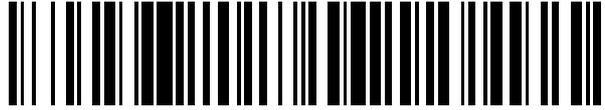


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 541 436**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.02.2005 E 05769690 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.04.2015 EP 1720907**

54 Título: **Anticuerpos humanos anti-CD38 y usos para ellos**

30 Prioridad:

06.02.2004 US 541911 P

26.02.2004 US 547584 P

18.03.2004 US 553948 P

06.08.2004 US 599014 P

01.10.2004 US 614471 P

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

20.07.2015

73 Titular/es:

MORPHOSYS AG (100.0%)

LENA-CHRIST-STRASSE 48

82152 MARTINSRIED/MÜNCHEN, DE

72 Inventor/es:

TESAR, MICHAEL y

JAGER, UTE

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 541 436 T3

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

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos humanos anti-CD38 y usos para ellos

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

- 5 CD38 es una glicoproteína membránica de tipo II y pertenece a la familia de ectoenzimas, debido a su actividad enzimática como ADP ribosil-ciclasa y cADP-hidrolasa. Durante la ontogenia, CD38 aparece en células madre comprometidas con CD34+ y progenitores de células linfoides, eritroides y mieloides comprometidos con el linaje. Se entiende que la expresión de CD38 persiste solamente en el linaje linfoide, a través de las etapas tempranas de desarrollo de linfocitos T y B.
- 10 El aumento de CD38 sirve como un marcador para la activación de linfocitos – en particular la diferenciación de linfocitos B a lo largo de la ruta plasmacitoide. Se postulan funciones (co)receptoras de CD38 que conducen a señalización intracelular o comunicación intercelular vía su ligando, CD31, así como su papel como un regulador intracelular de un segundo mensajero, ADPr cíclica, en una variedad de cascadas de señalización. Sin embargo, todavía está por elucidar su importancia fisiológica, puesto que la genosupresión del análogo murino o los autoanticuerpos anti-CD38 en seres humanos no parece ser perjudicial.
- 15 Aparte de observar su expresión en el sistema hematopoyético, los investigadores han observado el aumento de CD38 en diversas estirpes celulares derivadas de tumores de linfocitos B, T, y tumores mieloides/monocíticos, incluyendo la leucemia linfoblástica aguda (ALL) de linfocitos B o T, leucemia mieloide aguda (AML), linfoma no de Hodgkin (NHL) y mieloma múltiple (MM). En MM, por ejemplo, la fuerte expresión de CD38 se observa en la mayoría de todas las muestras de pacientes.
- 20 Por tanto, la sobreexpresión de CD38 en células neoplásicas proporciona una diana terapéutica atractiva para inmunoterapia. De especial atracción es el hecho de que la mayoría de las células madre pluripotentes primitivas del sistema hematopoyético son CD38-negativas, y que el grado de efectos citotóxicos por ADCC o CDC se correlaciona bien con los niveles de expresión de la diana respectiva.
- 25 Los enfoques actuales de terapias anti-CD38 se pueden dividir en dos grupos: enfoques in vivo y ex vivo. En los enfoques in vivo, los anticuerpos anti-CD38 se administran a un sujeto que necesita terapia a fin de provocar el agotamiento, mediado por anticuerpos, de células neoplásicas que sobreexpresan CD38. El agotamiento se puede lograr mediante ADCC mediada por anticuerpos y/o CDC mediante células efectoras, o usando los anticuerpos anti-CD38 como directores para el transporte de sustancias citotóxicas, por ejemplo saporina, a las células diana, e internalización subsiguiente. En el enfoque ex vivo, la población celular, por ejemplo células de médula ósea, que comprende células neoplásicas que sobreexpresan CD38, se eliminan de un individuo que necesite tratamiento y se ponen en contacto con anticuerpos anti-CD38. Las células diana son destruidas mediante sustancias citotóxicas, por ejemplo saporina, como se describe para el enfoque in vivo, o se eliminan poniendo en contacto la población celular con anticuerpos anti-CD38 inmovilizados, eliminando así de la mezcla células diana que sobreexpresan CD38. Después, la población celular agotada se reinserta en el paciente.
- 30
- 35 Los anticuerpos específicos para CD38 se pueden dividir en grupos diferentes, dependiendo de diversas propiedades. Un anticuerpo humanizado y uno quimérico derivados del anticuerpo de alta afinidad murino AT13/5 desarrollados contra CD38 dirigen de forma eficaz la citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo contra líneas celulares CD38-positivas (Ellis et al., 1995). Se utilizó un anticuerpo quimérico preparado a partir del anticuerpo OKT10 en estudios preliminares en pacientes con un mieloma florido (Stevenson et al., 1991). La unión de algunos anticuerpos a la molécula CD38 (predominantemente aa 220-300) puede accionar actividades en la célula diana, tales como la liberación de Ca²⁺, liberación de citocinas, sucesos de fosforilación y estimulación del crecimiento en base a la especificidad del anticuerpo respectivo (Konopleva et al., 1998; Ausiello et al., 2000), pero no se ha podido observar ninguna correlación clara entre el sitio de unión de los diversos anticuerpos conocidos y sus propiedades (no) agonistas (Funaro et al., 1990).
- 40
- 45 Se sabe relativamente poco sobre la eficacia de anticuerpos anti-CD38 publicados. Lo que se sabe es que todos los anticuerpos conocidos parecen reconocer exclusivamente epítomos (restos de aminoácidos 220 a 300) situados en el parte C-terminal de CD38. No se conocen hasta ahora anticuerpos que sean específicos para epítomos en la parte N-terminal de CD38 distante del sitio activo en la secuencia proteica primaria. Sin embargo, se ha encontrado que OKT10, que ha estado en ensayos clínicos, tiene una afinidad y eficacia relativamente bajas cuando se analiza como constructo quimérico que comprende una parte Fc humana. Además, OKT10 es un anticuerpo murino que lo hace inadecuado para la administración a seres humanos. Recientemente se ha descrito (documento WO 02/06347) un fragmento de anticuerpo scFv anti-CD38 humano. Sin embargo, ese anticuerpo es específico para un epítipo de CD38 expresado selectivamente.
- 50
- 55 Correspondientemente, a la luz del gran potencial para la terapia con anticuerpos anti-CD38, existe una gran necesidad de anticuerpos anti-CD38 humanos con afinidad elevada y con eficacia elevada a la hora de mediar la muerte mediante ADCC y/o CDC de células neoplásicas que sobreexpresan CD38.
- La presente invención satisface estas y otras necesidades al proporcionar anticuerpos anti-CD38 completamente

humanos y muy eficaces, como se describen más abajo.

SUMARIO DE LA INVENCION

Un objeto de la invención es proporcionar anticuerpos humanos que puedan mediar de forma eficaz el exterminio de células que sobreexpresan CD38.

5 Es otro objeto de la invención proporcionar anticuerpos que sean seguros para la administración a seres humanos.

La presente invención proporciona un anticuerpo anti-CD38 humano específico o un fragmento funcional del mismo que comprende una región H-CDR1, H-CDR2 y H-CDR3 representada en SEQ ID NO: 5; y una región L-CDR1, L-CDR2 y L-CDR3 representada en SEQ ID NO:13. En una realización, el anticuerpo o fragmento funcional del mismo comprende una cadena pesada variable representada en SEQ ID NO: 5 y una cadena ligera variable representada en SEQ ID NO:13. La presente invención proporciona además una composición que comprende ácidos nucleicos que codifican la cadena pesada y la cadena ligera del anticuerpo anterior o fragmento funcional del mismo. En una realización, la composición comprende SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 9.

La presente invención proporciona además un anticuerpo anti-CD38 humano específico o fragmento funcional del mismo que comprende una región H-CDR1, H-CDR2 y H-CDR3 representada en SEQ ID NO: 6; y una región L-CDR1, L-CDR2 y L-CDR3 representada en SEQ ID NO: 14. En una realización, el anticuerpo o fragmento funcional del mismo comprende una cadena pesada variable representada en SEQ ID NO:6 y una cadena ligera variable representada en SEQ ID NO:14. La presente invención proporciona además una composición que comprende ácidos nucleicos que codifican la cadena pesada y la cadena ligera del anticuerpo humano anterior o fragmento funcional del mismo. En una realización, la composición comprende SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 10.

La presente invención proporciona además un anticuerpo anti-CD38 humano específico o fragmento funcional del mismo que comprende una región H-CDR1, H-CDR2 y H-CDR3 representada en SEQ ID NO: 7; y una región L-CDR1, L-CDR2 y L-CDR3 representada en SEQ ID NO:15. En una realización, el anticuerpo o fragmento funcional del mismo comprende una cadena pesada variable representada en SEQ ID NO:7 y una cadena ligera variable representada en SEQ ID NO:15. La presente invención proporciona además una composición que comprende ácidos nucleicos que codifican la cadena pesada y la cadena ligera del anticuerpo anterior o fragmento funcional del mismo. En una realización, la composición comprende SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 11.

La presente invención proporciona además un anticuerpo anti-CD38 humano específico o fragmento funcional del mismo que comprende una región H-CDR1, H-CDR2 y H-CDR3 representada en SEQ ID NO: 8; y una región L-CDR1, L-CDR2 y L-CDR3 representada en SEQ ID NO:16. En una realización, el anticuerpo o fragmento funcional del mismo comprende una cadena pesada variable representada en SEQ ID NO:8 y una cadena ligera variable representada en SEQ ID NO: 16. La presente invención proporciona además una composición que comprende ácidos nucleicos que codifican la cadena pesada y la cadena ligera del anticuerpo anterior o fragmento funcional del mismo. En una realización, la composición comprende SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 12.

En una realización, el anticuerpo humano es un anticuerpo humano sintético. En una realización preferida, el anticuerpo es una IgG. En una realización más preferida, el anticuerpo es una IgG1.

La presente invención proporciona además una composición que comprende vectores que comprenden los ácidos nucleicos de la invención.

La presente invención proporciona además una célula que comprende los vectores de la invención. En una realización, dicha célula es bacteriana. En otra realización, dicha célula es de un mamífero.

40 La presente invención proporciona además una composición farmacéutica que comprende los anticuerpos humanos de la invención o fragmento funcional de los mismos y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.

La presente invención proporciona además el uso de los anticuerpos humanos de la invención o fragmento funcional de los mismos para la preparación de una composición farmacéutica para tratar un trastorno o afección asociado con la presencia indeseada de células CD38+.

45 La presente invención proporciona además una composición farmacéutica que comprende los anticuerpos humanos de la invención o fragmentos funcionales de los mismos y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable para uso en un método para tratar un trastorno o afección asociado con la presencia indeseada de células CD38+.

En una realización, dicho trastorno o afección es una enfermedad hematológica. En una realización preferida, la enfermedad hematológica pertenece a la lista constituida por mieloma múltiple, leucemia linfocítica crónica, leucemia mielocítica crónica, leucemia mielocítica aguda y leucemia linfocítica aguda. En otra realización, dicho trastorno o afección es una enfermedad inflamatoria. En otra realización, la enfermedad inflamatoria pertenece a la lista constituida por artritis reumatoide y lupus eritematoso sistémico.

La presente invención proporciona además un método para seleccionar como dianas a células CD38+ en una muestra celular, que comprende la etapa de permitir que dichas células CD38+ se pongan en contacto con los

anticuerpos humanos de la invención o fragmento funcional del mismo.

Se describen aquí métodos para tratar enfermedades y/o afecciones asociadas con el aumento de CD38 utilizando uno o más anticuerpos de la invención. Estos y otros objetos de la invención se describen de forma más completa aquí.

5 Se describe también un anticuerpo aislado o un fragmento de anticuerpo funcional que contiene una región de unión a antígeno que es específica para un epítipo de CD38, en el que el anticuerpo o fragmento funcional del mismo es capaz de mediar el exterminio de una célula diana CD38+ (LP-1 (DSMZ: ACC41) y RPMI-8226 (ATCC: CCL-155)) mediante citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos ("ADCC") con una eficacia al menos dos a cinco veces mejor que el anticuerpo quimérico OKT10 que tiene SEC ID NOS: 23 y 24 (en las mismas o sustancialmente las mismas condiciones), cuando se emplea como célula efectora una célula PBMC humana, y cuando la relación de células efectoras a células diana está entre alrededor de 30:1 y alrededor de 50:1. Tal anticuerpo o fragmento funcional del mismo puede contener una región de unión a antígeno que contiene una región H-CDR3 representada en SEC ID NO: 5, 6, 7, u 8; la región de unión a antígeno puede incluir además una región H-CDR2 representada en SEC ID NO: 5, 6, 7, u 8; y la región de unión a antígeno también puede contener una región H-CDR1 representada en SEC ID NO: 5, 6, 7, u 8. Tal anticuerpo de la invención específico de CD38 puede contener una región de unión a antígeno que contiene una región L-CDR3 representada en SEC ID NO: 13, 14, 15, o 16; la región de unión a antígeno puede incluir además una región L-CDR1 representada en SEC ID NO: 13, 14, 15, o 16; y la región de unión a antígeno también puede contener una región L-CDR2 representada en SEC ID NO: 13, 14, 15, o 16.

20 También se describe aquí un anticuerpo aislado o un fragmento de anticuerpo funcional que contiene una región de unión a antígeno que es específica para un epítipo de CD38, en el que el anticuerpo o fragmento funcional del mismo es capaz de mediar el exterminio de una célula CHO transfectada con CD38 mediante CDC con una eficacia al menos dos veces mejor que OKT10 quimérico (SEC ID NOS: 23 y 24) en las mismas o sustancialmente las mismas condiciones como en el párrafo previo. Un anticuerpo que satisfaga estos criterios puede contener una región de unión a antígeno que contiene una región H-CDR3 representada en SEC ID NO: 5, 6, o 7; la región de unión a antígeno puede incluir además una región H-CDR2 representada en SEC ID NO: 5, 6, o 7; y la región de unión a antígeno también puede contener una región H-CDR1 representada en SEC ID NO: 5, 6, o 7. Tal anticuerpo de la invención específico de CD38 puede contener una región de unión a antígeno que contiene una región L-CDR3 representada en SEC ID NO: 13, 14, o 15; la región de unión a antígeno puede incluir además una región L-CDR1 representada en SEC ID NO: 13, 14, o 15; y la región de unión a antígeno también puede contener una región L-CDR2 representada en SEC ID NO: 13, 14, o 15.

Los anticuerpos (y fragmentos funcionales de los mismos) descritos aquí pueden contener una región de unión a antígeno que es específica para un epítipo de CD38, epítipo el cual contiene uno o más restos de aminoácidos de restos de aminoácidos 43 a 215 de CD38, como se representa mediante SEC ID NO: 22. Más específicamente, un epítipo al que se une la región de unión a antígeno puede contener uno o más restos de aminoácidos encontrados en uno o más de los tramos de aminoácidos tomados de la lista de tramos de aminoácidos 44-66, 82-94, 142-154, 148-164, 158-170, y 192-206. Para ciertos anticuerpos, el epítipo puede ser lineal, mientras que, para otros, puede ser conformacional (es decir, discontinuo). Un anticuerpo o fragmento funcional del mismo que tiene una o más de estas propiedades puede contener una región de unión a antígeno que contiene una región H-CDR3 representada en SEC ID NO: 5, 6, 7, u 8; la región de unión a antígeno puede incluir además una región H-CDR2 representada en SEC ID NO: 5, 6, 7, u 8; y la región de unión a antígeno también puede contener una región H-CDR1 representada en SEC ID NO: 5, 6, 7, u 8. Tal anticuerpo específico de CD38 puede contener una región de unión a antígeno que contiene una región L-CDR3 representada en SEC ID NO: 13, 14, 15, o 16; la región de unión a antígeno puede incluir además una región L-CDR1 representada en SEC ID NO: 13, 14, 15, o 16; y la región de unión a antígeno también puede contener una región L-CDR2 representada en SEC ID NO: 13, 14, 15, o 16. También se describen aquí variantes peptídicas de las secuencias. Por consiguiente, se describen anticuerpos anti-CD38 que tienen una secuencia de aminoácidos de cadena pesada con: al menos 60 por ciento de identidad de secuencia en las regiones CDR con las regiones CDR representadas en SEQ ID NO: 5, 6, 7 u 8; y/o al menos 80 por ciento de homología de secuencia en las regiones CDR con las regiones CDR representadas en SEQ ID NO: 5, 6, 7 u 8. Se incluyen además anticuerpos anti-CD38 que tienen una secuencia de aminoácidos de cadena ligera con: al menos 60 por ciento de identidad de secuencia en las regiones CDR con las regiones CDR representadas en SEC ID NO: 13, 14, 15 o 16; y/o al menos 80 por ciento de homología de secuencia en las regiones CDR con las regiones CDR representadas en SEC ID NO: 13, 14, 15 o 16.

Un anticuerpo de la invención puede ser, por ejemplo, una IgG (por ejemplo, IgG₁), mientras que un fragmento de anticuerpo puede ser un Fab o scFv. En consecuencia, un fragmento de anticuerpo de la invención puede ser, o puede contener, una región de unión a antígeno que se comporta en una o más formas como se describe aquí.

También se describen aquí secuencias de ácidos nucleicos aisladas; cada una las cuales puede codificar una región de unión a antígeno de un anticuerpo humano o fragmento funcional del mismo que es específica para un epítipo de CD38. Tal secuencia de ácido nucleico puede codificar una cadena pesada variable de un anticuerpo, e incluye una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEC ID NOS: 1, 2, 3, o 4, o una secuencia de ácido nucleico que se hibrida en condiciones muy restrictivas a la hebra complementaria de SEC ID NO: 1, 2, 3, o 4. El ácido nucleico puede codificar una cadena ligera variable de un anticuerpo aislado o fragmento funcional del mismo, y puede

contener una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEC ID NOS: 9, 10, 11, o 12, o una secuencia de ácido nucleico que se hibrida en condiciones muy restrictivas a la hebra complementaria de SEC ID NO: 9, 10, 11, o 12.

5 Los ácidos nucleicos descritos aquí son adecuados para producción recombinante. De este modo, la invención también se refiere a vectores y a células hospedantes que contienen una secuencia de ácido nucleico.

10 Las composiciones de la invención se pueden usar para aplicaciones terapéuticas o profilácticas. Por lo tanto, la invención incluye una composición farmacéutica que contiene un anticuerpo de la invención (o fragmento de anticuerpo funcional) y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable para el mismo. En un aspecto relacionado, la invención proporciona una composición para uso en un método para tratar un trastorno o afección asociado con la presencia indeseada de CD38 o célula que expresa CD38. Tal método contiene las etapas de administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad eficaz de la composición farmacéutica que contiene un anticuerpo de la invención como se describe o contempla aquí.

