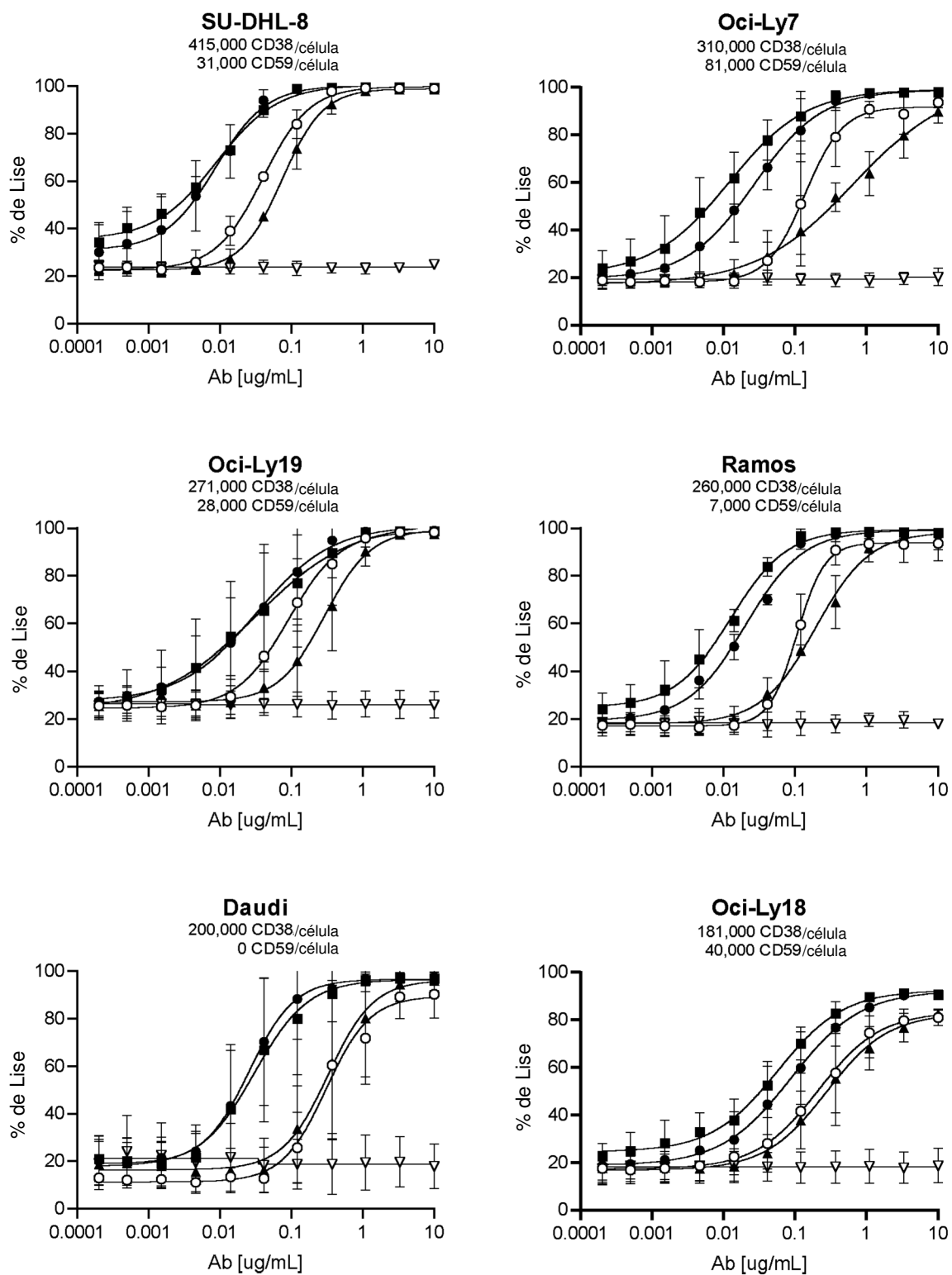


FIG. 14 continuação

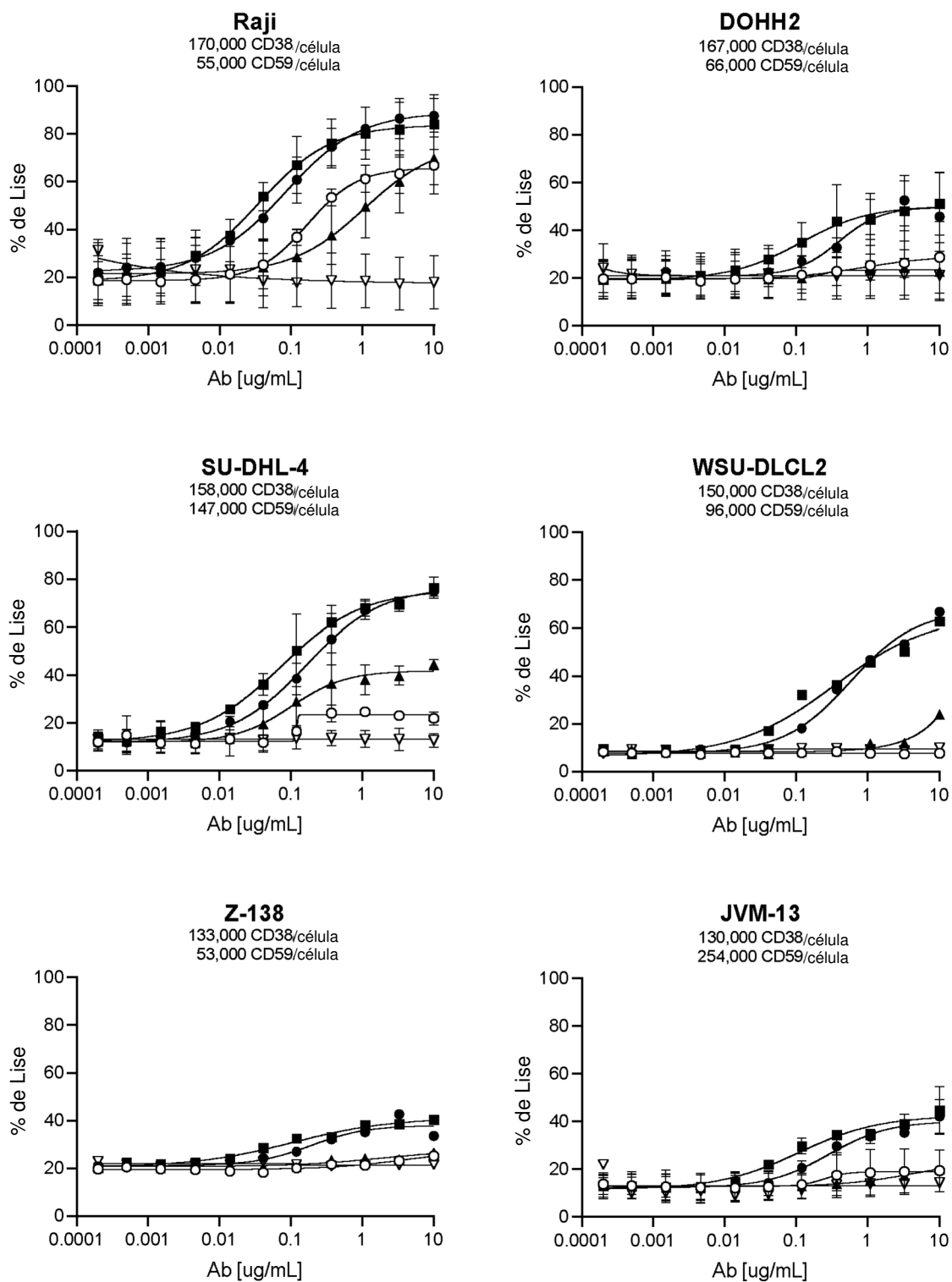


FIG. 14 continuação

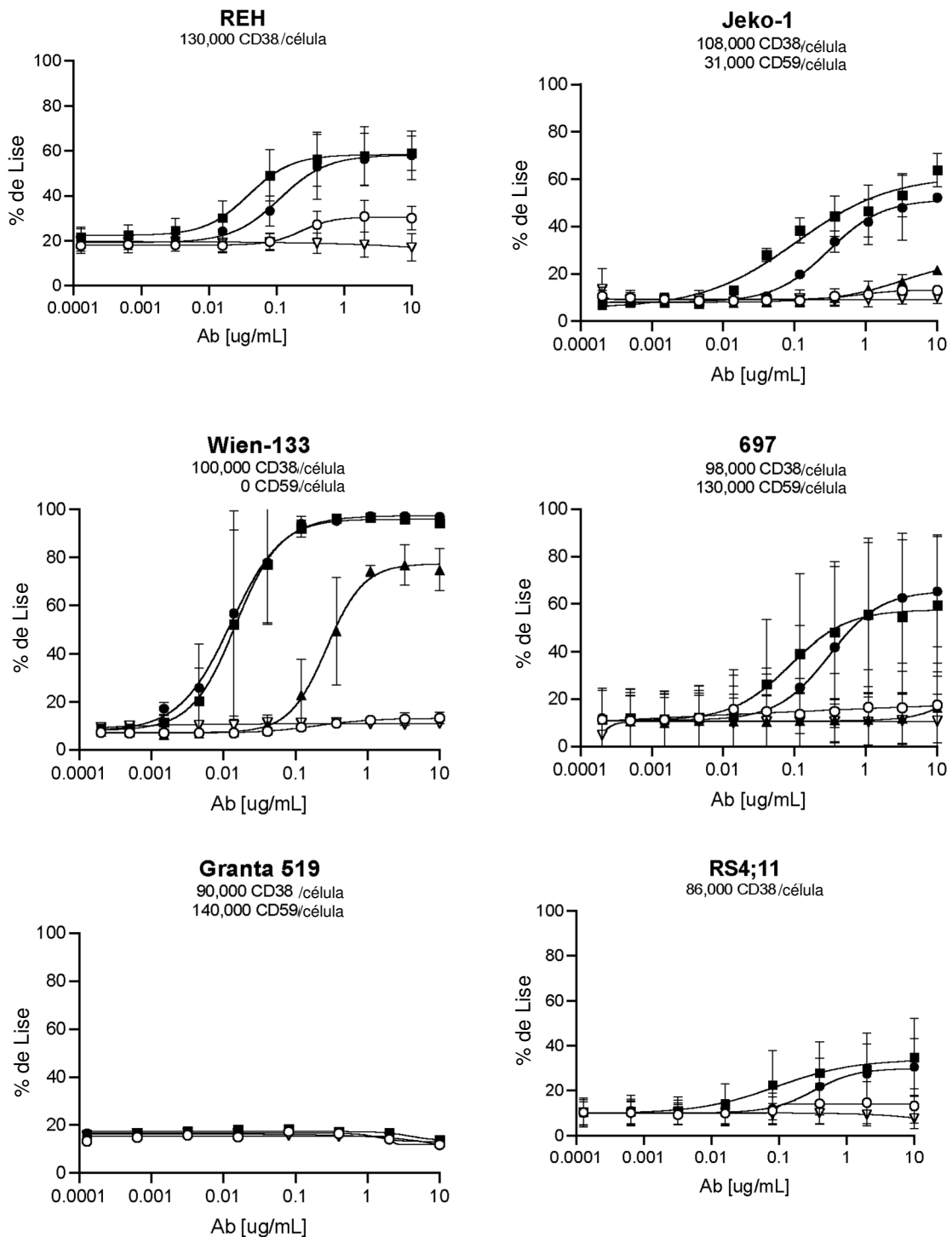


FIG. 14 continuação

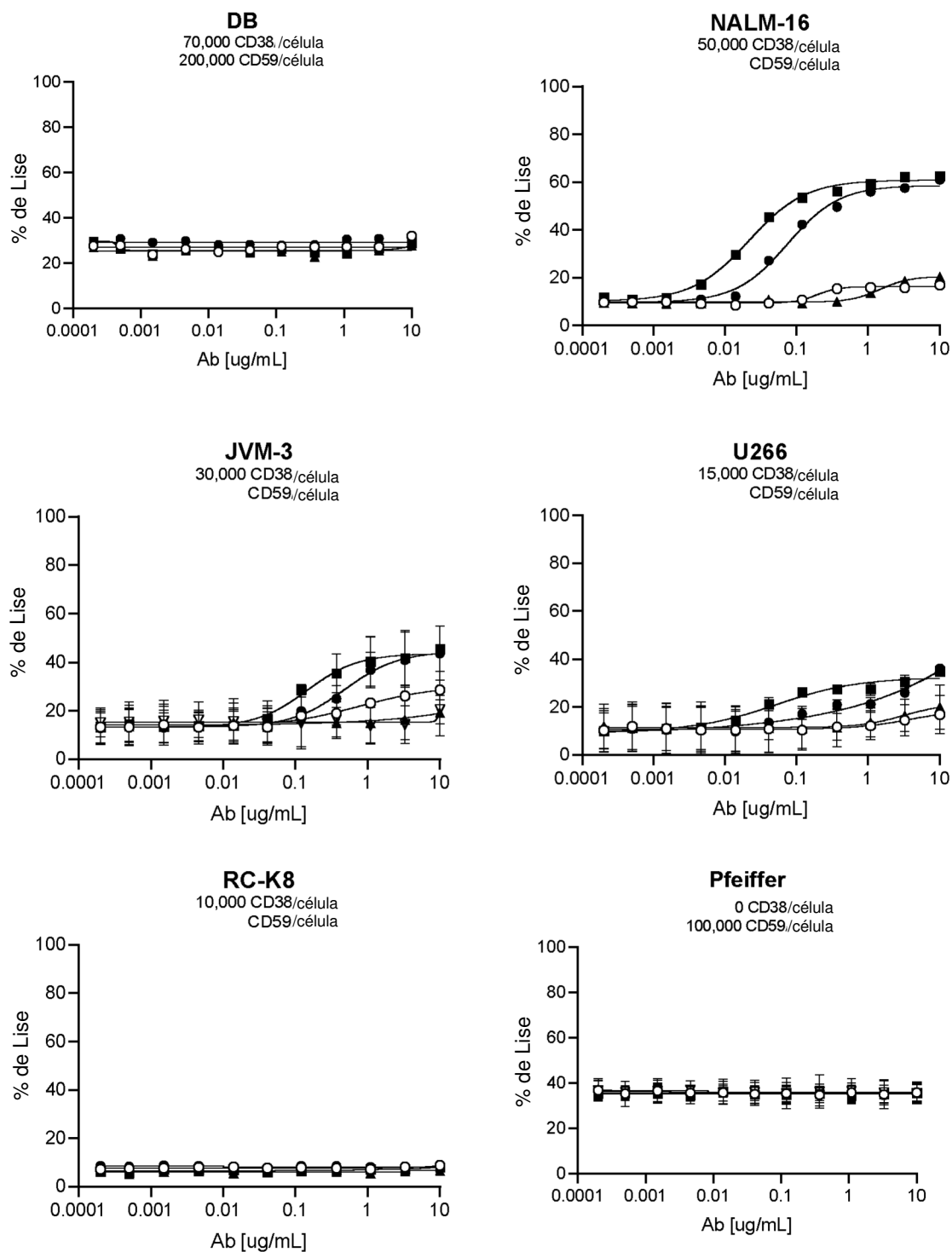