15 También se describen epítomos aislados de CD38, ya sea en forma lineal o conformacional, y a su uso para el aislamiento de un anticuerpo o fragmento funcional del mismo, donde el anticuerpo o fragmento del anticuerpo comprende una región de unión a antígeno que es específica para dicho epítomo. A este respecto, un epítomo lineal puede contener restos de aminoácidos 192-206, mientras que un epítomo conformacional puede contener uno o más restos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en los aminoácidos 44-66, 82-94, 142-154, 148-164, 158-170 y 202-224 de CD38. Un epítomo de CD38 se puede usar, por ejemplo, para el aislamiento de anticuerpos o fragmentos funcionales de los mismos (cada uno de cuyos anticuerpos o fragmentos de anticuerpos comprende una región de unión a antígeno que es específica para tal epítomo), que comprende las etapas de poner en contacto dicho epítomo de CD38 con una biblioteca de anticuerpos, y aislar el anticuerpo o anticuerpos o el fragmento o fragmentos funcionales del mismo o de los mismos.

20 También se describe aquí un epítomo aislado de CD38, que consiste esencialmente en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en los aminoácidos 44-66, 82-94, 142-154, 148-164, 158-170, 192-206 y 202-224 de CD38. Como se usa aquí, tal epítomo "consiste esencialmente en" una de las secuencias de aminoácidos inmediatamente precedentes más rasgos adicionales, con la condición de que los rasgos adicionales no afecten materialmente a las características básicas y nuevas del epítomo.

25 También se describe aquí un epítomo aislado de CD38 que consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en los aminoácidos 44-66, 82-94, 142-154, 148-164, 158-170, 192-206 y 202-224 de CD38.

30 También se describe aquí un kit que contiene (i) un epítomo aislado de CD38 que comprende uno o más tramos de aminoácidos tomados de la lista de 44-66, 82-94, 142-154, 148-164, 158-170, 192-206 y 202-224; (ii) una biblioteca de anticuerpos; y (iii) instrucciones para usar la biblioteca de anticuerpos para aislar uno o más miembros de tal biblioteca que se unen específicamente a tal epítomo.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

35 La Figura 1a proporciona secuencias de ácidos nucleicos de diversas regiones pesadas variables de nuevos anticuerpos.

La Figura 1b proporciona secuencias de aminoácidos de diversas regiones pesadas variables de nuevos anticuerpos. Las regiones CDR HCDR1, HCDR2 y HCDR3 se designan desde el término N al término C en negrita.

40 La Figura 2a proporciona secuencias de ácidos nucleicos de diversas regiones ligeras variables de nuevos anticuerpos.

La Figura 2b proporciona secuencias de aminoácidos de diversas regiones variables de nuevos anticuerpos. Las regiones CDR LCDR1, LCDR2 y LCDR3 se designan desde el término N hacia el término C en negrita.

45 La Figura 3 proporciona secuencias de aminoácidos de regiones pesadas variables de diversas secuencias de genes maestros de anticuerpos HuCAL basadas en consenso. Las regiones CDR HCDR1, HCDR2 y HCDR3 se designan desde el término N hacia el término C en negrita.

La Figura 4 proporciona secuencias de aminoácidos de regiones ligeras variables de diversas secuencias de genes maestros de anticuerpos HuCAL basadas en consenso. Las regiones CDR LCDR1, LCDR2 y LCDR3 se designan desde el término N hacia el término C en negrita.

50 La Figura 5 proporciona la secuencia de aminoácidos de CD38 (número de acceso primario SWISS-PROT P28907).

La Figura 6 proporciona las secuencias nucleotídicas de las cadenas pesada y ligera de OKT10 quimérico.

La Figura 7 proporciona una visión esquemática de conjunto de epítomos de anticuerpos representativos de la

presente invención.

La Figura 8 proporciona la secuencia de ADN de pMORPH® h_I_gG1_1 (pb 601-2100) (SEC ID NO: 32): El vector se basa en los vectores pcDNA3.1+ (Invitrogen). La secuencia de aminoácidos de la secuencia de relleno de VH se indica en negrita, mientras que los marcos de lectura finales de la secuencia líder de VH y del gen de la región constante no están impresos en negrita. Los sitios de restricción se indican encima de la secuencia. Los sitios de cebado de los cebadores de secuenciación están subrayados.

La Figura 9 proporciona la secuencia de ADN del vector de expresión de cadena ligera kappa de Ig pMORPH® h_Igk_1 (pb 601-1400) (SEC ID NO: 33): El vector se basa en los vectores pcDNA3.1+ (Invitrogen). Las secuencias de aminoácidos de la secuencia de relleno de Vκ se indica en negrita, mientras que los marcos de lectura finales de la secuencia líder de Vκ y del gen de la región constante no están impresos en negrita. Los sitios de restricción se indican encima de la secuencia. Los sitios de cebado de los cebadores de secuenciación están subrayados.

La Figura 10 proporciona la secuencia de ADN del vector de cadena ligera lambda de Ig HuCAL pMORPH® h_Igλ_1 (pb 601-1400) (SEC ID NO: 34): La secuencia de aminoácidos de la secuencia de relleno de Vλ se indica en negrita, mientras que los marcos de lectura finales de la secuencia líder de Vλ y del gen de la región constante no están impresos en negrita. Los sitios de restricción se indican encima de la secuencia. Los sitios de cebado de los cebadores de secuenciación están subrayados.

La Figura 11 proporciona los resultados del ensayo de proliferación. Se cultivaron PBMCs procedentes de 6 donantes sanos diferentes (según se indica mediante los puntos individuales) durante 3 días en presencia de anticuerpos HuCAL® Mab#1 (=MOR03077), Mab#2 (=MOR03079), y Mab#3 (=MOR03080), el anticuerpo de referencia chOKT10, el control agonista (ag.) IB4, un control negativo HuCAL® irrelevante IgG1 (NC) y una IgG2a murina (Iso) como control de isotipo coincidente para IB4. Para medir la actividad de proliferación, se usó un marcaje estándar con BrdU, y su incorporación (como RLU = unidades de luz relativas) se analizó vía ELISA a base de quimioluminiscencia.

La Figura 12 proporciona los resultados del ensayo de liberación de IL-6: Se cultivaron PBMCs procedentes de 4-8 donantes sanos diferentes (según se indica mediante los puntos individuales) durante 24 h en presencia de anticuerpos HuCAL® Mab#1 (=MOR03077), Mab#2 (=MOR03079), y Mab#3 (=MOR03080), el anticuerpo de referencia chOKT10, el control agonista (ag.) IB4, un control negativo HuCAL® irrelevante (NC), y medio solamente (Medio). El contenido de IL-6 en unidades de luz relativas (RLU) se analizó a partir de los sobrenadantes del cultivo vía un ELISA a base de quimioluminiscencia.

La Figura 13 proporciona datos sobre la citotoxicidad frente a células progenitoras CD34+/CD38+: Se incubaron PBMCs procedentes de donantes sanos que poseen células progenitoras CD34+/CD38+ autólogas con HuCAL® Mab#1 (=MOR03077), Mab#2 (=MOR03079), y Mab#3 (=MOR03080), el control positivo (PC = chOKT10), y un control negativo HuCAL® irrelevante, durante 4 horas, respectivamente. Después, la suspensión celular se mezcló con medio de metilcelulosa acondicionado y se incubó durante 2 semanas. Se contaron las unidades formadoras de colonias (CFU) derivadas de unidades formadoras de estallido de eritroides (BFU-E; panel B) y células madre de granulocitos/eritroides/macrófagos/megacariocitos (CFU-GEMM; paneles B) y células madre de granulocitos/macrófagos (CFU-GM; panel C), y se normalizaron frente al control del medio ("ninguno" = medio). El panel A representa el número total de CFU (CFUc total) para todos los progenitores. Se dan los valores medio de al menos 10 donantes de PBMC diferentes. Las barras de error representan el error estándar de la media.

La Figura 14 proporciona datos sobre ADCC con diferentes estirpes celulares:

- a: Medidas individuales (excepto para RPMI8226: promedio de 4 ensayos individuales); relación E:T: 30:1
- b: Namba et al., 1989
- c: 5 µg/ml usados para conc. de anticuerpo (excepto para Raji, con 0,1 µg/ml)
- d: adición de ácido retinoico para la estimulación de la muerte específica de la expresión de CD38 [%] = [(muerte exp. – muerte medio)/(1 – muerte medio)] * 100
- PC: Control positivo (=chOKT10)
- MM: Mieloma múltiple
- CLL: Leucemia de linfocitos B crónica
- ALL: Leucemia linfoblástica aguda

- AML: Leucemia mieloide aguda
 DSMZ: Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
 ATCC: American Type Culture Collection
 ECACC: European Collection Of Cell Cultures
 5 MFI: Intensidades media de fluorescencia

La Figura 15 proporciona datos sobre ADCC con muestras de MM:

^a: 2-4 análisis individuales

- 10 La Figura 16 proporciona los resultados experimentales de volúmenes tumorales medios tras el tratamiento de xenoinjerto de mieloma humano con MOR03080: grupo 1: vehículo; grupo 2: MOR03080 como hlgG1 1 mg/kg 32-68 días cada segundo día; grupo 3: MOR03080 como hlgG1 5 mg/kg 32-68 cada segundo día; grupo 4: MOR03080 como chlgG2a 5 mg/kg 32-68 días cada segundo día; grupo 5: MOR03080 como hlgG1 1 mg/kg, 14-36 días cada segundo día; grupo 6: no tratado.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

- 15 La presente invención se basa en el descubrimiento de nuevos anticuerpos humanos que son específicos para o que tienen una afinidad elevada por CD38 y pueden suministrar un beneficio terapéutico a un sujeto. Los anticuerpos de la invención se pueden usar en muchos contextos, que se describen de forma más completa aquí.

- 20 Un anticuerpo “humano” o fragmento de anticuerpo humano funcional se define aquí como aquel que no es quimérico (por ejemplo, no “humanizado”) y no procede (en todo o en parte) de una especie no humana. Un anticuerpo humano o fragmento de anticuerpo funcional puede derivar de un ser humano, o puede ser un anticuerpo humano sintético. Un “anticuerpo humano sintético” se define aquí como un anticuerpo que tiene una secuencia derivada, en todo o en parte, *in silico* a partir de secuencias sintéticas que se basan en el análisis de secuencias de anticuerpos humanos conocidas. El diseño *in silico* de una secuencia de anticuerpo humano o fragmento de la misma se puede lograr, por ejemplo, analizando una base de datos de secuencias de anticuerpos humanos o de fragmentos de anticuerpos, e ideando una secuencia polipeptídica que utiliza los datos obtenidos de ella. Otro ejemplo de un anticuerpo humano o fragmento de anticuerpo funcional es aquel que es codificado por un ácido nucleico aislado de una biblioteca de secuencias de anticuerpos de origen humano (es decir, basándose tal biblioteca en anticuerpos tomados de una fuente natural humana).

- 30 Un “anticuerpo humanizado” o fragmento de anticuerpo humanizado funcional se define aquí como aquel que (i) deriva de una fuente no humana (por ejemplo, un ratón transgénico que posee un sistema inmunitario heterólogo), anticuerpo el cual se basa en una secuencia de línea germinal humana; o (ii) es quimérico, en el que el dominio variable deriva de un origen no humano y el dominio constante deriva de un origen humano, o (iii) está injertado con CDRs, en el que las CDRs del dominio variable proceden de un origen no humano, mientras que uno o más marcos del dominio variable son de origen humano y el dominio constante (si lo hay) es de origen humano.

- 35 Como se usa aquí, un anticuerpo “se une específicamente a”, es “específico para” o “reconoce específicamente” un antígeno (aquí, CD38) si tal anticuerpo es capaz de discriminar entre tal antígeno y uno o más antígenos de referencia, puesto que la especificidad de unión no es una propiedad absoluta, sino una propiedad relativa. En su forma más general (y cuando no se menciona ninguna referencia definida), “unión específica” se refiere a la capacidad de anticuerpo para discriminar entre el antígeno de interés y un antígeno no relacionado, según se determina, por ejemplo, según uno de los siguientes métodos. Tales métodos comprenden transferencias Western, ensayos de ELISA, RIA, ECL, IRMA, y barridos peptídicos. Por ejemplo, se puede llevar a cabo un ensayo ELISA estándar. La puntuación se puede llevar a cabo mediante desarrollo de color estándar (por ejemplo anticuerpo secundario con peroxidasa de rábano picante y tetrametilbencidina con peróxido de hidrógeno). La reacción en ciertos pocillos se puntúa mediante la densidad óptica, por ejemplo a 450 nm. El fondo típico (= reacción negativa) puede ser 0,1 OD; la reacción positiva típica puede ser 1 OD. Esto significa que la diferencia positiva/negativa puede ser más de 10 veces. Típicamente, la determinación de la especificidad de unión se lleva a cabo usando no solamente un único antígeno de referencia, sino un conjunto de alrededor de tres a cinco antígenos no relacionados, tal como leche en polvo, BSA, transferrina, o similar.

- 50 Sin embargo, “unión específica” también se puede referir a la capacidad de un anticuerpo para discriminar entre el antígeno diana y uno o más antígenos estrechamente relacionados, que se usan como puntos de referencia, por ejemplo entre CD38 y CD157. Adicionalmente, “unión específica” se puede referir a la capacidad de un anticuerpo para discriminar entre diferentes partes de su antígeno diana, por ejemplo diferentes dominios o regiones de CD38, tales como epítomos en la región N-terminal o en la región C-terminal de CD38, o entre uno o más restos de aminoácidos clave o tramos de restos de aminoácidos de CD38.

También, como se usa aquí, una “inmunoglobulina” (Ig) se define aquí como una proteína que pertenece a la clase

IgG, IgM, IgE, IgA, o IgD (o cualquier subclase de la misma), e incluye todos los anticuerpos convencionalmente conocidos y fragmentos funcionales de los mismos. Un "fragmento funcional" de un anticuerpo/inmunoglobulina se define aquí como un fragmento de un anticuerpo/inmunoglobulina (por ejemplo, una región variable de una IgG) que retiene la región de unión a antígeno. Una "región de unión a antígeno" de un anticuerpo se encuentra típicamente en una o más regiones hipervariables de un anticuerpo, es decir, las regiones CDR-1, -2, y/o -3; sin embargo, las regiones de "marco" variables también pueden desempeñar un papel importante en la unión al antígeno, tal como proporcionando un armazón para las CDRs. Preferiblemente, la "región de unión a antígeno" comprende al menos restos de aminoácidos 4 a 103 de la cadena ligera variable (VL) y 5 a 109 de la cadena pesada variable (VH), más preferiblemente restos de aminoácidos 3 a 107 de VL y 4 a 111 de VH, y se prefieren particularmente las cadenas VL y VH completas (posiciones de aminoácidos 1 a 109 de VL y 1 a 113 de VH; numeración según el documento WO 97/08320). Una clase preferida de inmunoglobulinas para uso en la presente invención es IgG. Los "fragmentos funcionales" de la invención incluyen el dominio de un fragmento F(ab')₂, un fragmento Fab y scFv. El F(ab')₂ o Fab se pueden manipular para minimizar o eliminar completamente las interacciones de disulfuro intermoleculares que se producen entre los dominios C_{H1} y C_L.

Un anticuerpo de la invención puede derivar de cualquier biblioteca de anticuerpos recombinantes que se basa en secuencias de aminoácidos que se han diseñado *in silico* y codificadas por ácidos nucleicos que se crean sintéticamente. El diseño *in silico* de una secuencia de anticuerpo se logra, por ejemplo, analizando una base de datos de secuencias humanas e ideando una secuencia polipeptídica que utiliza los datos obtenidos a partir de ella. Los métodos para diseñar y obtener secuencias creadas *in silico* se describen, por ejemplo, en Knappik et al., J. Mol. Biol. (2000) 296:57; Krebs et al., J. Immunol. Methods. (2001) 254:67; y patente U.S. n° 6.300.064 expedida a Knappik et al.

Anticuerpos de la invención

A lo largo de este documento, se hace referencia a los siguientes anticuerpos representativos de la invención: "anticuerpo n^{os}" o "LACS" o "MOR" 3077, 3079, 3080 y 3100. LAC 3077 representa un anticuerpo que tiene una región pesada variable que corresponde a SEC ID NO: 1 (ADN)/SEC ID NO: 5 (proteína), y una región ligera variable que corresponde a SEC ID NO: 9 (ADN)/SEC ID NO: 13 (proteína). LAC 3079 representa un anticuerpo que tiene una región pesada variable que corresponde a SEC ID NO: 2 (ADN)/SEC ID NO: 6 (proteína), y una región ligera variable que corresponde a SEC ID NO: 10 (ADN)/SEC ID NO: 14 (proteína). LAC 3080 representa un anticuerpo que tiene una región pesada variable que corresponde a SEC ID NO: 3 (ADN)/SEC ID NO: 7 (proteína), y una región ligera variable que corresponde a SEC ID NO: 11 (ADN)/SEC ID NO: 15 (proteína). LAC 3100 representa un anticuerpo que tiene una región pesada variable que corresponde a SEC ID NO: 4 (ADN)/SEC ID NO: 8 (proteína), y una región ligera variable que corresponde a SEC ID NO: 12 (ADN)/SEC ID NO: 16 (proteína).

En un aspecto, la invención proporciona anticuerpos que tienen una región de unión a antígeno que se puede unir específicamente a o que tiene una afinidad elevada por una o más regiones de CD38, cuya secuencia de aminoácidos se representa mediante SEC ID NO: 22. Se afirma que un anticuerpo tiene una "afinidad elevada" por un antígeno si la medida de la afinidad es al menos 100 nM (afinidad monovalente del fragmento Fab). Un anticuerpo de la invención o región de unión a antígeno se puede unir preferiblemente a CD38 con una afinidad de alrededor de menos de 100 nM, más preferiblemente menos de alrededor de 60 nM, y todavía más preferiblemente menos de alrededor de 30 nM. Son más preferidos los anticuerpos que se unen a CD38 con una afinidad menor que alrededor de 10 nM, y más preferiblemente menor que alrededor de 3 nM. Por ejemplo, la afinidad de un anticuerpo de la invención contra CD38 puede ser alrededor de 10,0 nM o 2,4 nM (afinidad monovalente del fragmento Fab).

La Tabla 1 proporciona un sumario de las afinidades de anticuerpos representativos de la invención, según se determina mediante resonancia de plasmones de superficie (Biacore) y análisis de Scatchard mediante FACS:

Tabla 1: Afinidades de los anticuerpos

Anticuerpo (Fab o IgG1)	BIACORE (Fab) K _D [nM] ^a	Scatchard mediante FACS (IgG1) ^b K _D [nM] ^a
MOR03077	56,0	0,89
MOR03079	2,4	0,60
MOR03080	27,5	0,47
MOR03100	10,0	6,31
OKT10 quimérico	No determinado	8,28
^a : media de al menos 2 determinaciones de afinidad diferentes		

Anticuerpo (Fab o IgG1)	BIACORE (Fab) K _D [nM] ^a	Scatchard mediante FACS (IgG1) ^b K _D [nM] ^a
^b : estirpe celular de MM RPMI8226 usada para análisis de Scatchard mediante FACS		

5 Con referencia a la Tabla 1, la afinidad de LACs 3077, 3079, 3080 y 3100 se midió mediante resonancia de plasmones de superficie (Biacore) sobre CD38 recombinante inmovilizado, y mediante un procedimiento de citometría de flujo que utiliza la estirpe celular RPMI8226 humana que expresa CD38. Los estudios de Biacore se llevaron a cabo sobre el antígeno directamente inmovilizado (proteína de fusión CD38-Fc). El formato Fab de LACs 3077, 3079, 3080 y 3100 muestra un intervalo de afinidad monovalente entre alrededor de 2,4 y 56 nM sobre la proteína de fusión CD38-Fc inmovilizada, mostrando LAC 3079 la afinidad más elevada, seguido de los Fabs 3100, 3080 y 3077.

10 El formato de IgG1 se usó para la determinación de la afinidad en base a células (Scatchard mediante FACS). La columna derecha de la Tabla 1 representa la fortaleza de unión de los LACS en este formato. LAC 3080 mostró la unión más fuerte, que es ligeramente más fuerte que LACS 3079 y 3077.

Otra característica preferida de los anticuerpos humanos de la invención es su especificidad para un área dentro de la región N-terminal de CD38. Por ejemplo, LACs 3077, 3079, 3080, y 3100 de la invención se pueden unir específicamente a la región N-terminal de CD38.

15 El tipo de epítipo al que se une un anticuerpo de la invención puede ser lineal (es decir, un tramo consecutivo de aminoácidos) o conformacional (es decir, múltiples tramos de aminoácidos). A fin de determinar si el epítipo de un anticuerpo particular es lineal o conformacional, el trabajador experto puede analizar la unión de anticuerpos a péptidos solapantes (por ejemplo péptidos 13-meros con un solapamiento de 11 aminoácidos) que cubren diferentes dominios de CD38. Usando este análisis, se ha descubierto que LACS 3077, 3080, y 3100 reconocen epítopos discontinuos en la región N-terminal de CD38, mientras que el epítipo de LAC 3079 se puede describir como lineal (véase la Figura 7). Combinado con el conocimiento proporcionado aquí, el trabajador experto en la técnica sabrá cómo usar uno o más epítopos aislados de CD38 para generar anticuerpos que tienen una región de unión a antígeno que es específica para dichos epítopos (por ejemplo, usando péptidos sintéticos de epítopos de CD38, o células que expresan epítopos de CD38).

25 Un anticuerpo de la invención es preferiblemente reactivo de forma cruzada entre especies con seres humanos y al menos alguna otra especie, que puede ser una especie de roedor o un primate no humano. El primate no humano puede ser mono rhesus, babuino y/o macaco. La especie de roedor puede ser ratón, rata y/o hámster. Un anticuerpo que es reactivo de forma cruzada con al menos una especie de roedor, por ejemplo, puede proporcionar mayor flexibilidad y beneficios con respecto a anticuerpos anti-CD38 conocidos, con el fin de llevar a cabo estudios *in vivo* en múltiples especies con el mismo anticuerpo.

30 Preferiblemente, un anticuerpo de la invención no solo es capaz de unirse a CD38, sino también es capaz de mediar la muerte de una célula que expresa CD38. Más específicamente, un anticuerpo de la invención puede mediar su efecto terapéutico agotando células CD38-positivas (por ejemplo, malignas) vía funciones efectoras del anticuerpo. Estas funciones incluyen citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) y citotoxicidad dependiente del complemento (CDC).

35 La Tabla 2 proporciona un resumen de la determinación de valores de EC50 de anticuerpos representativos de la invención tanto en ADCC como en CDC:

Tabla 2: Valores de EC50 de anticuerpos

Anticuerpo (IgG1)	ADCC		CDC
	EC50 [nM]		EC50 [nM]
	LP-1	RPMI8226	transfectantes de CHO
MOR03077	0,60 ^a	0,08 ^a	0,8 ^c ; 0,94 ^d
MOR03079	0,09 ^a	0,04 ^a	0,41 ^c
MOR03080	0,17 ^b	0,05 ^a	3,2 ^c ; 2,93 ^d
MOR03100	1,00 ^b	0,28 ^a	10,9 ^c ; 13,61 ^e
OKT10 quimérico	5,23 ^a	4,10 ^a	9,30 ^c

Anticuerpo (IgG1)	ADCC EC50 [nM]		CDC EC50 [nM]
	LP-1	RPMI8226	transfectantes de CHO
<p>^a: media de al menos 2 determinaciones de EC50</p> <p>^b: determinación individual</p> <p>^c: media de 2 determinaciones de EC50</p> <p>^d: media de 3 determinaciones de EC50</p> <p>^e: media de 4 determinaciones de EC50</p>			

5 Sin embargo, la expresión de CD38 no se encuentra solamente en células inmunitarias dentro del linaje mieloide (por ejemplo monocitos, granulocitos) y linfoide (por ejemplo linfocitos B y T activados; células plasmáticas), sino también en las células precursoras respectivas. Puesto que es importante que esas células no se vean afectadas por la muerte de células neoplásicas mediada por anticuerpos, los anticuerpos de la presente invención son preferiblemente no tóxicos para células precursoras.

10 Además de sus actividades catalíticas como una ADP-ribosa ciclasa e hidrolasa cíclica, CD38 presenta la capacidad de transducir señales de relevancia biológica (Hoshino et al., 1997; Ausiello et al., 2000). Esas funciones se pueden inducir *in vivo* mediante, por ejemplo, interacciones receptor-ligando o mediante reticulación con anticuerpos anti-CD38 agonistas, conduciendo, por ejemplo, a movilización del calcio, proliferación de linfocitos y liberación de citocinas. Preferiblemente, los anticuerpos de la presente invención son anticuerpos no agonistas.

Variantes peptídicas

15 Los anticuerpos de la invención no se limitan a las secuencias peptídicas específicas proporcionadas aquí, sino que la invención también proporciona realizaciones de variantes de estos polipéptidos. Con referencia a la actual descripción y tecnologías y referencias convencionalmente disponibles, el trabajador experto será capaz de preparar, ensayar y utilizar variantes funcionales de los anticuerpos descritos aquí, mientras que aprecia que las variantes que tienen la capacidad para mediar la muerte de una célula diana CD38+ caen dentro del alcance de la presente invención. Como se usa en este contexto, "capacidad para mediar la muerte de una célula diana CD38+" significa una característica funcional adscrita a un anticuerpo anti-CD38 de la invención. La capacidad para mediar la muerte de una célula diana CD38+ incluye de este modo la capacidad para mediar la muerte de una célula diana CD38+, por ejemplo mediante ADCC y/o CDC, o mediante constructos tóxicos conjugados a un anticuerpo de la invención.

25 Una variante puede incluir, por ejemplo, un anticuerpo que tiene al menos una región determinante de la complementariedad (CDR) (hipervariable) y/o un dominio/posición del marco (FR) (variable) alterados, con respecto a una secuencia peptídica descrita aquí. Para ilustrar mejor este concepto, a continuación se da una breve descripción de la estructura del anticuerpo.

30 Un anticuerpo está compuesto de dos cadenas peptídicas, conteniendo cada una uno (cadena ligera) o tres (cadena pesada) dominios constantes y una región variable (VL, VH), la última de las cuales está formada en cada caso por cuatro regiones FR y tres CDRs interespaciadas. El sitio de unión a antígeno está formado por una o más CDRs, aunque las regiones FR proporcionan el marco estructural para las CDRs y, por lo tanto, desempeñan un papel importante en la unión al antígeno. Alterando uno o más restos de aminoácido en una región CDR o FR, el trabajador experto puede generar de forma habitual secuencias de anticuerpos mutadas o diversificadas, que se pueden identificar frente al antígeno, en busca de nuevas propiedades o propiedades mejoradas. Por ejemplo.

35 Las Tablas 3a (VH) y 3b (VL) delimitan las regiones CDR y FR para ciertos anticuerpos de la invención, y comparan aminoácidos en una posición dada entre sí y con secuencias de consenso o de "genes maestro" correspondientes (como se describe en la patente U.S. nº 6.300.064):

Tabla 3a: Secuencias de VH

VH

Ligantes de CD38 de secuencias de VH

Posición	marco 1										marco 2										CDR 2																																												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15																														
SEC ID NO: 17 VH1B	Q	V	Q	L	V	S	G	A	E	V	K	K	P	G	A	S	Y	K	V	S	C	K	A	S	G	V	T	F	T	S	V	Y	M	T	W	V	R	Q	A	P	G	Q	G	L	E	W	M	G	W	L	N	P	N	S	G	G	T	N	Y	A	Q	K	F	Q	G
SEC ID NO: 5 3077	Q	V	Q	L	V	S	G	A	E	V	K	K	P	G	A	S	Y	K	V	S	C	K	A	S	G	V	T	F	T	S	V	Y	M	T	W	V	R	Q	A	P	G	Q	G	L	E	W	M	G	Y	I	D	P	N	R	G	N	I	N	Y	A	Q	K	F	Q	G
SEC ID NO: 42 VH3	E	V	Q	L	V	S	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	V	T	F	T	S	V	Y	M	T	W	V	R	Q	A	P	G	Q	G	L	E	W	S	A	I	S	G	S	G	G	T	Y	A	D	S	V	K	G				
SEC ID NO: 6 3079	Q	V	Q	L	V	S	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	V	T	F	T	S	V	Y	M	T	W	V	R	Q	A	P	G	Q	G	L	E	W	S	A	I	S	G	S	G	T	Y	A	D	S	V	K	G					
SEC ID NO: 7 3000	Q	V	Q	L	V	S	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	V	T	F	T	S	V	Y	M	T	W	V	R	Q	A	P	G	Q	G	L	E	W	S	A	I	S	G	S	G	T	Y	A	D	S	V	K	G					
SEC ID NO: 8 3100	Q	V	Q	L	V	S	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	V	T	F	T	S	V	Y	M	T	W	V	R	Q	A	P	G	Q	G	L	E	W	S	A	I	S	G	S	G	T	Y	A	D	S	V	K	G					

VH

Posición	marco 3										CDR 3										marco 4																																				
	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15																						
SEC ID NO: 17 VH1B	R	V	T	M	T	R	D	T	S	I	S	T	A	Y	M	E	L	S	L	R	S	E	D	T	A	V	Y	C	A	R	W	G	G	D	G	F	Y	A	M	D	Y	W	Q	Q	G	T	L	V	T	V	I	S	S				
SEC ID NO: 5 3077	R	V	T	M	T	R	D	T	S	I	S	T	A	Y	M	E	L	S	L	R	S	E	D	T	A	V	Y	C	A	R	E	Y	L	V	R	I	H	G	M	L	D	F	W	Q	G	T	L	V	T	V	I	S	S				
SEC ID NO: 42 VH3	R	F	T	I	S	R	D	N	I	S	K	N	T	L	Y	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	C	A	R	W	G	G	D	G	F	Y	A	M	D	Y	W	Q	Q	G	T	L	V	T	V	I	S	S		
SEC ID NO: 6 3079	R	F	T	I	S	R	D	N	I	S	K	N	T	L	Y	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	C	A	R	Y	W	S	K	S	H	A	S	V	F	D	Y	W	Q	Q	G	T	L	V	T	V	I	S	S	
SEC ID NO: 7 3000	R	F	T	I	S	R	D	N	I	S	K	N	T	L	Y	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	C	A	R	N	M	Y	R	W	P	F	H	Y	F	F	D	Y	W	Q	Q	G	T	L	V	T	V	I	S	S
SEC ID NO: 8 3100	R	F	T	I	S	R	D	N	I	S	K	N	T	L	Y	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	C	A	R	F	Y	G	Y	F	N	Y	A	D	Y	W	Q	Q	G	T	L	V	T	V	I	S	S			

Tabla 3b: Secuencias de VL

VL

Ligantes de CD38 de secuencias de VL

	marco 1									marco 2									CDR 2																																													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	1	2	3	4	5	6	7	8	9	1	2	3	4	5	6	7	8	9																																					
SEC ID NO: 19 VL13	S	E	L	T	Q	P	P	-	S	V	S	V	A	P	G	Q	T	A	R	I	S	C	S	G	D	A	L	L	Q	D	-	K	Y	A	S	W	Y	Q	Q	K	P	G	Q	A	P	V	L	V	I	Y	D	D	S	D	R	P	S	I	G	I	P			
SEC ID NO: 15 3080	D	I	E	L	T	Q	P	P	-	S	V	S	V	A	P	G	Q	T	A	R	I	S	C	S	G	D	N	I	L	L	G	N	-	K	V	S	W	Y	Q	Q	K	P	G	Q	A	P	V	V	V	I	Y	G	D	N	I	R	R	P	S	I	G	I	P	
SEC ID NO: 16 3100	D	I	E	L	T	Q	P	P	-	S	V	S	V	A	P	G	Q	T	A	R	I	S	C	S	G	D	N	I	L	L	G	N	-	K	V	S	W	Y	Q	Q	K	P	G	Q	A	P	V	L	V	I	Y	R	D	H	D	R	P	S	I	G	I	P		
SEC ID NO: 20 VL11	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	Q	G	L	S	-	S	V	A	W	Y	Q	Q	K	P	G	K	A	P	K	L	I	V	A	A	S	S	L	Q	S	I	G	V	P						
SEC ID NO: 14 3079	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	Q	G	L	S	-	A	L	N	W	Y	Q	Q	K	P	G	K	A	P	K	L	I	Y	K	V	S	N	L	Q	S	I	G	V	P						
SEC ID NO: 43 VL12	D	I	V	M	T	Q	S	P	L	S	L	P	V	T	P	G	E	P	A	S	I	S	C	R	S	Q	S	L	L	H	S	N	G	Y	N	L	D	W	Y	L	Q	K	P	G	Q	S	I	P	Q	L	L	I	Y	L	G	S	N	R	A	S	I	G	V	P
SEC ID NO: 13 3077	D	I	V	M	T	Q	S	P	L	S	L	P	V	T	P	G	E	P	A	S	I	S	C	R	S	Q	S	L	L	F	I	D	G	N	Y	L	N	W	Y	L	Q	K	P	G	Q	S	I	P	Q	L	L	I	Y	L	G	S	N	R	A	S	I	G	V	P

VL

	marco 3							CDR 3									marco 4																															
	1	2	3	4	5	6	7	1	2	3	4	5	6	7	8	9	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	1	2	3	4	5	6	7	8	9													
SEC ID NO: 19 VL13	E	R	F	S	G	S	N	S	G	N	T	A	T	L	I	S	G	T	Q	A	E	D	E	A	D	Y	C	Q	H	Y	T	I	P	-	P	V	F	G	G	G	T	K	L	T	V	L	G	
SEC ID NO: 15 3080	E	R	F	S	G	S	N	S	G	N	T	A	T	L	I	S	G	T	Q	A	E	D	E	A	D	Y	C	S	V	D	S	Y	-	F	V	F	G	G	T	K	L	T	V	L	G			
SEC ID NO: 16 3100	E	R	F	S	G	S	N	S	G	N	T	A	T	L	I	S	G	T	Q	A	E	D	E	A	D	Y	C	Q	S	V	D	V	L	H	D	-	F	V	F	G	G	T	K	L	T	V	L	G
SEC ID NO: 20 VL11	S	R	F	S	G	S	G	T	D	F	T	L	I	S	L	Q	P	E	D	F	A	T	Y	Y	Q	G	Y	T	I	P	-	P	V	F	G	G	T	K	V	E	I	K	R					
SEC ID NO: 14 3079	S	R	F	S	G	S	G	T	D	F	T	L	I	S	L	Q	P	E	D	F	A	T	Y	Y	Q	G	Y	T	I	P	-	I	F	G	G	T	K	V	E	I	K	R						
SEC ID NO: 43 VL12	D	R	F	S	G	S	G	T	D	F	T	L	K	I	S	R	V	E	A	E	D	V	G	V	Y	C	Q	H	Y	T	I	P	-	P	V	F	G	G	T	K	V	E	I	K	R			
SEC ID NO: 13 3077	D	R	F	S	G	S	G	T	D	F	T	L	K	I	S	R	V	E	A	E	D	V	G	V	Y	C	Q	Y	S	S	K	S	-	A	T	F	G	G	T	K	V	E	I	K	R			

El trabajador experto puede usar los datos en las Tablas 3a y 3b para diseñar variantes peptídicas que están dentro del alcance de la presente invención. Se prefiere que las variantes se construyan cambiando aminoácidos en una o más regiones CDR; una variante también puede tener una o más regiones del marco alteradas. Con referencia a una comparación de los nuevos anticuerpos entre sí, los restos candidatos que se pueden cambiar incluyen, por ejemplo, restos 4 ó 37 de la cadena ligera variable y, por ejemplo, restos 13 ó 43 de la cadena pesada variable de LACs 3080 y 3077, puesto que éstas son posiciones de varianza unas con respecto a otras. Las alteraciones también se pueden realizar en las regiones del marco. Por ejemplo, se puede alterar un dominio de FR peptídico en el que existe una desviación en un resto con respecto a una secuencia de línea germinal.

Con referencia a una comparación de los nuevos anticuerpos con la secuencia de consenso o de "genes maestro" correspondientes, los restos candidatos que se pueden cambiar incluyen, por ejemplo, restos 27, 50 ó 90 de la cadena ligera variable de LAC 3080 en comparación con VL λ 3, y, por ejemplo, los restos 33, 52 y 97 de la cadena pesada variable de LAC 3080 en comparación con VH3. Como alternativa, el trabajador experto podría realizar el mismo análisis comparando las secuencias de aminoácidos descritas aquí con secuencias conocidas de la misma clase de tales anticuerpos, usando, por ejemplo, el procedimiento descrito por Knappik et al., 2000 y la patente U.S. n° 6.300.064 expedida a Knappik et al.

Además, se pueden obtener variantes usando un LAC como punto de partida para la optimización diversificando uno o más restos de aminoácidos en el LAC, preferiblemente restos de aminoácidos en una o más CDRs, e identificando la colección resultante de variantes de anticuerpos en busca de variantes con propiedades mejoradas. Se prefiere particularmente la diversificación de uno o más restos de aminoácidos en CDR-3 de VL, CDR-3 de VH, CDR-1 de VL y/o CDR-2 de VH. La diversificación se puede realizar sintetizando una colección de moléculas de ADN usando tecnología de mutagénesis dirigida a trinucleótidos (TRIM) (Virnekäs, B., Ge, L., Plückthun, A., Schneider, K.C., Wellnhofer, G., y Moroney S.E. (1994) Trinucleotide phosphoramidites: ideal reagents for the synthesis of mixed oligonucleotides for random mutagenesis. Nucl. Acids Res. 22, 5600).

Variantes de aminoácidos conservativas

Se pueden obtener variantes polipeptídicas que conservan la estructura molecular global de una secuencia peptídica de anticuerpo descrita aquí. Dadas las propiedades de los aminoácidos individuales, el trabajador experto reconocerá ciertas sustituciones racionales. Por ejemplo, se pueden realizar sustituciones de aminoácidos, es decir, "sustituciones conservativas", en base a la similitud de polaridad, carga, solubilidad, hidrofobia, hidrofilia, y/o la naturaleza enzimática de los restos implicados.