FIG. 15

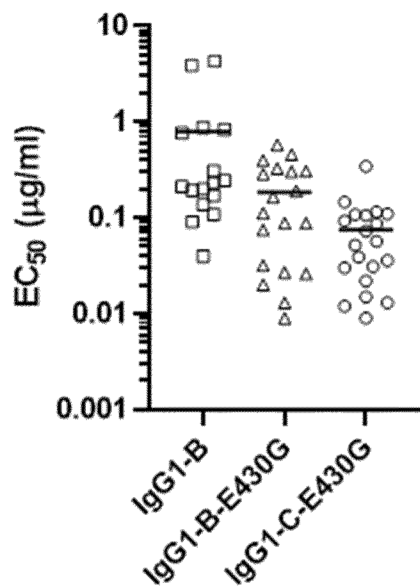


FIG. 16

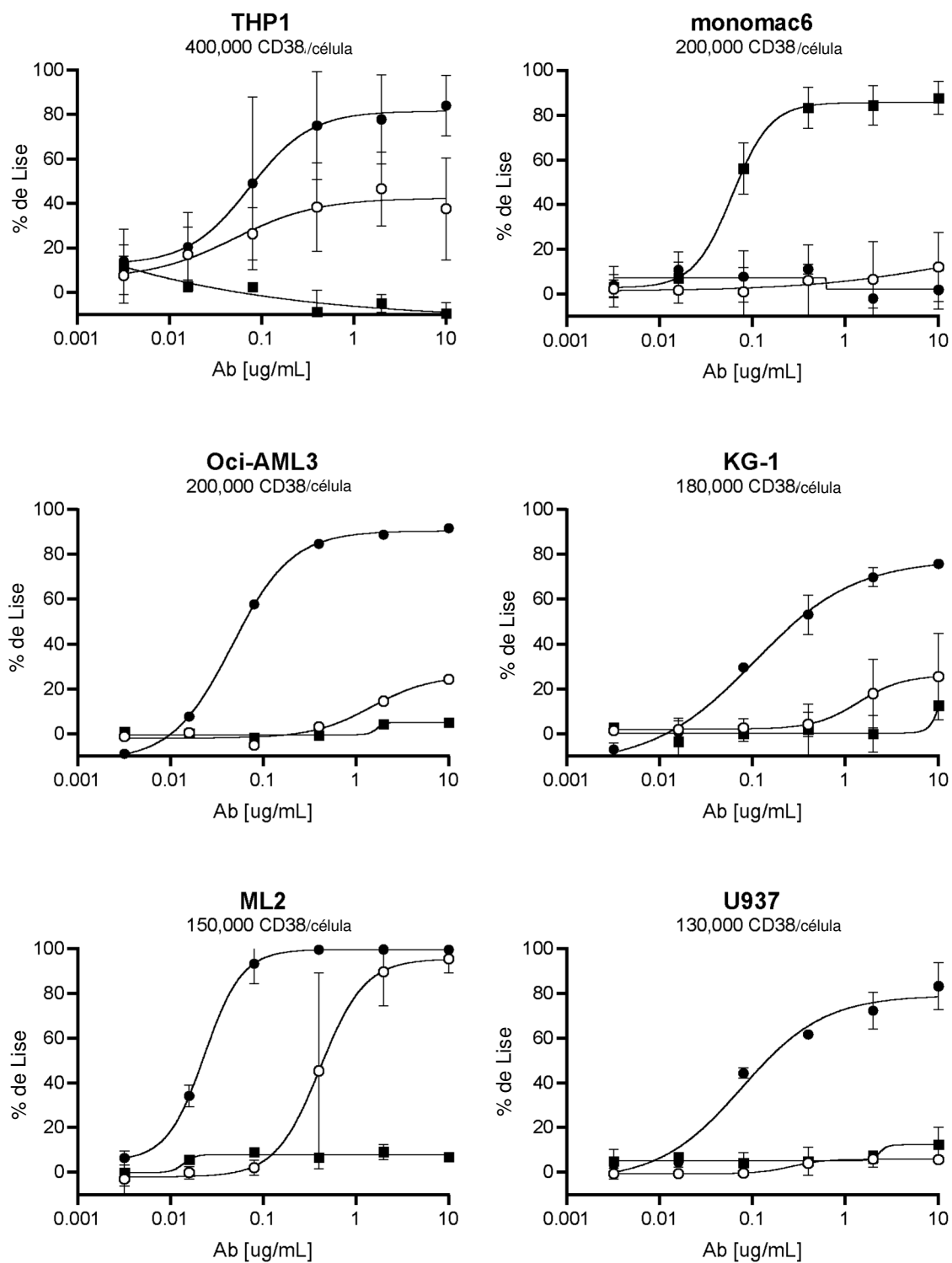


FIG. 16 continuação

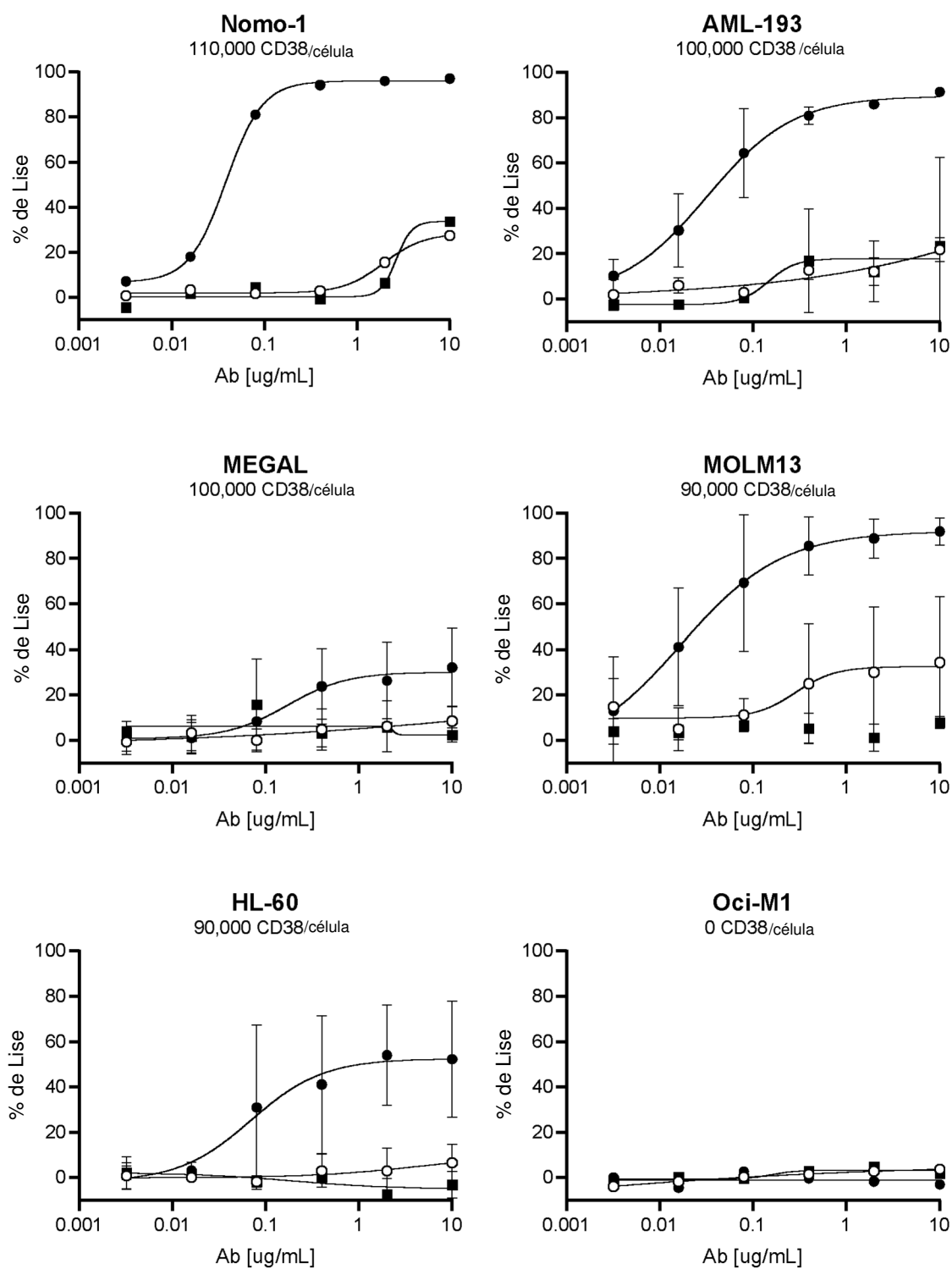


FIG. 17

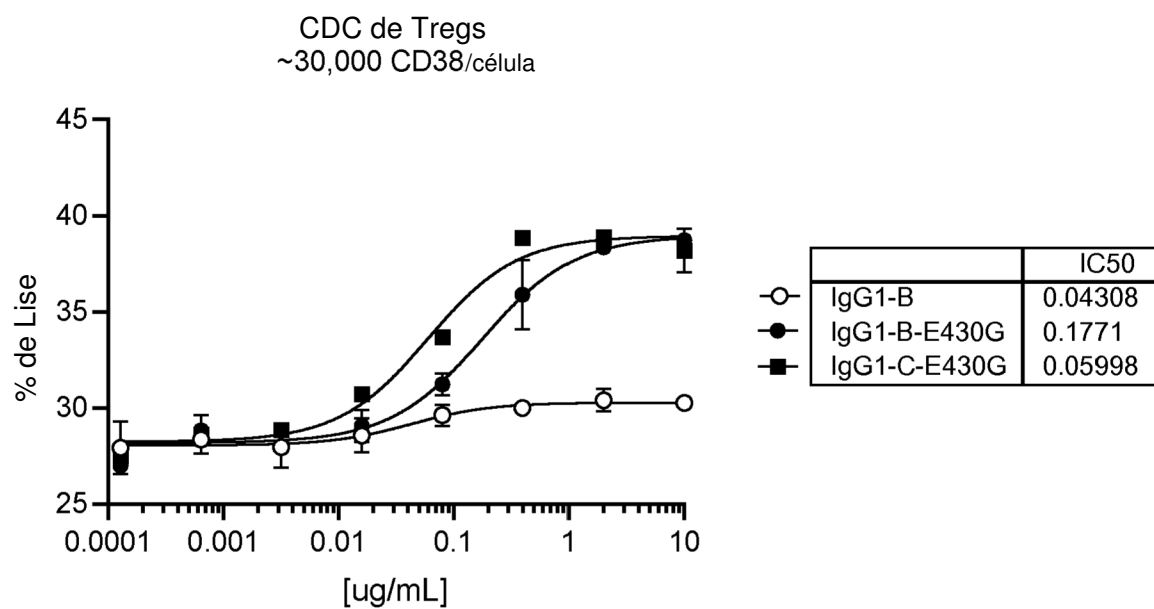