Por ejemplo, (a) los aminoácidos no polares (hidrófobos) incluyen alanina, leucina, isoleucina, valina, prolina, fenilalanina, triptófano, y metionina; (b) los aminoácidos neutros polares incluyen glicina, serina, treonina, cisteína, tirosina, asparagina, y glutamina; (c) los aminoácidos cargados positivamente (básicos) incluyen arginina, lisina, y histidina; y (d) los aminoácidos cargados negativamente (ácidos) incluyen ácido aspártico y ácido glutámico. Típicamente, las sustituciones se pueden realizar en los grupos (a)-(d). Además, la glicina y prolina se pueden sustituir entre sí en base a su capacidad para interrumpir las hélices α . De forma similar, ciertos aminoácidos, tales como alanina, cisteína, leucina, metionina, ácido glutámico, glutamina, histidina y lisina se encuentran más habitualmente en las hélices α , mientras que valina, isoleucina, fenilalanina, tirosina, triptófano y treonina se encuentran más habitualmente en láminas plegadas β . Glicina, serina, ácido aspártico, asparagina, y prolina se encuentran habitualmente en las vueltas. Algunas sustituciones preferidas se pueden realizar entre los siguientes grupos: (i) S y T; (ii) P y G; y (iii) A, V, L e I. Dado el código genético conocido, y las técnicas de ADN recombinante y sintético, el científico experto puede construir fácilmente ADNs que codifican las variantes de aminoácidos conservativas. En un ejemplo particular, la posición 3 de aminoácido en SEC ID NOS: 5, 6, 7, y/u 8 se puede cambiar de una Q a una E.

Como se usa aquí, "identidad de secuencia" entre dos secuencias polipeptídicas indica el porcentaje de aminoácidos que son idénticos entre las secuencias. "Similitud de secuencia" indica el porcentaje de aminoácidos que son idénticos o que representan sustituciones de aminoácidos conservativas. Las secuencias polipeptídicas preferidas descritas aquí tienen una identidad de secuencia en las regiones CDR de al menos 60%, más preferiblemente al menos 70% u 80%, todavía más preferiblemente al menos 90%, y lo más preferible al menos 95%. Los anticuerpos preferidos también tienen una similitud de secuencia en las regiones CDR de al menos 80%. Los anticuerpos de la invención tienen una similitud de secuencia en las regiones CDR de al menos 90%.

Moléculas de ADN de la invención

La presente invención también se refiere a una composición que comprende las moléculas de ADN que codifican un anticuerpo de la invención. Estas secuencias incluyen aquellas moléculas de ADN expuestas en las Figuras 1a y 2a.

Las moléculas de ADN de la invención no están limitadas a las secuencias descritas aquí, sino también incluyen variantes de las mismas. Las variantes de ADN dentro de la invención se pueden describir con referencia a sus propiedades físicas en la hibridación. El trabajador experto reconocerá que se puede usar ADN para identificar su complemento y, puesto que el ADN es bicatenario, su equivalente u homólogo, usando técnicas de hibridación de ácidos nucleicos. También se reconocerá que la hibridación se puede producir con una complementariedad menor

que 100%. Sin embargo, dada la elección apropiada de las condiciones, se pueden usar técnicas de hibridación para diferenciar entre secuencias de ADN en base a su relación estructural con una sonda particular. Para una guía con respecto a tales condiciones, véase Sambrook et al., 1989 (Sambrook, J., Fritsch, E. F. y Maniatis, T. (1989) Molecular Cloning: A laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, USA) y Ausubel et al., 1995 (Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Sedman, J. G., Smith, J. A., y Struhl, K. eds. (1995). Current Protocols in Molecular Biology. New York: John Wiley and Sons).

La similitud estructural entre dos secuencias polinucleotídicas se puede expresar como una función de la "restricción" de las condiciones en las que las dos secuencias se hibridarán entre sí. Como se usa aquí, el término "restricción" se refiere al grado en el que las condiciones desfavorecen la hibridación. Las condiciones restrictivas desfavorecen enormemente la hibridación, y solamente las moléculas estructuralmente muy relacionadas se hibridarán entre sí en tales condiciones. Por el contrario, las condiciones no restrictivas favorecen la hibridación de moléculas que presentan un menor grado de relación estructural. Por lo tanto, la restricción de la hibridación se correlaciona directamente con las relaciones estructurales de dos secuencias de ácidos nucleicos. Las siguientes relaciones son útiles a la hora de correlacionar la hibridación y la relación (en las que T_m es la temperatura de fusión de un dúplex de ácido nucleico):

a.

$$T_m = 69,3 + 0,41(G+C)\%$$

b. La T_m de un ADN dúplex disminuye en 1°C con cada incremento de 1% en el número de pares de bases desparejadas.

c.

$$(T_m)_{\mu_2} - (T_m)_{\mu_1} = 18,5 \log_{10} \mu_2 / \mu_1$$

en la que μ_1 y μ_2 son las fuerzas iónicas de las dos disoluciones.

La restricción de la hibridación es una función de muchos factores, incluyendo la concentración global de ADN, fuerza iónica, temperatura, tamaño de la sonda y la presencia de agentes que destruyen el enlazamiento de hidrógeno. Los factores que promueven la hibridación incluyen concentraciones elevadas de ADN, fuerzas iónicas elevadas, temperaturas bajas, tamaño más grande de la sonda y la ausencia de agentes que destruyen el enlazamiento de hidrógeno. La hibridación se lleva a cabo típicamente en dos fases: la fase de "unión" y la fase de "lavado".

En primer lugar, en la fase de unión, la sonda se une a la diana en condiciones que favorezcan la hibridación. La restricción se controla habitualmente en esta etapa alterando la temperatura. Para restricción elevada, la temperatura está habitualmente entre 65°C y 70°C, excepto que se usen sondas oligonucleotídicas cortas (< 20 nt). Una disolución de hibridación representativa comprende 6X SSC, 0,5% de SDS, 5X disolución de Denhardt, y 100 µg de ADN portador no específico. Véase Ausubel et al., sección 2.9, suplemento 27 (1994). Por supuesto, se conocen muchas condiciones de tampón diferentes, aunque funcionalmente equivalentes. Cuando el grado de relación es menor, se puede escoger una temperatura menor. Las temperaturas de unión a restricción baja están entre alrededor de 25°C y 40°C. La restricción media está entre al menos alrededor de 40°C a menos de alrededor de 65°C. La restricción elevada es al menos alrededor de 65°C.

En segundo lugar, la sonda en exceso se elimina por lavado. Es en esta fase en la que se aplican habitualmente condiciones más restrictivas. Por tanto, es esta etapa de "lavado" que es más importante a la hora de determinar la relación vía hibridación. Las disoluciones de lavado contienen típicamente concentraciones salinas más bajas. Una disolución de restricción media ejemplar contiene 2X SSC y 0,1% de SDS. Una disolución de lavado de restricción elevada contiene el equivalente (en fuerza iónica) de menos de alrededor de 0,2X SSC, conteniendo una disolución restrictiva preferida alrededor de 0,1X SSC. Las temperaturas asociadas con diversas restricciones son las mismas como se explican anteriormente para la "unión". La disolución de lavado también se sustituye típicamente un número de veces durante el lavado. Por ejemplo, las condiciones de lavado de restricción elevada típicas comprenden lavar dos veces durante 30 minutos a 55°C, y tres veces durante 15 minutos a 60°C.

En consecuencia, la presente invención incluye moléculas de ácido nucleico que se hibridan a las moléculas expuestas en las Figuras 1a y 2a en condiciones de unión y de lavado de restricción elevada, en las que tales moléculas de ácido nucleico codifican un anticuerpo o fragmento funcional del mismo que tiene propiedades como se describen aquí. Las moléculas preferidas (desde una perspectiva de ARNm) son aquellas que tienen al menos 75% u 80% (preferiblemente al menos 85%, más preferiblemente al menos 90%, y lo más preferible al menos 95%) de homología o identidad de secuencia con una de las moléculas de ADN descrita aquí. En un ejemplo particular de una variante de la invención, la posición 7 de ácido nucleico en SEC ID NOS: 1, 2, 3 y/o 4 se puede sustituir de una C a una G, cambiando de ese modo el codón de CAA a GAA.

Variantes funcionalmente equivalentes

Todavía otra clase de variantes de ADN dentro del alcance de la invención se puede describir con referencia al producto que codifican (véanse los péptidos enunciados en las figuras 1b y 2b). Estos genes funcionalmente equivalentes se caracterizan por el hecho de que codifican las mismas secuencias peptídicas encontradas en las figuras 1b y 2b debido a la degeneración del código genético. SEC ID NOS: 1 y 31 son un ejemplo de variantes funcionalmente equivalentes, puesto que sus secuencias de ácido nucleico son diferentes, aunque codifican el mismo polipéptido, es decir, SEC ID NO: 5.

Se reconoce que las variantes de moléculas de ADN proporcionadas aquí se pueden construir de varios modos diferentes. Por ejemplo, se pueden construir como ADNs completamente sintéticos. Existen ampliamente métodos para sintetizar eficientemente oligonucleótidos en el intervalo de 20 a alrededor de 150 nucleótidos. Véase Ausubel et al., sección 2.11, Suplemento 21 (1993). Los oligonucleótidos solapantes se pueden sintetizar y ensamblar de la manera dada a conocer por primera vez por Khorana et al., J. Mol. Biol. 72:209-217 (1971); véase también Ausubel et al., más arriba, Sección 8.2. Los ADNs sintéticos se diseñan preferiblemente con sitios de restricción convenientes manipulados en los extremos 5' y 3' del gen para facilitar la clonación en un vector apropiado.

Como se indica, un método para generar variantes es comenzar con uno de los ADNs descritos aquí, y después llevar a cabo la mutagénesis dirigida al sitio. Véase Ausubel et al., más arriba, capítulo 8, Suplemento 37 (1997). En un método típico, un ADN diana se clona en un vehículo bacteriófago de ADN monocatenario. El ADN monocatenario se aísla y se hibrida con un oligonucleótido que contiene la alteración o alteraciones nucleotídicas deseadas. La hebra complementaria se sintetiza, y el fago bicatenario se introduce en un hospedante. Parte de la progenie resultante contendrá el mutante deseado, que se puede confirmar usando secuenciación de ADN. Además, existen diversos métodos que incrementan la probabilidad de que el fago de la progenie será el mutante deseado. Estos métodos son bien conocidos por aquellos en el campo, y existen kits comercialmente disponibles para generar tales mutantes.

Constructos y expresión de ADN recombinante

La presente invención proporciona además constructos de ADN recombinante que comprenden una o más de las secuencias nucleotídicas de la presente invención. Los constructos recombinantes de la presente invención se usan en relación con un vector, tal como un vector plasmídico o vírico, en el que se inserta una molécula de ADN que codifica un anticuerpo de la invención.

El gen codificado se puede producir mediante técnicas descritas en Sambrook et al., 1989, y Ausubel et al., 1989. Como alternativa, las secuencias de ADN se pueden sintetizar químicamente usando, por ejemplo, sintetizadores. Véanse, por ejemplo, las técnicas descritas en OLIGONUCLEOTIDE SYNTHESIS (1984, Gait, ed., IRL Press, Oxford). Los constructos recombinantes de la invención están comprendidos con vectores de expresión que son capaces de expresar los productos de ARN y/o proteicos del ADN o ADNs codificados. El vector puede comprender además secuencias reguladoras, que incluyen un promotor ligado operablemente al marco de lectura abierto (ORF). El vector puede comprender además una secuencia marcadora seleccionable. Para la traducción eficiente de secuencias codificantes de genes diana insertadas, también pueden ser necesarias señales de iniciación y secretoras bacterianas específicas.

La presente invención proporciona además células hospedantes que contienen al menos uno de los ADNs de la presente invención. La célula hospedante puede ser virtualmente cualquier célula para la que existen vectores de expresión. Por ejemplo, puede ser una célula hospedante eucariota superior, tal como una célula de mamífero, una célula hospedante eucariota inferior, tal como una célula de levadura, pero preferiblemente es una célula procariota, tal como una célula bacteriana. La introducción del constructo recombinante en la célula hospedante se puede efectuar mediante transfección con fosfato de calcio, DEAE, transfección mediada por dextrano, electroporación o infección de fagos.

Expresión bacteriana

Los vectores de expresión útiles para uso bacteriano se construyen insertando una secuencia de ADN estructural, que codifica una proteína deseada, junto con señales de iniciación y terminación de la traducción adecuadas en una fase de lectura operable con un promotor funcional. El vector comprenderá uno o más marcadores seleccionables fenotípicos y un origen de replicación para asegurar el mantenimiento del vector y, si es deseable, proporcionar amplificación en el hospedante. Los hospedantes procariotas adecuados para la transformación incluyen *E. coli*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhimurium* y diversas especies dentro del género *Pseudomonas*, *Streptomyces*, y *Staphylococcus*.

Los vectores bacterianos se pueden basar, por ejemplo, en bacteriófagos, plásmidos o fagómidos. Estos vectores pueden contener un marcador seleccionable y un origen bacteriano de replicación derivado de plásmidos comercialmente disponibles que contienen típicamente elementos del vector de clonación bien conocido pBR322 (ATCC 37017). Tras la transformación de una cepa hospedante adecuada y el crecimiento de la cepa hospedante hasta una densidad celular apropiada, el promotor seleccionado se deja de reprimir/se induce por medios apropiados (por ejemplo, desplazamiento de la temperatura o inducción química) y las células se cultivan durante un período adicional. Las células se cosechan típicamente mediante centrifugación, se destruyen por medios físicos o

químicos, y el extracto bruto resultante se retiene para la purificación posterior.

En sistemas bacterianos, se puede seleccionar ventajosamente un número de vectores de expresión, dependiendo del uso pretendido de la proteína que se expresa. Por ejemplo, cuando se va a producir una gran cantidad de tal proteína, para la generación de anticuerpos o para identificar bibliotecas peptídicas, por ejemplo, pueden ser deseables vectores que dirigen la expresión de niveles elevados de productos de proteína de fusión que ya están purificados.

Métodos terapéuticos

Los métodos terapéuticos implican administrar a un sujeto que necesite tratamiento una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo contemplado por la invención. Una cantidad "terapéuticamente eficaz" se define aquí como la cantidad de un anticuerpo que es de cantidad suficiente para agotar células CD38-positivas en un área tratada de un sujeto – ya sea como una única dosis o según un régimen de dosificación múltiple, solo o en combinación con otros agentes, que conduce al alivio de la afección adversa, aunque cuya cantidad es toxicológicamente tolerable. El sujeto puede ser un ser humano o un animal no humano (por ejemplo, conejo, rata, ratón, mono u otro primate de orden inferior).

Un anticuerpo de la invención se puede coadministrar con medicamentos conocidos, y en algunos casos el propio anticuerpo se puede modificar. Por ejemplo, un anticuerpo se podría conjugar a una inmunotoxina o radioisótopo para incrementar potencialmente más la eficacia.

Los anticuerpos de la invención se pueden usar como una herramienta terapéutica o de diagnóstico en una variedad de situaciones en las que CD38 se expresa o se encuentra de forma indeseable. Los trastornos y afecciones particularmente adecuados para el tratamiento con un anticuerpo de la invención son mieloma múltiple (MM) y otras enfermedades hematológicas, tales como leucemia linfocítica crónica (CLL), leucemia mielógena crónica (CML), leucemia mielógena aguda (AML), y leucemia linfocítica aguda (ALL). Un anticuerpo de la invención también se puede usar para tratar una enfermedad inflamatoria tal como artritis reumatoide (RA) o lupus eritematoso sistémico (SLE).

Para tratar cualquiera de los trastornos anteriores, las composiciones farmacéuticas para uso según la presente invención se pueden formular de manera convencional usando uno o más vehículos o excipientes fisiológicamente aceptables. Un anticuerpo de la invención se puede administrar por cualquier medio adecuado, que puede variar, dependiendo del tipo de trastorno que se esté tratando. Las vías posibles de administración incluyen la administración parenteral (por ejemplo, intramuscular, intravenosa, intraarterial, intraperitoneal, o subcutánea), intrapulmonar e intranasal, y, si se desea para tratamiento inmunosupresivo local, intralesional. Además, un anticuerpo de la invención se puede administrar mediante infusión por pulsos, con, por ejemplo, dosis decrecientes del anticuerpo. Preferiblemente, la dosificación se da mediante inyecciones, lo más preferible inyecciones intravenosas o subcutáneas, dependiendo en parte de si la administración es breve o crónica. La cantidad a administrar dependerá de una variedad de factores tales como los síntomas clínicos, el peso del individuo, si se administran otros fármacos. El experto reconocerá que la vía de administración variará dependiendo del trastorno o afección a tratar.

La determinación de una cantidad terapéuticamente eficaz de los nuevos anticuerpos humanos, según esta invención, dependerá enormemente de las características particulares del paciente, de la vía de administración, y de la naturaleza del trastorno que se esté tratando. Se puede encontrar una guía general, por ejemplo, en las publicaciones de la International Conference on Harmonisation y en REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, capítulos 27 y 28, p. 484-528 (18ª ed., Alfonso R. Gennaro, Ed., Easton, Pa.: Mack Pub. Co., 1990). Más específicamente, la determinación de una cantidad terapéuticamente eficaz dependerá de factores tales como la toxicidad y eficacia del medicamento. La toxicidad se puede determinar usando métodos bien conocidos en la técnica y encontrados en las referencias anteriores. La eficacia se puede determinar utilizando la misma guía junto con los métodos descritos más abajo en los Ejemplos.

Métodos de diagnóstico

CD38 se expresa enormemente en células hematológicas en ciertas neoplasias; de este modo, se puede emplear un anticuerpo anti-CD38 de la invención a fin de formar una imagen o visualizar un sitio de posible acumulación de células neoplásicas en un paciente. A este respecto, un anticuerpo se puede marcar de forma detectable, a través del uso de radioisótopos, marcadores de afinidad (tales como biotina, avidina, etc.), marcadores fluorescentes, átomos paramagnéticos, etc. Los procedimientos para lograr tal marcaje son bien conocidos en la técnica. La aplicación clínica de anticuerpos en formación de imágenes de diagnóstico se repasa por Grossman, H. B., Urol. Clin. North Amer. 13:465-474 (1986)), Unger, E. C. et al., Invest. Radiol. 20:693-700 (1985)), y Khaw, B. A. et al., Science 209:295-297 (1980)).

La detección de focos de tales anticuerpos marcados detectablemente puede ser indicativa de un sitio de desarrollo de tumor, por ejemplo. Como se describe aquí, el examen se realiza retirando muestras de tejido o sangre e incubando tales muestras en presencia de los anticuerpos marcados detectablemente. Como se describe además aquí, esta técnica se realiza de una manera no invasiva mediante el uso de formación de imágenes magnéticas,

fluorografía, etc. Tal ensayo de diagnóstico se puede emplear para monitorizar el éxito del tratamiento de las enfermedades, en el que la presencia o ausencia de células CD38-positivas es un indicador relevante. También se describe aquí el uso de un anticuerpo anti-CD38, como se describe aquí, para el diagnóstico en un marco ex vivo.

Composiciones terapéuticas y de diagnóstico

5 Los anticuerpos de la presente invención se pueden formular según métodos conocidos para preparar composiciones farmacéuticamente útiles, en las que un anticuerpo de la invención (incluyendo cualquier fragmento funcional del mismo) se combina en una mezcla con un vehículo portador farmacéuticamente aceptable. Los vehículos adecuados y su formulación se describen, por ejemplo, en REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES (18^a ed., Alfonso R. Gennaro, Ed., Easton, Pa.: Mack Pub. Co., 1990). A fin de formar una composición farmacéuticamente aceptable adecuada para la administración eficaz, tales composiciones contendrán una cantidad eficaz de uno o más de los anticuerpos de la presente invención, junto con una cantidad adecuada de vehículo portador.

15 Las preparaciones se pueden formular adecuadamente para dar una liberación controlada del compuesto activo. Las preparaciones de liberación controlada se pueden lograr mediante el uso de polímeros para complejar o absorber el anticuerpo anti-CD38. El suministro controlado se puede realizar seleccionando macromoléculas apropiadas (por ejemplo poliésteres, poliaminoácidos, polivinilpirrolidona, etileno-acetato de vinilo, metilcelulosa, carboximetilcelulosa, o sulfato de protamina) y la concentración de macromoléculas así como los métodos de incorporación a fin de controlar la liberación. Otro método posible para controlar la duración de acción mediante preparaciones de liberación controlada es incorporar anticuerpo anti-CD38 en partículas de un material polimérico tal como poliésteres, poliaminoácidos, hidrogeles, poli(ácido láctico) o copolímeros de etileno-acetato de vinilo. Como alternativa, en lugar de incorporar estos agentes en partículas poliméricas, es posible atrapar estos materiales en microcápsulas preparadas, por ejemplo, mediante técnicas de coacervación o mediante polimerización interfacial, por ejemplo microcápsulas de hidroximetilcelulosa o de gelatina y microcápsulas de poli(metacrilato de metilo), respectivamente, o en sistemas de suministro de fármacos coloidales, por ejemplo liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas, y nanocápsulas, o en macroemulsiones. Tales técnicas se describen en Remington's Pharmaceutical Sciences (1980).

25 Los compuestos se pueden formular para la administración parenteral mediante inyección, por ejemplo mediante inyección de bolo o infusión continua. Las formulaciones para inyección se pueden presentar en forma de dosificación unitaria, por ejemplo en ampollas, o en recipientes de múltiples dosis, con un conservante añadido. Las composiciones pueden tomar formas tales como suspensiones, disoluciones o emulsiones en vehículos oleosos o acuosos, y pueden contener agentes formuladores tales como agentes de suspensión, estabilizantes y/o dispersantes. Como alternativa, el ingrediente activo puede estar en forma de polvo para la constitución con un vehículo adecuado, por ejemplo agua estéril libre de pirógenos, antes del uso.

30 Si se desea, las composiciones se pueden presentar en un paquete o dispositivo dispensador, que puede contener una o más formas de dosificación unitarias que contienen el ingrediente activo. El paquete puede comprender, por ejemplo, lámina metálica o plástica, tal como un paquete de blíster. El paquete o dispositivo dispensador puede ir acompañado de instrucciones para la administración.

35 La invención se entiende además mediante referencia a los siguientes ejemplos de trabajo.

EJEMPLOS

40 Estirpes celulares

Las siguientes estirpes celulares se obtuvieron de la European Collection of Cell Cultures (ECACC), la German Collection of Microorganisms (DSMZ) o la American Type Culture collection (ATCC): la estirpe celular de hibridoma productora del anticuerpo monoclonal IgG1 de ratón anti-CD38 OKT10 (ECACC, #87021903), células Jurkat (DSMZ, ACC282), LP-1 (DSMZ, ACC41), RPMI8226 (ATCC, CCL-155), HEK293 (ATCC, CRL-1573), CHO-K1 (ATCC, CRL-61) y Raji (ATCC, CCL-86).

Células y condiciones de cultivo

50 Todas las células se cultivaron en condiciones estándar a 37°C y 5% de CO₂ en una incubadora humidificada. Las estirpes celulares LP-1, RPMI8226, Jurkat y Raji se cultivaron en RPMI1640 (Pan biotech GmbH, #P04-16500) suplementado con 10% de FCS (PAN biotech GmbH, #P30-3302), 50 U/ml de penicilina, 50 µg/ml de estreptomina (Gibco, #15140-122) y 2 mM de glutamina (Gibco, #25030-024) y, en el caso de células Jurkat y Raji, adicionalmente se tuvieron que añadir 10 mM de Hepes (Pan biotech GmbH, #P05-01100) y 1 mM de piruvato sódico (Pan biotech GmbH, # P04-43100).

55 CHO-K1 y HEK293 se hicieron crecer en DMEM (Gibco, #10938-025) suplementado con 2 mM de glutamina y 10% de FCS. Los transfectantes estables de CD38 CHO-K1 se mantuvieron en presencia de G418 (PAA GmbH, P11-012), mientras que para HEK293, fue esencial la adición de 1 mM de piruvato sódico. Después de la transfección transitoria de HEK293, el 10% de FCS se sustituyó por Ultra low IgG FCS (Invitrogen, #16250-078). La estirpe

celular OKT10 se cultivó en IDMEM (Gibco, #31980-022), suplementado con 2 mM de glutamina y 20% de FCS.

Preparación de suspensiones celulares individuales a partir de sangre periférica

5 Todas las muestras de sangre se tomaron tras la autorización por escrito. Las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) se aislaron de donantes sanos mediante Histopaque®-1077 (Sigma), según las instrucciones del fabricante. Los glóbulos rojos se agotaron de estas suspensiones celulares mediante incubación en tampón de lisis ACK (0,15 M de NH₄Cl, 10 mM de KHCO₃, 0,1 M de EDTA) durante 5 min. a RT, o un derivado comercial (Bioscience, #00-4333). Las células se lavaron dos veces con PBS y después se procesaron adicionalmente para citometría de flujo o ADCC (véase más abajo).

Citometría de flujo ("FACS")

10 Todas las tinciones se llevaron a cabo en placas de cultivo de 96 pocillos de fondo redondo (Nalge Nunc) con 2 x 10⁵ células por pocillo. Las células se incubaron con anticuerpos Fab o IgG en las concentraciones indicadas en 50 µl de tampón de FACS (PBS, 3% de FCS, 0,02% de NaN₃) durante 40 min. a 4°C. Las células se lavaron dos veces y después se incubaron con F(ab')₂ anti-IgG (H+L) humana de cabra o anti-IgG (H+L) de ratón de cabra (Jackson Immuno Research), conjugado con R-ficoeritrina (PE), diluido 1:200 en tampón de FACS, durante 30 min. a 4°C. Las células se lavaron nuevamente, se resuspendieron en 0,3 ml de tampón de FACS, y se analizaron nuevamente mediante citometría de flujo en un FACSCalibur (Becton Dickinson, San Diego, CA).

20 Para los análisis de Scatchard a base de FACS, se tiñeron células RPMI8226 con 12 diluciones diferentes (1:2ⁿ) comenzando con una concentración final de 12,5 µg/ml (IgG). Para cada concentración, se usaron al menos dos medidas independientes, y los valores de K_D se extrapolaron a partir de las intensidades medias de la fluorescencia según Chamow et al. (1994).

Resonancia de plasmones de superficie

25 Las constantes cinéticas K_{on} y K_{off} se determinaron con diluciones en serie del Fab respectivo que se une a la proteína de fusión CD38-Fc inmovilizada covalentemente, usando el instrumento BIAcore 3000 (Biacore, Uppsala, Suecia). Para la inmovilización covalente del antígeno, se usó química de acoplamiento de aminas a base de EDC-NHS estándar. Para el acoplamiento directo de la proteína de fusión CD38-Fc, se revistieron matrices de sensores CM5 (Biacore) con ~600-700 RU en 10 mM de tampón de acetato, pH 4,5. Para la celda de flujo de referencia, se usó una cantidad respectiva de HSA (seroalbúmina humana). Se realizaron medidas cinéticas en PBS (136 mM de NaCl, 2,7 mM de KCl, 10 mM de Na₂HPO₄, 1,76 mM de KH₂PO₄ pH 7,4) a un caudal de 20 µl/min. usando un intervalo de concentración de Fab de 1,5-500 nM. El tiempo de inyección para cada concentración fue 1 min., seguido de 2 min. de fase de disociación. Para la regeneración, se usaron 5 µl de 10 mM de HCl. Todos los sensogramas se ajustaron localmente usando el software de evaluación BIA 3.1 (Biacore).

EJEMPLO 1: Generación de anticuerpos a partir de bibliotecas HuCAL

35 Para la generación de anticuerpos terapéuticos frente a CD38, se llevaron a cabo selecciones con la biblioteca de presentación de fagos MorphoSys HuCAL GOLD. HuCAL GOLD® es una biblioteca de Fab basada en el concepto HuCAL® (Knappik et al., 2000; Krebs et al., 2001), en el que las seis CDRs están diversificadas, y que emplea la tecnología CysDisplay™ para ligar fragmentos Fab a la superficie del fago (Löbning, 2001).

A. Rescate de fagómidos, amplificación de fagos y purificación

40 La biblioteca de fagómidos HuCAL GOLD® se amplificó en 2 x medio TY que contiene 34 µg/ml de cloranfenicol y 1% de glucosa (2 x TY-CG). Tras la infección con el fago cooperador (VCSM13) a una OD600 de 0,5 (30 min. a 37°C sin agitación; 30 min. a 37°C agitando a 250 rpm), las células se centrifugaron (4120 g; 5 min.; 4°C), se resuspendieron en 2 x TY/34 µg/ml de cloranfenicol/50 µg/ml de kanamicina, y se hicieron crecer toda la noche a 22°C. Los fagos se precipitaron con PEG a partir del sobrenadante, se resuspendieron en PBS/20% de glicerol, y se almacenaron a -80°C. La amplificación de los fagos entre dos rondas de selección por afinidad se llevó a cabo según lo siguiente: células TG1 en la mitad de la fase logarítmica se infectaron con fagos eluidos y se sembraron en placas sobre LB-agar suplementado con 1% de glucosa y 34 µg/ml de cloranfenicol (LB-CG). Tras la incubación durante toda la noche a 30°C, las colonias se recuperaron por rascado, se ajustaron a una OD600 de 0,5, y se añadió un fago cooperador como se describió anteriormente.

B. Selecciones por afinidad con HuCAL GOLD®

50 Para las selecciones, los fagos con el anticuerpo HuCAL GOLD® se dividieron en tres conjuntos que corresponden a diferentes genes maestro de VH (conjunto 1: VH1/5λκ, conjunto 2: VH3 λκ, conjunto 3: VH2/4/6 λκ). Estos conjuntos se sometieron individualmente a 3 rondas de selección de células completas en células CHO-K1 que expresan CD38, seguido de la elución por pH y una etapa de post-adsorción sobre células CHO-K1 CD38 negativas para el agotamiento de los fagos con anticuerpos irrelevantes. Finalmente, los fagos con el anticuerpo restantes se usaron para infectar células TG1 de E. coli. Tras la centrifugación, el pelete bacteriano se resuspendió en 2 x medio TY, se sembró en placas de agar, y se incubó toda la noche a 30°C. Los clones seleccionados se rascaron entonces de las

placas, los fagos se rescataron y se amplificaron. La segunda y tercera rondas de selecciones se llevaron a cabo como la inicial.

5 Los insertos de los fagos HuCAL GOLD® seleccionados que codifican Fab se subclonaron en el vector de expresión pMORPH@x9_Fab_FS (Rauchenberger et al., 2003) para facilitar la expresión rápida de Fab soluble. El ADN de los clones seleccionados se digirió con XbaI y EcoRI, cortando de ese modo el inserto que codifica Fab (ompA-VLCL y phoA-Fd), y se clonó en el vector pMORPH@x9_Fab_FS cortado con XbaI/EcoRI. Fab expresado en este vector posee dos etiquetas C-terminales (FLAG™ y Strep-tag® II) para la detección y purificación.

EJEMPLO 2: Ensayos biológicos

10 La citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) y la citotoxicidad dependiente del complemento se midieron según un protocolo publicado basado en análisis de citometría de flujo (Naundorf et al., 2002) como sigue:

ADCC:

15 Para las medidas de ADCC, las células diana (T) se ajustaron a $2,0E+0,5$ células/ml y se marcaron con 100 ng/ml de Calcein AM (Molecular Probes, C-3099) en medio RPMI1640 (Pan biotech GmbH) durante 2 minutos a temperatura ambiente. La calceína residual se eliminó mediante 3 etapas de lavado en medio RPMI1640. Paralelamente, se prepararon PBMC como fuente para células efectoras (asesinas naturales) (E), se ajustaron a $1,0E+0,7$ y se mezclaron con las células diana marcadas, para producir una relación final E:T de 50:1 o menos, dependiendo de las condiciones de ensayo. Las células se lavaron una vez, y la mezcla celular se resuspendió en 200 μ l de medio RPMI1640 que contiene el anticuerpo respectivo a diferentes diluciones. La placa se incubó durante 4 h en condiciones estándar a 37°C y 5% de CO₂ en una incubadora humidificada. Antes del análisis mediante FACS, las células se marcaron con yoduro de propidio (PI) y se analizaron mediante citometría de flujo (Becton-Dickinson). Para cada ensayo, se contaron entre 50.000 y 150.000 sucesos.

La siguiente ecuación da lugar a la actividad exterminadora [en %]:

$$\frac{ED^A}{EL^A + ED^A} \times 100$$

con ED^A = sucesos de células muertas (células teñidas con calceína + PI), y

25 EL^A = sucesos de células vivas (células teñidas con calceína)

CDC:

30 Para las medidas de CDC, se añadieron $5,0E+04$ transfectantes de CD38 CHO-K1 a una placa de pocillos de microtitulación (Nunc) junto con una dilución 1:4 de suero humano (Sigma, #S-1764) y el anticuerpo respectivo. Todos los reactivos y células se diluyeron en medio RPMI1640 (Pan biotech GmbH) suplementado con 10% de FCS. La mezcla de reacción se incubó durante 2 h en condiciones estándar a 37°C y 5% de CO₂ en una incubadora humidificada. Como controles negativos sirvieron complemento inactivado por calor o transfectantes de CD38 sin anticuerpo. Las células se marcaron con PI y se sometieron a análisis mediante FACS.

35 En total, se contaron 5000 sucesos, y el número de células muertas a diferentes concentraciones de anticuerpo se usó para la determinación de los valores de EC50. La siguiente ecuación da lugar a la actividad exterminadora [en %]:

$$\frac{ED^C}{EL^C + ED^C} \times 100$$

con ED^C = sucesos de células muertas (células teñidas con PI), y

EL^C = sucesos de células vivas (no teñidas)

40 Los valores de citotoxicidad de un total de 12 diluciones de anticuerpo diferentes (1:2ⁿ) por triplicado se usaron en ADCC y por duplicado en CDC para cada anticuerpo, a fin de obtener valores de EC-50 con un software de análisis estándar (PRISM®, Graph Pad Software).

EJEMPLO 3: Generación de transfectantes de CD38 estables y proteínas de fusión CD38-Fc

A fin de generar la proteína CD38 para la selección e identificación, se tuvieron que establecer dos sistemas de expresión diferentes. La primera estrategia incluyó la generación de la proteína de fusión CD38-Fc, que se purificó a

partir de sobrenadantes tras la transfección transitoria de células HEK293. La segunda estrategia implicó la generación de una estirpe celular CHO-K1 estable para la expresión elevada de CD38 en la superficie, para ser usada para la selección de fagos de anticuerpos vía selección de células completas.

5 Como etapa inicial, se usaron células Jurkat (DSMZ ACC282) para la generación de ADNc (Invitrogen), seguido de la amplificación de toda la secuencia codificante de CD38 usando cebadores complementarios a los primeros 7 y a los últimos 9 codones de CD38, respectivamente (cebador MTE001 y MTE002rev; Tabla 4). El análisis de secuencia del inserto de CD38 confirmó la secuencia de aminoácidos publicada por Jackson et al. (1990), excepto para la posición 49, que reveló una glutamina en lugar de una tirosina como se describe por Nata et al. (1997). Para la introducción de sitios de endonucleasas de restricción y la clonación en diferentes derivados del vector de expresión pcDNA3.1 (Stratagene), el producto de la PCR purificado sirvió como molde para la reamplificación de todo el gen (cebadores MTE006 y MTE007rev, Tabla 4) o una parte (cebadores MTE004 y MTE009rev, Tabla 4) de él. En este último caso, se amplificó un fragmento que codifica el dominio extracelular (aa 45 a 300) y se clonó en el marco entre la secuencia líder de κ humana y una secuencia de Fc-gamma 1 humana. Este vector sirvió como vector de expresión para la generación de proteína de fusión soluble CD38-Fc. Para la inserción del gen de longitud completa de CD38, se usó otro derivado de pcDNA3.1 sin la secuencia líder. En este caso, un codón de parada delante de la región codificante de Fc y la secuencia líder ausente dieron lugar a la expresión superficial de CD38. Se transfectaron transitoriamente células HEK293 con el vector de la proteína de fusión de Fc para la generación de la proteína de fusión soluble CD38-Fc, y, en el caso del derivado de longitud completa, se transfectaron células CHO-K1 para la generación de una estirpe celular estable que expresa CD38.

20 Tabla 4:

Cebador nº	Secuencia (5'→ 3')
MTE001	ATG GCC AAC TGC GAG TTC AGC (SEC ID NO: 25)
MTE002rev	TCA GAT CTC AGA TGT GCA AGA TGA ATC (SEC ID NO: 26)
MTE004	TT GGT ACC AGG TGG CGC CAG CAG TG (SEC ID NO: 27)
MTE006	TT GGT ACC ATG GCC AAC TGC GAG (SEC ID NO: 28)
MTE007rev	CCG ATA TCA* GAT CTC AGA TGT GCA AGA TG (SEC ID NO: 29)
MTE009rev	CCG ATA TC GAT CTC AGA TGT GCA AGA TG (SEC ID NO: 30)
* que conduce a un codón de parada (TGA) en la orientación codificante.	