FIG. 18

Doador B

Doador C

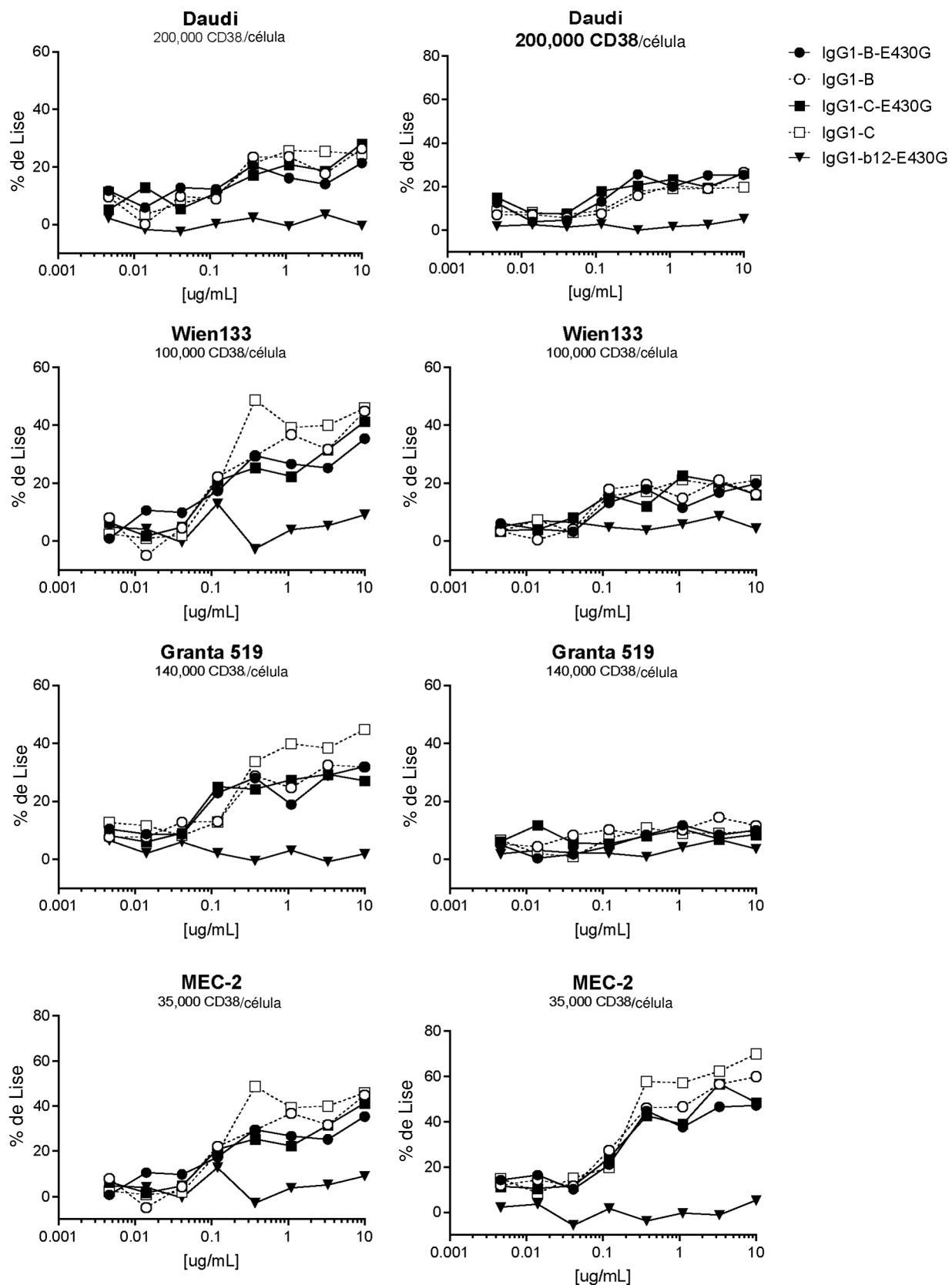


FIG. 19

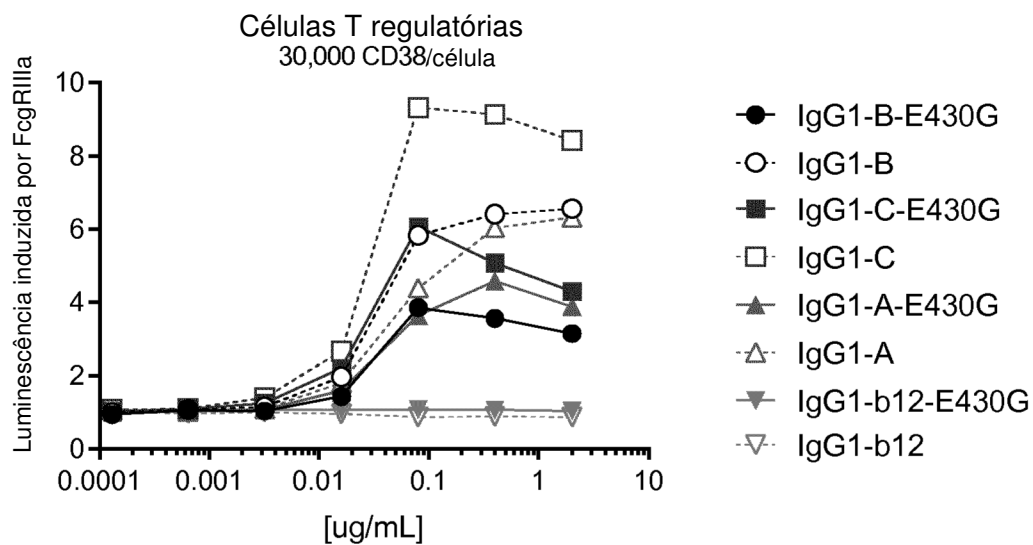


FIG. 20

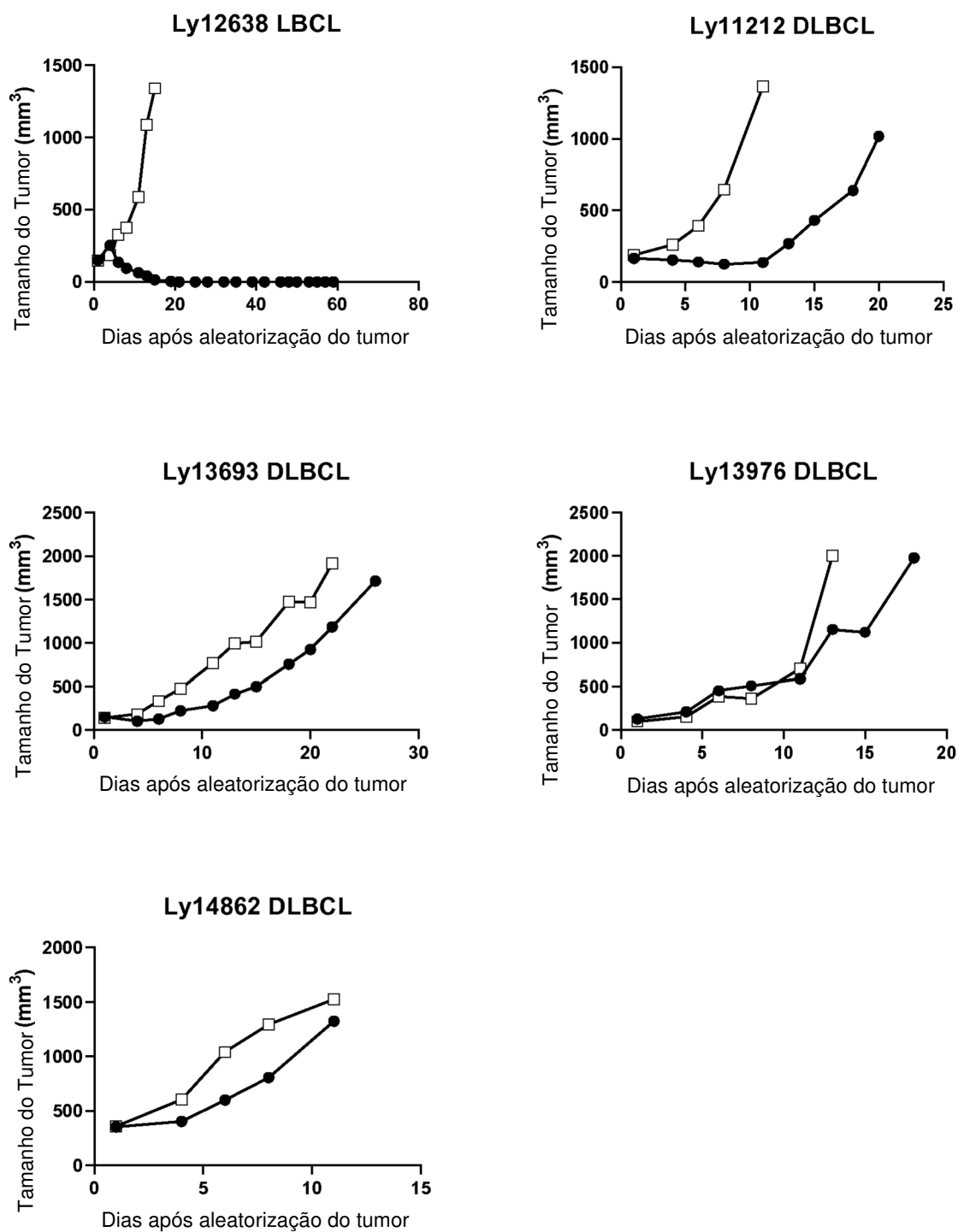


FIG. 21

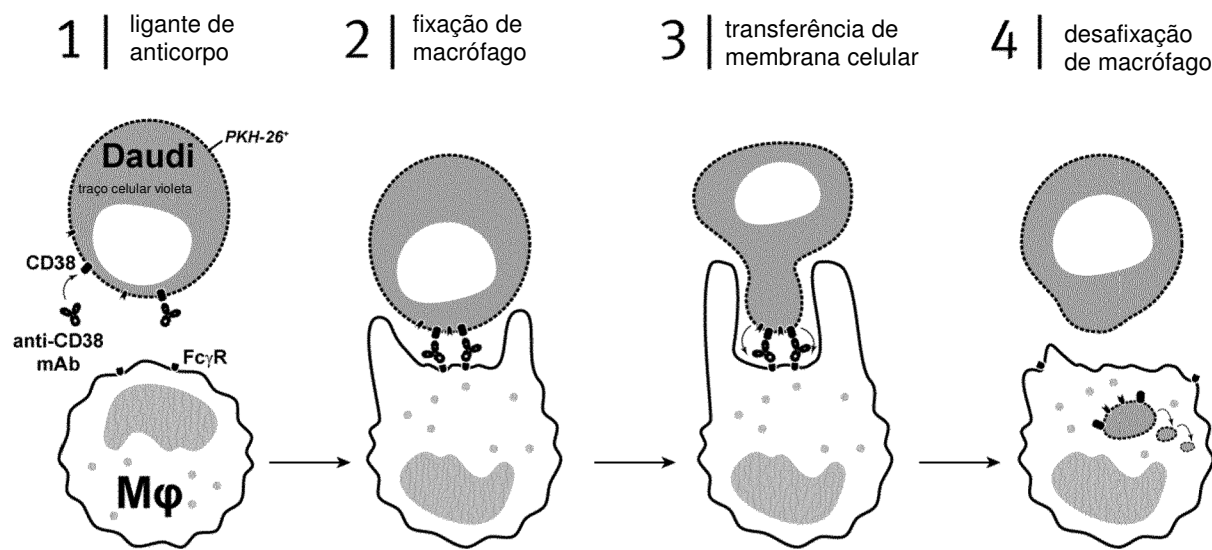