EJEMPLO 4: Clonación, expresión y purificación de HuCAL® IgG1:

25 A fin de expresar IgG de longitud completa, se subclonaron los fragmentos del dominio variable de las cadenas pesada (VH) y ligera (VL) de los vectores de expresión de Fab en vectores pMORPH®_hlg apropiados (véanse las Figuras 8 a 10). Para subclonar el fragmento del dominio VH en pMORPH®_hlgG1, se usaron los pares de endonucleasas de restricción *BspI/MfeI* (preparación del inserto) y *BspI/EcoRI* (preparación del vector). Para subclonar el fragmento del dominio VL en los vectores pMORPH®_hlgk_1 o pMORPH®_h_lgλ_1 respectivos, se usaron los pares enzimáticos *EcoRV/HpaI* (inserto de lambda) y *EcoRV/BsMI* (inserto de kappa). Los constructos de IgG resultantes se expresaron en células HEK293 (ATCC CRL-1573) mediante transfección transitoria usando técnica de coprecipitación de ADN con fosfato de calcio estándar. Las IgGs se purificaron de los sobrenadantes del cultivo celular mediante cromatografía de afinidad vía una columna de Proteína A Sefarosa. El procesamiento posterior aguas abajo incluyó un intercambio de tampón mediante filtración en gel y la filtración estéril de IgG purificada. El control de calidad relevó una pureza de >90% mediante SDS-PAGE reductor, y >90% de IgG monomérica según se determina mediante cromatografía de exclusión de tamaños analítica. El contenido de endotoxina del material se determinó mediante un ensayo cinético a base de LAL (Cambrex European Endotoxin Testing Service, Bélgica).

EJEMPLO 5: Generación y producción de OKT10 quimérico (chOKT10; SEC ID NOS: 23 y 24) (a título de referencia solamente)

40 Para la construcción de chOKT10, las regiones de VH y VL de ratón se amplificaron mediante PCR usando ADNc preparado a partir de la estirpe celular de hibridoma OKT10 murina (ECACC #87021903). Se usó un conjunto de cebadores como se publicó (Dattamajumdar et al., 1996; Zhou et al., 1994). Los productos de la PCR se usaron para la clonación Topo (Invitrogen; vector pCRII), y las colonias individuales se sometieron a análisis de secuencia (cebador inverso M13) que reveló dos secuencias de cadena ligera kappa diferentes y una secuencia de cadena pesada. Según los alineamientos de secuencia (base de datos de la secuencia nucleotídica de EMBL) y según la bibliografía (Krebber et al, 1997), una de las secuencias kappa pertenece al repertorio intrínseco de la pareja de

5 fusión de células tumorales X63Ag8.653, y por tanto no pertenece al anticuerpo OKT10. Por lo tanto, solo se usaron para la clonación posterior la nueva secuencia kappa y el fragmento individual de VH. Ambos fragmentos se volvieron a amplificar para la adición de sitios de endonucleasas de restricción, seguido de la clonación en los vectores de expresión de pMORPH® IgG1 respectivos. Las secuencias para la cadena pesada (SEC ID NO: 23) y para la cadena ligera (SEC ID NO: 24) se dan en la Fig. 6. Células HEK293 se transfectaron transitoriamente, y el sobrenadante se analizó en FACS para determinar la unión del anticuerpo quimérico OKT10 a la estirpe celular Raji (ATCC) que sobreexpresa CD38.

EJEMPLO 6: Cartografiado epitópico

1. Materiales y métodos:

10 Anticuerpos:

Las siguientes IgGs anti-CD38 se enviaron para los cartografiados epitópicos:

MOR#	Lot#	Formato	Conc. [mg/ml]/Vol.[µl]
MOR03077	2CHE106_030602	IgG1 humana	0,44/1500
MOR03079	2APO31	IgG1 humana	0,38/500
MOR03080	030116_4CUE16	IgG1 humana	2,28/200
MOR0100	030612_6SBA6	IgG1 humana	0,39/500
OKT10 quim. *	030603_2CHE111	IgG1 humana	0,83/500
* OKT10 quimérico que consiste en Fc humano y regiones variables de ratón.			

Secuencia de CD38:

15 La secuencia de aminoácidos (aa) (posición 44-300) se basa en CD38 humana tomada de la secuencia publicada bajo el número de acceso primario SWISS-PROT P28907. Para el diseño del péptido, en la posición 49 se ha usado el aa Q (en lugar de T).

Análisis PepSpot:

20 Los péptidos antigénicos se sintetizaron sobre una membrana de celulosa por etapas, dando como resultado una disposición definida (matriz peptídica), y están unidos covalentemente a la membrana de celulosa. Los ensayos de unión se llevaron a cabo directamente sobre la matriz peptídica.

25 En general, una matriz de péptido antigénico se incubaba con tampón de bloqueo durante varias horas para reducir la unión no específica de los anticuerpos. La incubación con el anticuerpo primario (que se une al péptido antigénico) en el tampón de bloqueo se produce seguido de la incubación con el anticuerpo secundario marcado con peroxidasa (POD), que se une selectivamente al anticuerpo primario. Se realiza un lavado corto con tampón de T (Tween)-TBS directamente tras la incubación de la matriz del péptido antigénico con el anticuerpo secundario, seguido del primer experimento de quimioluminiscencia, para obtener una primera visión de conjunto de cuáles péptidos antigénicos se unen al anticuerpo primario. Siguen después varias etapas de lavado con tampón (tampón T-TBS y TBS), para reducir la unión positiva falsa (unión no específica del anticuerpo a la propia membrana de celulosa). Después de estas etapas de lavado, se lleva a cabo el análisis de quimioluminiscencia final. Los datos se analizaron con un sistema formador de imágenes que muestra la intensidad de la señal (unidades de luz Boehringer, BLU) como medidas individuales para cada péptido. A fin de evaluar la unión no específica de los anticuerpos secundarios (anti-IgG humana), estos anticuerpos se incubaron con la matriz peptídica en ausencia de anticuerpos primarios como la primera etapa. Si el anticuerpo primario no muestra ninguna unión a los péptidos, se puede marcar directamente con POD, que incrementa la sensibilidad del sistema (como se realizó para MOR3077). En este caso, se lleva a cabo una química de acoplamiento convencional vía grupos amino libres.

30 El antígeno se escaneó con péptidos de 13-meros (solapamiento de 11 aminoácidos). Esto dio como resultado matrices de 123 péptidos. Los ensayos de unión se llevaron a cabo directamente sobre la matriz. Los anticuerpos unidos al péptido, MOR03077, MOR03079, MOR03080, MOR03100 y OKT10 quimérico, se detectaron usando un anticuerpo secundario marcado con peroxidasa (anticuerpo aislado por afinidad, específico de la cadena gamma, anti-IgG humana de cabra conjugado con peroxidasa; Sigma-Aldrich, A6029). Los cartografiados se llevaron a cabo con un sustrato quimioluminiscente en combinación con un sistema formador de imágenes. Adicionalmente, se llevó a cabo un marcaje directo con POD de MOR03077, a fin de incrementar la sensibilidad del sistema.

2. Sumario y conclusiones:

Los cinco anticuerpos mostraron diferentes perfiles en el análisis de PepSpot. En la Fig. 7 se da un resumen esquemático, que ilustra las diferentes secuencias de aa de CD38 que se reconocen. El epítipo para MOR03079 y OKT10 quimérico se puede considerar claramente como lineal. El epítipo para MOR03079 se puede postular en aa 192-206 (VSRRF AEAACDVVHV) de CD38, mientras que para OKT10 quimérico se reconoce predominantemente una secuencia entre aa 284 y 298 (FLQCVKNPEDSSCTS). Estos últimos resultados confirman los datos publicados para el OKT10 murino parental (Hoshino et al., 1997), que postula su epítipo entre aa 280-298. Todavía, para una definición y determinación más precisa del epítipo de aminoácidos clave (sitios de interacción antígeno-anticuerpo principales), se debería idear un acortamiento de los péptidos VSRRF AEAACDVVHV y FLQCVKNPEDSSCTS y un escaneo de alanina de ambos.

Los epítopos para MOR03080 y MOR03100 se pueden considerar claramente como discontinuos, puesto que se reconocieron varios péptidos que cubren sitios diferentes de los sitios de la proteína. Esos péptidos comprenden aa 82-94 y aa 158-170 para MOR03080 y aa 82-94, 142-154, 158-170, 188-200 y 280-296 para MOR03100. Sin embargo, se pueden postular algunos solapamientos entre ambos epítopos, puesto que dos sitios diferentes que residen en las posiciones de aa 82-94 (CQSWDAFKGAFI; péptido #20) y 158-170 (TWCGEFNTSKINY; péptido #58) son reconocidos por ambos anticuerpos.

El epítipo para MOR03077 se puede considerar como claramente diferente de los dos últimos, y se puede describir como epítipo discontinuo multisegmentado. El epítipo incluye aa 44-66, 110-122, 148-164, 186-200 y 202-224.

EJEMPLO 7: Ensayo de liberación de IL-6/de proliferación

1. Materiales y métodos:

Los ensayos de proliferación y de liberación de IL-6 se han llevado a cabo según Ausiello et al. (2000), con las siguientes modificaciones: PBMCs procedentes de diferentes donantes sanos (tras obtener la autorización por escrito) se purificaron mediante centrifugación mediante gradiente de densidad usando el sistema de separación celular Histopaque según las instrucciones del proveedor (Sigma), y se cultivaron en condiciones estándar (5% de CO₂, 37°C) en medio RPMI1640, suplementado con 10% de FCS y glutamina ("RPMI1640 completo"). Para ambos ensayos, se usaron los siguientes anticuerpos: Mabs IgG1s anti-CD38 HuCAL® MOR03077, MOR03079, y MOR03080, un anticuerpo monoclonal IgG2a murino agonista (IB4; Malavasi et al., 1984), un anticuerpo IgG1 HuCAL® irrelevante, un control de isotipo coincidente (IgG2a murino: anticuerpo específico de hapteno, anti-trinitrofenol; n° de catalizador.: 555571, clon G155-178; Becton Dickinson) o un control del medio. Para el ensayo de liberación de IL-6, se incubaron 1,0 E+06 PBMCs en 0,5 ml de medio RPMI1640 completo durante 24 h en un tubo de cultivo de 15 ml (Falcon) en presencia de 20 µg/ml de anticuerpos. Los sobrenadantes del cultivo celular se cosecharon y se analizaron para determinar la liberación de IL-6 usando el kit Quantikine según el protocolo del fabricante (R&D systems). Para el ensayo de proliferación, se incubaron 2,0E+05 PBMCs durante 3 días en una placa de fondo plano de 96 pocillos (Nunc) en presencia de 20 µg/ml de anticuerpos. Cada ensayo se llevó a cabo por duplicado. Después de 4 días, se añadió BrdU a cada pocillo, y las células se incubaron durante 24 h adicionales a 37°C antes de la fijación celular y la desnaturalización del ADN según el protocolo del proveedor (Roche). La incorporación de BrdU se midió vía un anticuerpo anti-BrdU acoplado a peroxidasa, en un montaje basado en quimioluminiscencia.

2. Resumen y conclusiones:

Ensayo de proliferación:

Además de sus actividades catalíticas como una ciclasa e hidrolasa de ADP-ribosa cíclica, CD38 presenta la capacidad para transducir señales de relevancia biológica (Hoshino et al., 1997; Ausiello et al., 2000). Esas funciones se pueden inducir in vivo, por ejemplo, mediante interacciones de receptor-ligando, o mediante reticulación con anticuerpos anti-CD38. Esos sucesos de señalización conducen por ejemplo a la movilización de calcio, proliferación de linfocitos y liberación de citocinas. Sin embargo, esta señalización no depende solamente del epítipo antigénico, sino que también puede variar de un donante a otro (Ausiello et al., 2000). En vista de la inmunoterapia, los anticuerpos no agonistas son preferibles con respecto a los anticuerpos agonistas. Por lo tanto, anticuerpos HuCAL® anti-CD38 (Mabs MOR03077; MOR03079, MOR03080) se caracterizaron adicionalmente en un ensayo de proliferación y un ensayo de liberación de IL-6 (factor de crecimiento de MM importante) en comparación con el anticuerpo de referencia chOKT10 y el anticuerpo monoclonal agonista IB4 anti-CD38.

Como se demuestra en la Fig. 11 y Fig. 12 los anticuerpos HuCAL anti-CD38 Mab#1, 2 y 3, así como el anticuerpo de referencia chOKT10 y los controles negativos correspondientes, no mostraron o mostraron una inducción solamente débil de la proliferación y ninguna liberación de IL-6, en comparación con el anticuerpo agonista IB4.

EJEMPLO 8: Ensayo clonogénico

1. Materiales y métodos:

PBMCs que poseen células precursoras CD34+/CD38+ autólogas se aislaron de individuos sanos (tras obtener la autorización por escrito) mediante centrifugación por gradiente de densidad usando el sistema de separación celular

Histopaque según las instrucciones del proveedor (Sigma), y se incubaron con diferentes anticuerpos HuCAL® IgG1 anti-CD38 (Mabs MOR03077, MOR03079, y MOR03080) y el control positivo (PC) chOKT10 a 10 µg/ml. El medio y un HuCAL® IgG1 irrelevante sirvieron como control del fondo. Cada ensayo de ADCC consistió en 4,0E+05 PBMCs, que se incubaron durante 4 h a 37°C en medio RPMI1640 suplementado con 10% de FCS. Para el ensayo clonogénico, se inocularon 2,50 ml de metilcelulosa “completa” (CellSystems) con 2,5 E+05 células procedentes del ensayo de ADCC, y se incubaron para el desarrollo de colonias durante al menos 14 días en un entorno controlado (37°C; 5% de CO₂). Las colonias se analizaron mediante dos operadores independientes y se agruparon en BFU-E + CFU-GEMM (unidades formadoras de estallido de eritroides y células madre de granulocitos/eritroides/macrófagos/megacariocitos) y CFU-GM (células madre de granulocitos/macrófagos).

2. Sumario y conclusiones:

Puesto que la expresión de CD38 no se encuentra solamente en células inmunitarias en el linaje mieloide (por ejemplo monocitos, granulocitos) y linfoide (por ejemplo linfocitos B y T activados; células plasmáticas) sino también en las células precursoras respectivas (CD34+/CD38+), es importante que esas células no se vean afectadas por la muerte mediada por anticuerpos. Por lo tanto, se aplicó un ensayo clonogénico a fin de analizar esos efectos sobre los progenitores CD34+/CD38+.

Se incubaron PBMCs de donantes sanos con anticuerpos HuCAL® anti-CD38 (Mab#1, Mab#2 y Mab#3) o varios controles (anticuerpo HuCAL® irrelevante, medio, y anticuerpo de referencia chOKT10 como control positivo) según un protocolo estándar de ADCC, seguido de la incubación posterior en metilcelulosa acondicionada, para el desarrollo de colonias. Como se muestra en la Fig. 13, no se muestra reducción significativa de unidades formadoras de colonias para todos los anticuerpos HuCAL® anti-CD38 en comparación con un anticuerpo irrelevante o el anticuerpo de referencia.

EJEMPLO 9: Ensayos de ADCC con diferentes estirpes celulares y células de mieloma múltiple primarias

1. Materiales y métodos:

Aislamiento y ADCC de muestras de pacientes con MM: Se obtuvieron aspirados de médula ósea procedentes de pacientes con mieloma múltiple (tras obtener la autorización por escrito). Las células neoplásicas se purificaron vía un protocolo estándar usando perlas magnéticas anti-CD138 (Milteny Biotec) después de la centrifugación mediante gradiente de densidad (Sigma). Se llevó a cabo un ensayo de ADCC como se describe anteriormente.

2. Sumario y conclusiones:

Se usaron varias estirpes celulares derivadas de diferentes neoplasias en ADCC, a fin de mostrar el efecto citotóxico de los anticuerpos HuCAL® anti-CD38 sobre un espectro más amplio de estirpes celulares, incluyendo diferentes orígenes y niveles de expresión de CD38. Como se muestra en la Figura 14, todas las células mueren en ADCC a concentraciones de anticuerpo constantes (5 µg/ml) y relaciones E:T a 30:1. También se mostró la citotoxicidad vía ADCC para varias muestras de mieloma múltiple procedentes de pacientes. Todos los anticuerpos HuCAL® anti-CD38 fueron capaces de llevar a cabo una muerte dependiente de la dosis de células MM, y los valores de EC₅₀ variaron entre 0,006 y 0,249 nM (Figura 15).

EJEMPLO 10: Análisis de reactividad cruzada mediante FACS e inmunohistoquímica (IHC)

1. Materiales y métodos:

IHC con amígdalas: Para IHC, los Mabs HuCAL® anti-CD38 y un anticuerpo de control negativo irrelevante se convirtieron en el formato dHLX bivalente (Plückthun y Pack, 1997). Se cortaron criosecciones de 5 µm de ganglios linfáticos derivados de macacos, mono Rhesus y seres humanos (recuperados de los archivos del Instituto de Patología de la Universidad de Graz/Austria) con un criostato Leica CM3050. Las secciones se secaron al aire durante 30 minutos hasta 1 hora, y se fijaron durante 10 minutos en metanol enfriado con hielo, y se lavaron con PBS. Para la detección del formato dHLX, se usó un anticuerpo de ratón anti-His (Dianova) en combinación con el Envision Kit (DAKO). Para la detección de los anticuerpos de ratón anti-CD38 (por ejemplo, OKT10 monoclonal de ratón de referencia), solamente se usó el kit Envision.

Análisis de linfocitos mediante FACS: Se obtuvieron muestras de sangre tratadas con EDTA a partir de seres humanos sanos (tras obtener autorización por escrito), de monos Rhesus y macacos, y se sometieron a centrifugación mediante gradiente de densidad usando el sistema de separación celular Histopaque según las instrucciones del proveedor (Sigma). Para el análisis mediante FACS, las células de la interfase se incubaron con anticuerpos primarios (HuCAL® anti-CD38 y Mabs de control negativo como IgG2a murina o formato Fab, el anticuerpo murino de control positivo OKT10, y un control de isotipo coincidente), seguido de la incubación con anti-Flag M2 (Sigma; solo para el formato de Fab) y un anticonjugado de ratón marcado con ficoeritrina (PE) (Jackson Research). El análisis mediante FACS se llevó a cabo en la población linfocítica acotada.

2. Sumario y conclusiones:

HuCAL® anti-CD38 se analizaron para determinar la reactividad cruzada de CD38 entre especies. Mientras que todos los Mabs anti-CD38 fueron capaces de detectar CD38 humana en linfocitos en FACS e IHC, solamente MOR03080 junto con el control positivo OKT10 mostraron una reactividad adicional con CD38 de macaco y de mono Rhesus (véase la Tabla 5: Análisis de reactividad cruzada).

5

Tabla 5:

Anticuerpo	Linfocitos (FACS) y ganglios linfáticos (IHC) de:		
	Humano	Macaco	Mono Rhesus
Mab#1	++	-	-
Mab#2	++	-	-
Mab#3	++	++	++
PC	++	++	++
NC	-	-	-
++: fuerte tinción positiva; -: sin tinción; NC: control negativo; PC: control positivo (=cMab de referencia)			

EJEMPLO 11: Tratamiento de xenoinjertos de mieloma humano en ratones (usando la estirpe celular RPMI8226) con MOR03080

1. Establecimiento de modelo de ratón subcutáneo:

10 Se estableció un modelo de ratón subcutáneo para la estirpe celular tumoral derivada de mieloma humano RPMI8226 en ratones C.B-17-SCID hembras como sigue por Aurigon Life Science GmbH (Tutzing, Alemania): en el día -1, 0, y 1, se aplicaron intravenosamente anticuerpos policlonales anti-asialo GM1 (ASGM) (WAKO-Chemicals), que agotaron las células NK xenorreactivas en los ratones SCID, a fin de desactivar cualquier reactividad inmunitaria específica residual en ratones C.B-17-SCID. En el día 0, se inocularon subcutáneamente 5×10^6 ó 1×10^7 células tumorales RPMI8226 en 50 μ l de PBS en el flanco derecho de los ratones, tratados con ASGM (como se describe anteriormente) o no tratados (consistiendo cada grupo en cinco ratones). El desarrollo tumoral fue similar en los 4 grupos inoculados, no encontrándose ninguna diferencia significativa para el tratamiento con o sin anticuerpos anti-asialo GM1 o mediante inoculación de números diferentes de células. Los tumores parecen crecer lentamente con la tendencia de estancamiento u oscilación del tamaño durante algunos días. Dos tumores oscilaron en tamaño durante todo el período de investigación, e incluso un tumor se observó y desapareció totalmente desde un volumen pico de 321 mm³. Un estudio de tratamiento con este modelo tumoral debería incluir un número elevado de animales inoculados con tumores por grupo.

2. Tratamiento con MOR03080:

2.1 Objetivo del estudio

25 Este estudio se llevó a cabo por Aurigon Life Science GmbH (Tutzing, Alemania) para comparar la eficacia antitumoral de anticuerpos aplicados intraperitonealmente (HuCAL® anti-CD38) en comparación con el tratamiento con vehículo (PBS). El anticuerpo humano hMOR03080 (isotipo IgG1) se ensayó en diferentes cantidades y calendarios de tratamiento. Además, se ensayó el anticuerpo quimérico chMOR03080 (isotipo IgG2a: un anticuerpo quimérico que comprende las regiones variables de MOR03080 y las regiones constantes murinas construidas de forma similar a como se describe en el Ejemplo 5 para OKT10 (regiones VH/VL murina y constante humana)). La estirpe celular cancerosa RPMI8226 se escogió como modelo y se inoculó subcutáneamente en ratones hembra SCID como se describe anteriormente. Los criterios de valoración en el estudio fueron el peso corporal (p.c.), el volumen tumoral y signos clínicos.

2.2 Anticuerpos y vehículo

35 Los anticuerpos se proporcionaron listos para el uso a Aurigon a concentraciones de 2,13 mg/ml (MOR03080 hlgG1) y 1,73 mg/ml (MOR03080 chlG2a, y se almacenaron a -80°C hasta la aplicación. Los anticuerpos se descongelaron y diluyeron con PBS hasta la concentración final respectiva. El vehículo (PBS) se proporcionó listo para el uso a Aurigon, y se almacenó a 4°C hasta la aplicación.

2.3 Especificación de animales

40 Especie: ratón

Raza: Fox chase C.B-17-scld (C.B-Igh-1b/IcrTac)

Número y sexo: 75 hembras

Proveedor: Taconic M&B, Bomholtvej 10, DK-8680 Ry

Estado de salud: SPF

5 Peso ordenado: aprox. 18 g

Acimatación: 9 días

2.4 Estirpe celular tumoral

10 Las células tumorales (estirpe celular RPMI8226) se hicieron crecer y se transportaron a Aurigon Life Science GmbH, donde las células se dividieron y se hicieron crecer durante otro ciclo. Aurigon preparó las células para inyección en el día de la inoculación. El medio de cultivo usado para la propagación celular fue RPMI 1640 suplementado con 5% de FCS, 2 mM de L-glutamina y PenStrep. Las células no mostraron tasa de crecimiento o comportamiento inesperado.

Para la inoculación, las células tumorales se suspendieron en PBS y se ajustaron hasta una concentración final de 1×10^7 células/50 μ l en PBS. La suspensión de células tumorales se mezcló a conciencia antes de inyectarla.

15 2.5 Procedimiento experimental

En el día 0, 1×10^7 células tumorales RPMI8226 se inocularon subcutáneamente en el flanco dorsal derecho de 75 ratones SCID. Se construyó un primer grupo con 15 animales escogidos aleatoriamente (grupo 5) directamente después de la inoculación. Este grupo se trató con 1 mg/kg p.c. de hlgG1-MOR03080 cada segundo día entre el día 14 y 36. De todos los otros 60 animales, se construyeron 4 grupos con diez animales en cada grupo en el día 31 (volumen tumoral de alrededor de 92 mm³). Los grupos 1-4 se construyeron con tamaños tumorales medios y desviaciones estándar comparables. Se escogió un grupo adicional de 5 animales (grupo 6) que muestra volúmenes tumorales relativamente pequeños (volumen tumoral de alrededor de 50 mm³), para la comparación con el grupo 5 pretratado (mostrando todos menos tres ratones volúmenes tumorales menores que 10 mm³, uno con alrededor de 22 mm³, uno con alrededor de 44 mm³, y uno con alrededor de 119 mm³). Los grupos 1 a 4 se trataron cada segundo día desde el día 32 hasta el día 68 con PBS (vehículo; grupo 1), 1 mg/kg p.c. de hlgG1-MOR03080 (grupo 2) o 5 mg/kg p.c. de hlgG1-MOR03080 (grupo 3), o con 5 mg/kg p.c. de chlG2a-MOR03080 (grupo 4). El grupo 6 no recibió ningún tratamiento (véase la Tabla 6). Los volúmenes tumorales, el peso corporal y los signos clínicos se midieron dos veces a la semana hasta el final del estudio.

Tabla 6:

Grupo	Nº de animales	Tipo de aplicación	Sustancia	Calendario	Dosis de tratamiento [mg/kg]	Volumen de aplicación [μ l/kg]
1	10	i.p.	vehículo (PBS)	cada segundo día entre el día 32 y el día 68	--	10
2	10	i.p.	MOR03080 humano	cada segundo día entre el día 32 y el día 68	1	10
3	10	i.p.	MOR03080 IgG humana	cada segundo día entre el día 32 y el día 68	5	10
4	10	i.p.	MOR03080 IgG2a quimérica	cada segundo día entre el día 32 y el día 68	5	10
5	15	i.p.	MOR030S0 IgG1 humano	cada segundo día entre el día 14 y el día 36	1	10
6	5	--	--	--	--	--

30

2.6 Resultados

Observaciones clínicas y mortalidad

No se observaron hallazgos clínicos o mortalidad específicos relacionados con el tumor o con sustancias. En el

grupo 3 (hlgG1 5 mg/kg), cuatro animales murieron durante la toma de muestra de sangre (uno en el día 3, uno en el día 34; dos en el día 52). En el grupo 4 (mulgG2a 1 mg/kg) murió un solo animal durante la toma de muestra de sangre (día 34). Todos los otros animales que murieron durante el estudio se eutanasiaron debido al tamaño tumoral.

5 Desarrollo de peso corporal

No se observó interferencia relacionada con fármacos con el desarrollo de peso, en comparación con el grupo 1 (vehículo). El peso corporal estuvo notablemente influido por la toma de muestra de sangre en los grupos 3 (hlgG1 5 mg/kg) y 4 (mulgG2a 5 mg/kg). A pesar de tales interrupciones, la ganancia media de peso de todos los grupos fue continua.

10 Desarrollo tumoral (véase la Figura 16)

En el grupo 1 (vehículo), se encontró crecimiento tumoral en la tasa esperada con una progresión lenta. Puesto que esta estirpe celular tiene una desviación estándar pronunciada, se han excluido del análisis estadístico posterior los valores para el tumor más grande y el tumor más pequeño. El crecimiento tumoral de los animales en el grupo 1 fue comparable al crecimiento tumoral en el grupo 6 (no tratado), aunque este grupo comenzó con un volumen tumoral medio menor en el día 31. Por lo tanto, el tratamiento puede tener una ligera influencia sobre la tasa de crecimiento tumoral. En el grupo 1, dos ratones se tuvieron que eutanasiar antes del día 83 debido al tamaño tumoral, y otro más antes del día 87, de manera que el valor medio del volumen tumoral ya no es representativo después del día 80. En el grupo 6, un ratón se tuvo que eutanasiar antes del día 80 debido al tamaño tumoral, dos ratones antes del día 83, y otro más antes del día 87, de manera que el valor medio del volumen tumoral ya no es representativo después del día 76.

En el grupo 2, tratado con 1 mg/kg p.c. de hlgG1, se excluyó un animal del análisis posterior, debido a que el tumor creció en el tejido muscular y esto habitualmente potencia la velocidad del crecimiento tumoral. En comparación con el grupo 1 de control (vehículo), el tamaño tumoral medio comenzó a diferir significativamente, comenzando desde el día 45 hasta el final del estudio. No se observó crecimiento tumoral potenciado después del final del tratamiento (día 68).

Los animales del grupo 3 (5 mg/kg p.c. de hlgG1) revelaron una disminución notable en el crecimiento tumoral en comparación con el grupo 1 (vehículo), haciéndose estadísticamente significativa con el día 38 hasta el día 83. El volumen tumoral medio comenzó a volver a crecer fuertemente alrededor de dos semanas después del final del tratamiento. Uno de diez tumores desapareció en el día 45, y no volvió a crecer hasta 19 días después del final del tratamiento.

El mejor comportamiento de todos los grupos de tratamiento que comienzan con un volumen tumoral de 92 mm³ se encontró en el grupo 4 (5 mg/kg p.c. de mulgG2a), en el que el volumen tumoral medio mostró una clara regresión y los tumores incluso desaparecieron en 4 animales hasta el final del período de observación. La diferencia con respecto al volumen tumoral medio del grupo 1 (vehículo) fue muy significativa, comenzando desde el día 38 hasta el final del estudio.

El tratamiento temprano con 1 mg/kg p.c. de hlgG1 entre los días 14 y 36 (grupo 5) reveló un efecto prematuro así como duradero sobre el desarrollo tumoral. Un animal se excluyó del análisis posterior ya que el tumor creció en tejido muscular. En el día 31, solo cinco animales tuvieron un tumor medible en el sitio de inoculación, en comparación con el resto de los animales inoculados en los que solamente 2 de 60 no respondieron a la inoculación del tumor. La progresión tumoral se retrasó alrededor de 31 días (comparación del día 52 del grupo 1 del control con el día 83 del grupo 5). Alrededor de 50% de los animales no mostró tumores en el sitio de inoculación al final del estudio.

2.7 Conclusión

No se observaron hallazgos clínicos o mortalidad específicos relacionados con el tumor o con sustancias, en comparación con el grupo 1 (control).

No se observó interferencia relacionada con fármacos con el desarrollo del peso.

El crecimiento tumoral de células tumorales RPMI8226 después del tratamiento se redujo en el orden de eficiencia: hlgG1 1 mg/kg, 14-36 días cada segundo día (grupo 5) > mulgG2a 5 mg/kg 32-68 días cada segundo día (grupo 4) > hlgG1 5 mg/kg 32-68 días cada segundo día (grupo 3) > hlgG1 1 mg/kg 32-68 días cada segundo día (grupo 2). En los grupos 2 a 4, los volúmenes tumorales medios aumentaron nuevamente en grados variables después del final del tratamiento.

Referencias:

- Ausiello C.M., Urbani F., Lande R., la Sala A., Di Carlo B., Baj G., Surico N., Hilgers J., Deaglio S., Funaro A., Malavasi F. (2000) Functional topography of discrete domains of human CD38. *Tissue Antigens*. Diciembre de 2000; 56(6):539-47.
- 5 Chamow, S.M., Zhang, D.Z., Tan, X.Y., Mathre, S.M., Marsters, S.A., Peers, D.H., Byrn, R.A., Ashknazi, A., Junghans, R.P. (1994). humanized, bispecific immunoadhesin-antibody that retargets CD3+ effectors to kill HIV-1-infected cells. *J Immunol*. 1 de noviembre de 1994; 153(9):4268-80
- Dattamajumdar, A.K., Jacobsen, D.P., Hood, L.E., Osman, G.E. (1996). Rapid cloning of rearranged mouse immunoglobulin variable genes. *Immunogenetics* 43, 141-151
- 10 Funaro, A., Spagnoli, G.C., Ausiello, C.M., Alessio, M., Roggero, S., Delia, D., Zaccolo, M., y Malavasi, F. (1990) Involvement of the multilineage CD38 molecule in a unique pathway of cell activation and proliferation. *J. Immunol*. 145, 2390-2396.
- Hoshino S., Kukimoto I., Kontani K., Inoue S., Kanda Y., Malavasi F., Katada T. (1997) Mapping of the catalytic and epitopic sites of human CD38/NAD⁺ glycohydrolase to a functional domain in the carboxyl terminus. *J Immunol*. 158(2):741-7.
- 15 Jackson D.G., Bell J.I. (1990) Isolation of a cDNA encoding the human CD38 (T10) molecule, a cell surface glycoprotein with an unusual discontinuous pattern of expression during lymphocyte differentiation. *J Immunol*. 144(7):2811-5.
- Knappik, A., Ge, L., Honegger, A., Pack, P., Fischer, M., Wellenhofer, G., Hoess, A., Wolle, J., Plückthun, A., y Virnekas, B. (2000). Fully synthetic human combinatorial antibody libraries (HuCAL) based on modular consensus frameworks and CDRs randomized with trinucleotides. *J Mol Biol* 296, 57-86.
- 20 Konopleva M., Estrov Z., Zhao S., Andreeff M., Mehta K. (1998) Ligation of cell surface CD38 protein with agonistic monoclonal antibody induces a cell growth signal in myeloid leukemia cells. *J Immunol*. 161(9):4702-8.
- Krebber, A., Bomhauser, S., Burmester, J., Honegger, A., Willuda, J., Bossard, H.R., Plückthun, A. (1997). Reliable cloning of functional antibody variable domains from hybridomas and spleen cell repertoires employing a reengineered phage display system. *J. Imm. Meth.* 201, 35-55.
- 25 Krebs, B., Rauchenberger, R., Reiffert, S., Rothe, C., Tesar, M., Thomassen, E., Cao, M., Dreier, T., Fischer, D., Hoss, A., Inge, L., Knappik, A., Marget, M., Pack, P., Meng, X.Q., Schier, R., Sohlmann, P., Winter, J., Wolle, J., y Kretzschmar, T. (2001). High-throughput generation and engineering of recombinant human antibodies. *J Immunol Methods* 254, 67-84.
- 30 Löhning, C. (2001). Novel methods for displaying (poly)peptides/proteins on bacteriophage particles via disulfide bonds. WO 01/05950.
- Malavasi, F., Caligaris-Cappio, F., Milanese, C., Dellabona, P., Richiardi, P., Carbonara, A. O. (1984). Characterization of a murine monoclonal antibody specific for human early lymphohemopoietic cells. *Hum. Immunol*. 9:9-20
- 35 Namba, M., Otsuki, T., Mori, M., Togawa, A., Wada, H., Sugihara, T., Yawata, Y., Kimoto, T. (1989). Establishment of five human myeloma cell lines. *In Vitro Cell Dev. Biol.* 25: 723.
- Nata K., Takamura T., Karasawa T., Kumagai T., Hashioka W., Tohgo A., Yonekura H., Takasawa S., Nakamura S., Okamoto H. (1997). Human gene encoding CD38 (ADP-ribosyl cyclase/cyclic ADP-ribose hydrolase): organization, nucleotide sequence and alternative splicing. *Gene* 186(2):285-92.
- 40 Naundorf, S., Preithner, S., Mayer, P., Lippold, S., Wolf, A., Hanakam, F., Fichtner, I., Kufer, P., Raum, T., Riethmüller, G., Baeuerle, P.A., Dreier, T. (2002). *Int. J. Cancer* 100, 101-110.
- Plückthun A, and Pack P. (1997) New protein engineering approaches to multivalent and bispecific antibody fragments. *Immunotechnology* 3(2):83-105.
- 45 Rauchenberger R., Borges E., Thomassen-Wolf E., Rom E., Adar R., Yaniv Y., Malka M., Chumakov I., Kotzer S., Resnitzky D., Knappik A., Reiffert S., Prassler J., Jury K., Waldherr D., Bauer S., Kretzschmar T., Yayon A., Rothe C. (2003). Human combinatorial Fab library yielding specific and functional antibodies against the human fibroblast growth factor receptor 3. *J Biol Chem*. 278(40):38194-205.
- 50 Zhou, H., Fisher, R.J., Papas, T.S. (1994). Optimization of primer sequences for mouse scFv repertoire display library construction. *Nucleic Acids Res.* 22: 888-889.

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo anti-CD38 humano específico o fragmento funcional del mismo que comprende una región H-CDR1, H-CDR2 y H-CDR3 representada en SEQ ID NO: 5; y una región L-CDR1, L-CDR2 y L-CDR3 representada en SEQ ID NO:13.
- 5 2. El anticuerpo o fragmento funcional del mismo según la reivindicación 1, que comprende una cadena pesada variable representada en SEQ ID NO: 5 y una cadena ligera variable representada en SEQ ID NO: 13.
3. Un anticuerpo anti-CD38 humano específico o fragmento funcional del mismo que comprende una región H-CDR1, H-CDR2 y H-CDR3 representada en SEQ ID NO: 6; y una región L-CDR1, L-CDR2 y L-CDR3 representada en SEQ ID NO:14.
- 10 4. El anticuerpo o fragmento funcional del mismo según la reivindicación 3, que comprende una cadena pesada variable representada en SEQ ID NO: 6 y una cadena ligera variable representada en SEQ ID NO: 14.
5. Un anticuerpo anti-CD38 humano específico o fragmento funcional del mismo que comprende una región H-CDR1, H-CDR2 y H-CDR3 representada en SEQ ID NO: 7; y una región L-CDR1, L-CDR2 y L-CDR3 representada en SEQ ID NO:15.
- 15 6. El anticuerpo o fragmento funcional del mismo según la reivindicación 5, que comprende una cadena pesada variable representada en SEQ ID NO: 7 y una cadena ligera variable representada en SEQ ID NO: 15.
7. Un anticuerpo anti-CD38 humano específico o fragmento funcional del mismo que comprende una región H-CDR1, H-CDR2 y H-CDR3 representada en SEQ ID NO: 8; y una región L-CDR1, L-CDR2 y L-CDR3 representada en SEQ ID NO:16.
- 20 8. El anticuerpo o fragmento funcional del mismo según la reivindicación 7, que comprende una cadena pesada variable representada en SEQ ID NO: 8 y una cadena ligera variable representada en SEQ ID NO: 16.
9. El anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que el anticuerpo humano es un anticuerpo humano sintético.
10. El anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, que es una IgG.
- 25 11. El anticuerpo según la reivindicación 10, que es una IgG1.
12. Una composición que comprende ácidos nucleicos que codifican la cadena pesada y la cadena ligera del anticuerpo humano o fragmento funcional del mismo de la reivindicación 1 o 2.
13. La composición de la reivindicación 12 que comprende SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 9.
- 30 14. Una composición que comprende ácidos nucleicos que codifican la cadena pesada y la cadena ligera del anticuerpo humano o fragmento funcional del mismo de la reivindicación 3 o 4.
15. La composición de la reivindicación 14 que comprende SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 10.
16. Una composición que comprende ácidos nucleicos que codifican la cadena pesada y la cadena ligera del anticuerpo humano o fragmento funcional del mismo de la reivindicación 5 o 6.
17. La composición de la reivindicación 16 que comprende SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 11.
- 35 18. Una composición que comprende ácidos nucleicos que codifican la cadena pesada y la cadena ligera del anticuerpo humano o fragmento funcional del mismo de la reivindicación 7 u 8.
19. La composición de la reivindicación 18 que comprende SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 12.
20. Una composición que comprende vectores que comprenden los ácidos nucleicos definidos en una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 19.
- 40 21. Una célula que comprende los vectores definidos en la reivindicación 20.
22. La célula según la reivindicación 21, en la que dicha célula es una célula bacteriana.
23. La célula según la reivindicación 21, en la que dicha célula es una célula de mamífero.
24. Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo humano o fragmento funcional del mismo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.