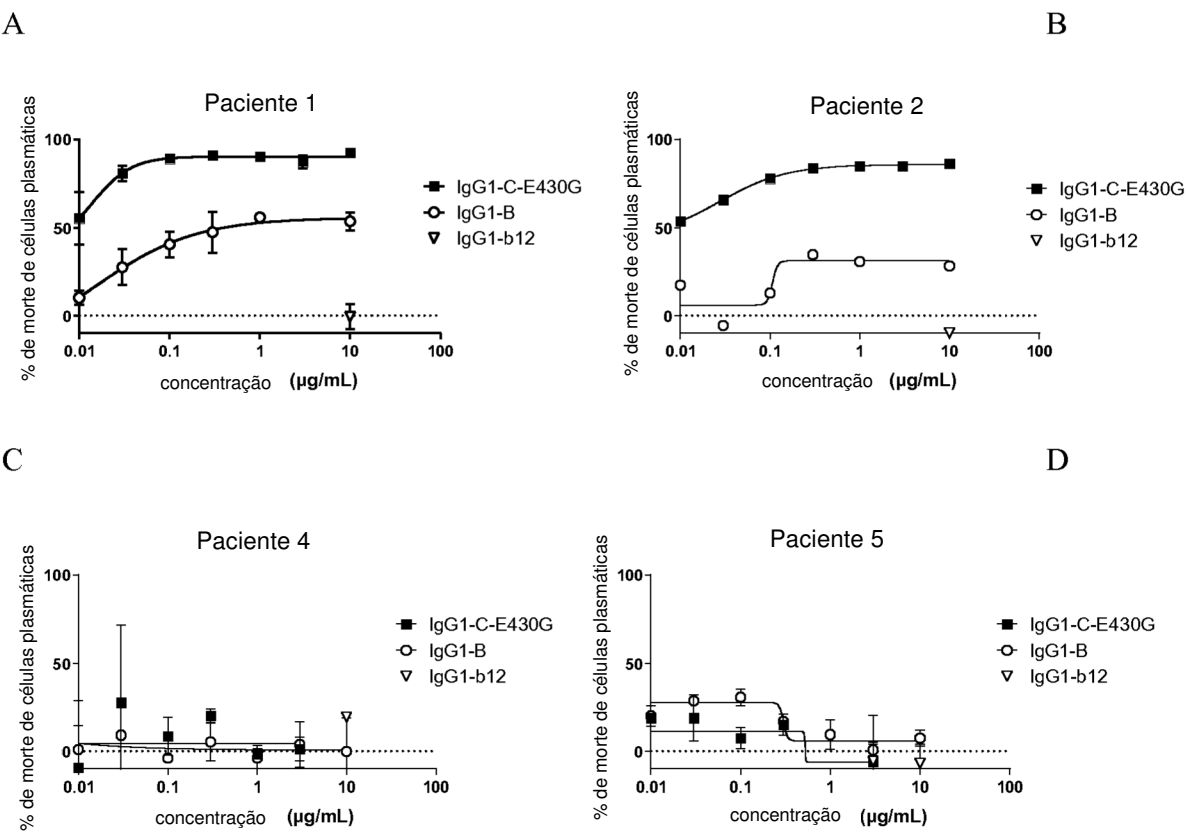


FIG. 22



RESUMO

VARIANTE DE ANTICORPO, ÁCIDO NUCLEICO ISOLADO, VETOR DE EXPRESSÃO, ÁCIDO NUCLEICO, COMBINAÇÃO DE ÁCIDOS NUCLEICOS, VEÍCULO DE DISPENSAÇÃO, CÉLULA HOSPEDEIRA RECOMBINANTE, MÉTODOS PARA PRODUÇÃO DE UMA VARIANTE DE UM ANTICORPO, PARA AUMENTAR PELO MENOS UMA FUNÇÃO EFETORA DE UM ANTICORPO PARENTAL E PARA TRATAR UMA DOENÇA, ANTICORPO, COMPOSIÇÃO, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, E, VARIANTE DE ANTICORPO PARA USO

Variantes de anticorpos que compreendem uma ou mais mutações na região do Fc, particularmente anticorpos anti-CD38 que compreendem uma mutação em um ou mais resíduos de aminoácidos que correspondem a E430, E345 e S440 em uma cadeia pesada de IgG1 humano, em que os resíduos de aminoácidos são numerados de acordo com o índice da UE.

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

Código de Controle

Campo 1



Campo 2



Outras Informações:

- Nome do Arquivo: 45597007.txt
- Data de Geração do Código: 22/12/2020
- Hora de Geração do Código: 16:19:04
- Código de Controle:
 - Campo 1: E2863E573C507A30
 - Campo 2: 93207A3295765DB5