25. Uso del anticuerpo humano o fragmento funcional del mismo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, para la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento de una enfermedad hematológica.
26. El uso de acuerdo con la reivindicación 25, en la que la enfermedad hematológica pertenece a la lista constituida por mieloma múltiple, leucemia linfocítica crónica, leucemia mielogenousa crónica, leucemia mielogenousa aguda y leucemia linfocítica aguda.
- 5
27. Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo humano o fragmento funcional del mismo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable para uso en un método para tratar una enfermedad hematológica.
- 10
28. La composición farmacéutica para uso de acuerdo con la reivindicación 27, en la que la enfermedad hematológica pertenece a la lista constituida por mieloma múltiple, leucemia linfocítica crónica, leucemia mielogenousa crónica, leucemia mielogenousa aguda y leucemia linfocítica aguda.
29. Un método para método para seleccionar como dianas a células CD38+ en una muestra celular, que comprende la etapa de permitir que dichas células CD38+ se pongan en contacto con el anticuerpo humano o fragmento funcional del mismo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11.

Figura 1a
ADN de cadena pesada variable

3077_VH1B (SEC ID NO: 1):

(1) CAGGTGCAAT TGGTTCAGAG CGGCGCGGAA GTGAAAAAAC CGGGCGCGAG
 (51) CGTGAAAGTG AGCTGCAAAG CCTCCGGATA TACCTTTACT TCTTATTCTA
 (101) TTAATTGGGT CCGCCAAGCC CCTGGGCAGG GTCTCGAGTG GATGGGCTAT
 (151) ATCGATCCGA ATCGTGGCAA TACGAATTAC GCGCAGAAGT TTCAGGGCCG
 (201) GGTGACCATG ACCCGTGATA CCAGCATTAG CACCGCGTAT ATGGAACTGA
 (251) GCAGCCTGCG TAGCGAAGAT ACGGCCGTGT ATTATTGCGC GCGTGAGTAT
 (301) ATTTATTTTA TTCATGGTAT GCTTGATTTT TGGGGCCAAG GCACCCTGGT
 (351) GACGGTTAGC TCA

3079_VH3 (SEC ID NO: 2):

(1) CAGGTGCAAT TGGTGGAAAG CGGCGGCGGC CTGGTGCAAC CGGGCGGCAG
 (51) CCTGCGTCTG AGCTGCGCGG CCTCCGGATT TACCTTTTCT AATTATGGTA
 (101) TGCATTGGGT GCGCCAAGCC CCTGGGAAGG GTCTCGAGTG GGTGAGCAAT
 (151) ATCCGTTCTG ATGGTAGCTG GACCTATTAT GCGGATAGCG TGAAAGGCCG
 (201) TTTTACCATT TCACGTGATA ATTTCGAAAA CACCCTGTAT CTGCAAATGA
 (251) ACAGCCTGCG TGCGGAAGAT ACGGCCGTGT ATTATTGCGC GCGTCGTTAT
 (301) TGGTCTAAGT CTCATGCTTC TGTTACTGAT TATTGGGGCC AAGGCACCCT
 (351) GGTGACGGTT AGCTCA

3080_VH3 (SEC ID NO: 3):

(1) CAGGTGCAAT TGGTGGAAAG CGGCGGCGGC CTGGTGCAAC CGGGCGGCAG
 (51) CCTGCGTCTG AGCTGCGCGG CCTCCGGATT TACCTTTTCT TCTTATGGTA
 (101) TGCATTGGGT GCGCCAAGCC CCTGGGAAGG GTCTCGAGTG GGTGAGCAAT
 (151) ATCTATTCTG ATGGTAGCAA TACCTTTTAT GCGGATAGCG TGAAAGGCCG
 (201) TTTTACCATT TCACGTGATA ATTTCGAAAA CACCCTGTAT CTGCAAATGA
 (251) ACAGCCTGCG TGCGGAAGAT ACGGCCGTGT ATTATTGCGC GCGTAATATG
 (301) TATCGTTGGC CTTTTCAATTA TTTTTTTGAT TATTGGGGCC AAGGCACCCT
 (351) GGTGACGGTT AGCTCA

3100_VH3 (SEC ID NO: 4):

(1) CAGGTGCAAT TGGTGGAAAG CGGCGGCGGC CTGGTGCAAC CGGGCGGCAG
 (51) CCTGCGTCTG AGCTGCGCGG CCTCCGGATT TACCTTTTCT TCTAATGGTA
 (101) TGTCTTGGGT GCGCCAAGCC CCTGGGAAGG GTCTCGAGTG GGTGAGCAAT
 (151) ATCTCTTATC TTTCTAGCTC TACCTATTAT GCGGATAGCG TGAAAGGCCG
 (201) TTTTACCATT TCACGTGATA ATTTCGAAAA CACCCTGTAT CTGCAAATGA
 (251) ACAGCCTGCG TGCGGAAGAT ACGGCCGTGT ATTATTGCGC GCGTTTTTAT
 (301) GGTTATTTTA ATTATGCTGA TGTTTGGGGC CAAGGCACCC TGGTGACGGT
 (351) TAGCTCA

3077_1_VH1B (SEC ID NO: 31):

(1) CAGGTGCAAT TAGTCCAAAG TGGTGCAGAA GTGAAAAAAC CGGGCGCGAG
 (51) CGTGAAAGTG AGCTGCAAAG CCTCCGGATA TACCTTTACT TCTTATTCTA

ES 2 541 436 T3

(101) TTAATTGGGT CCGCCAAGCC CCTGGGCAGG GTCTCGAGTG GATGGGCTAT
(151) ATCGATCCGA ATCGTGGCAA TACGAATTAC GCGCAGAAGT TTCAGGGCCG
(201) GGTGACCATG ACCCGTGATA CCAGCATTAG CACCGCGTAT ATGGAAGTGA
(251) GCAGCCTGCG TAGCGAAGAT ACGGCCGTGT ATTATTGCGC GCGTGAGTAT
(301) ATTTATTTTA TTCATGGTAT GCTTGATTTT TGGGGCCAAG GCACCCTGGT
(351) GACGGTTAGC TCA

Figura 1b
Péptido de cadena pesada variable
(Regiones CDR en negrita)

3077_VH1B (SEC ID NO: 5):

(1) QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT **SYSINWVRQA** PGQGLEWMGY
(51) IDPNRGNTNY **AQKFQGRVTM** TRDTSISTAY MELSSLRSED TAVYYCAREY
(101) IYFIHGMLDF WGQGTTLVTVS S

3079_VH3 (SEC ID NO: 6):

(1) QVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS **NYGMHWVRQA** PGKGLEWVSN
(51) IRSDGSWTTY **ADSVKGRFTI** SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCARRY
(101) WSKSHASVTD YWGQGTTLVTV SS

3080_VH3 (SEC ID NO: 7):

(1) QVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS **SYGMHWVRQA** PGKGLEWVSN
(51) IYSDGSNTFY **ADSVKGRFTI** SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCARNM
(101) YRWPFHYFFD YWGQGTTLVTV SS

3100_VH 3 (SEC ID NO: 8):

(1) QVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS **SNGMSWVRQA** PGKGLEWVSN
(51) ISYLSSTYY **ADSVKGRFTI** SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCARFY
(101) GYFNYADVWG QGTTLVTVSS

Figura 2a

ADN de cadena ligera variable

3077_Vk kappa 2 (SEC ID NO: 9):

(1) GATATCGTGA TGACCCAGAG CCCACTGAGC CTGCCAGTGA CTCCGGGCGA
 (51) GCCTGCGAGC ATTAGCTGCA GAAGCAGCCA AAGCCTGCTT TTTATTGATG
 (101) GCAATAATTA TCTGAATTGG TACCTTCAA AACCAGGTCA AAGCCCGCAG
 (151) CTATTAATTT ATCTTGGTTC TAATCGTGCC AGTGGGGTCC CGGATCGTTT
 (201) TAGCGGCTCT GGATCCGGCA CCGATTTTAC CCTGAAAATT AGCCGTGTGG
 (251) AAGCTGAAGA CGTGGGCGTG TATTATTGCC AGCAGTATTC TTCTAAGTCT
 (301) GCTACCTTTG GCCAGGGTAC GAAAGTTGAA ATTAAACGTA CG

3079_Vk kappa 1 (SEC ID NO: 10):

(1) GATATCCAGA TGACCCAGAG CCCGTCTAGC CTGAGCGCGA GCGTGGGTGA
 (51) TCGTGTGACC ATTACCTGCA GAGCGAGCCA GGATATTTCT GCTTTTCTGA
 (101) ATTGGTACCA GCAGAAACCA GGTAAGCAC CGAAACTATT AATTTATAAG
 (151) GTTTTCTAATT TGCAAAGCGG GGTCCCGTCC CGTTTTAGCG GCTCTGGATC
 (201) CGGCACTGAT TTTACCCTGA CCATTAGCAG CCTGCAACCT GAAGACTTTG
 (251) CGACTTATTA TTGCCAGCAG GCTTATTCTG GTTCTATTAC CTTTGGCCAG
 (301) GGTACGAAAG TTGAAATTA ACGTACG

3080_VI lambda 3 (SEC ID NO: 11):

(1) GATATCGAAC TGACCCAGCC GCCTTCAGTG AGCGTTGCAC CAGGTCAGAC
 (51) CGCGCGTATC TCGTGTAGCG GCGATAATAT TGGTAATAAG TATGTTTCTT
 (101) GGTACCAGCA GAAACCCGGG CAGGCGCCAG TTGTTGTGAT TTATGGTGAT
 (151) AATAATCGTC CCTCAGGCAT CCCGGAACGC TTTAGCGGAT CCAACAGCGG
 (201) CAACACCGCG ACCCTGACCA TTAGCGGCAC TCAGGCGGAA GACGAAGCGG
 (251) ATTATTATTG CTCTTCTTAT GATTCTTCTT ATTTTGTGTT TGGCGGCGGC
 (301) ACGAAGTTAA CCGTTCTTGG CCAG

3100_VI lambda 3 (SEC ID NO: 12):

(1) GATATCGAAC TGACCCAGCC GCCTTCAGTG AGCGTTGCAC CAGGTCAGAC
 (51) CGCGCGTATC TCGTGTAGCG GCGATAATAT TGGTCATTAT TATGCTTCTT
 (101) GGTACCAGCA GAAACCCGGG CAGGCGCCAG TTCTTGTGAT TTATCGTGAT
 (151) AATGATCGTC CCTCAGGCAT CCCGGAACGC TTTAGCGGAT CCAACAGCGG
 (201) CAACACCGCG ACCCTGACCA TTAGCGGCAC TCAGGCGGAA GACGAAGCGG
 (251) ATTATTATTG CCAGTCTTAT GATTATCTTC ATGATTTTGT GTTTGGCGGC
 (301) GGCACGAAGT TAACCGTTCT TGGCCAG

Figura 2b
Péptido de cadena ligera variable
(Regiones CDR en negrita)

3077_Vk kappa 2 (SEC ID NO: 13):

(1) DIVMTQSPLS LPVTPGEPAS ISCRSSQSL**L** FIDGNNYLNW YLQKPGQSPQ
(51) LLIYLGSNRA SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV **YQCQYSSKS**
(101) ATFGQGTKVE IKRT

3079_Vk kappa 1 (SEC ID NO: 14):

(1) DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQDIS **AFLN**WYQOKP GKAPKLLIYK
(51) **VSNLQ**SGVPS RFGSGSGTD FTLLTISSLQP EDFATYYCQQ **AYSGSITFGQ**
(101) GTKVEIKRT

3080_VI lambda 3 (SEC ID NO: 15):

(1) DIELTQPPSV SVAPGQTARI SC**SGDNIGNK** **YVSWY**QOKPG QAPVVVIYGD
(51) **NNRPSGIPER** FSGSNSGNTA TLTISGTQAE DEADYYC**SSY** **DSSYFV**FGGG
(101) TKLTVLGQ

3100_VI lambda 3 (SEC ID NO: 16):

(1) DIELTQPPSV SVAPGQTARI SC**SGDNIGHY** **YASWY**QOKPG QAPVLVIYRD
(51) **NDRPSGIPER** FSGSNSGNTA TLTISGTQAE DEADYYC**QSY** **DYLHDFV**FGG
(101) GTKLTVLGQ

Figura 3
Secuencias de consenso de cadena pesada variable
(Regiones CDR en negrita)

VH1B Consenso (SEC ID NO: 17):

(1) QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT **SYMHWVRQA** PGQGLEWMGW
(51) **INPNSGGTNY** A**QKFQGRVTM** TRDTSISTAY MELSSLRSED TAVYYCARWG
(101) **G**DGFYAMDYW **G**QGTILVTVSS

VH3 Consenso (SEC ID NO: 18):

(1) QVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS **SYAMSWVRQA** PGKGLEWVSA
(51) **ISGSGGSTYY** AD**SVKGRFTI** SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCARWG
(101) **G**DGFYAMDYW **G**QGTILVTVS S

Figura 4

Secuencias de consenso de cadena ligera variable
(Regiones CDR en negrita)

VL_λ3 Consenso (SEC ID NO: 19):

(1) SYELTQPPSV SVAPGQTARI **SCSGDALGDK YASWYQQKPG QAPVLVIYDD**
(51) **SDRPSGIPER FSGSNSGNTA TLTISGTQAE DEADYYCQQH YTTTPVFVGGG**
(101) TKLTVLG

VL_k1 Consenso (SEC ID NO: 20):

(1) DIQMTQSPSS LSASVGDRVIT **ITCRASQGIS SYLAWYQQKPG GKAPKLLIYA**
(51) **ASSLQSGVPS RFGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ HYTTPPTFGQ**
(101) GTKVEIKR

VL_k2 Consenso (SEC ID NO: 21):

(1) DIVMTQSPLS LPVTPGEPAS **ISCRSSQSLI HSNQYNYLDW YLQKPGQSPQ**
(51) **LLIYLGSNRA SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCQQHYTTP**
(101) PTFGQGTKVE IKR

Figura 5
Secuencia peptídica de CD38

(SEC ID NO: 22):

```
1   mancefspvs gdkpccrlsr raqlclqvs lvlilvvla vvprrwrqqw sgpgttkrfp
61  etvlarcvky teihpemrhv dcqsvdafk gafiskhpcn iteedyqplm klgtqtvpcn
121 killwsrikd lahgftqvqr dmftledtll gyladdltwc gefntskiny qscpdwrkdc
181 snpvsvfwk tvsrrfaaaa cdvvhvmlng srskifdkns tfgsvevhnl qpekvtlea
241 wihgreds rdlcqdptik elesiiskrn iqfsckniyr pdkflqcvkn pedssctsei
```

Figura 6

Secuencia nucleotídica de OKT10 quimérico

Cadena pesada (SEC ID NO: 23)

caggtggaat tgggtggaatc tggaggatcc ctgaaactct cctgtgcagc ctcaggattc
gatttttagta gatcctggat gaattgggtc cggcaggctc caggaaaagg gctagaatgg
attggagaaa ttaatccaga tagcagtacg ataaactata cgacatctct aaaggataaa
ttcatcatct ccagagacaa cgccaaaaat acgctgtacc tgcaaatgac caaagtgaga
tctgaggaca cagcccttta ttactgtgca agatatggta actggtttcc ttattggggc
caagggactc tggtcactgt cagctcagcc tccaccaagg gtccatcggc ctccccctg
gcaccctcct ccaagagcac ctctgggggc acagcggccc tgggctgcct ggtcaaggac
tacttccccg aaccggtgac ggtgtcgtgg aactcaggcg cctgaccag cggcgtgcac
accttccccg ctgtcctaca gtccctcagga ctctactccc tcagcagcgt ggtgaccgtg
ccctccagca gcttggggcac ccagacctac atctgcaacg tgaatcacia gccagcaac
accaaggtgg acaagaaagt tgagcccaaa tcttgtgaca aaactcacac atgcccaccg
tgcccagcac ctgaactcct ggggggaccg tcagtcttcc tcttcccccc aaaacccaag
gacaccctca tgatctcccg gaccctgag gtcacatgcg tggtggtgga cgtgagccac
gaagaccctg aggtcaagtt caactggtac gtggacggcg tggaggtgca taatgccaag
acaaagccgc gggaggagca gtacaacagc acgtaccggg tggtcagcgt cctcacgcgc
ctgcaccagg actggctgaa tggcaaggag tacaagtgca aggtctcaa caaagccctc
ccagccccca togagaaaac catctccaaa gccaaagggc agccccgaga accacagggtg
tacaccctgc ccccatcccg ggatgagctg accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg
gtcaaaggct tctatcccag cgacatcgcc gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag
aacaactaca agaaccagcc tcccgtgctg gactccgacg gctccttctt cctctacagc
aagctcaccg tggacaagag caggtggcag caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg
catgaggctc tgcacaacca ctacaogcag aagagcctct cctgtctcc gggtaaa

Cadena ligera (SEC ID NO: 24)

gatatcctga tgaccagtc tcaaaaaatc atgcccacat cagtgggaga cagggtcagc
gtcacctgca aggccagtc aaatgtggat actaatgtag cctggatatca acagaaacca

ES 2 541 436 T3

ggacagtctc ctaaagcact gatttactcg gcatcctacc gatacagtgg agtccctgat
cgcttcacag gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcaccaa tgtgcagtct
gaggacttgg cagagtattt ctgtcagcaa tatgacagct atcctctcac gttcgggtgct
gggaccaagc tggacctgaa acgtacggtg gctgcaccat ctgtcttcat cttcccgcc
tctgatgagc agttgaaatc tggaactgcc tctggtgtgt gcctgctgaa taacttctat
cccagagagg ccaaagtaca gtggaagggtg gataacgcc tccaatcggg taactcccag
gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg
ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac ccatcagggc
ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gt

Fig. 7: Sumario esquemático de epítomos

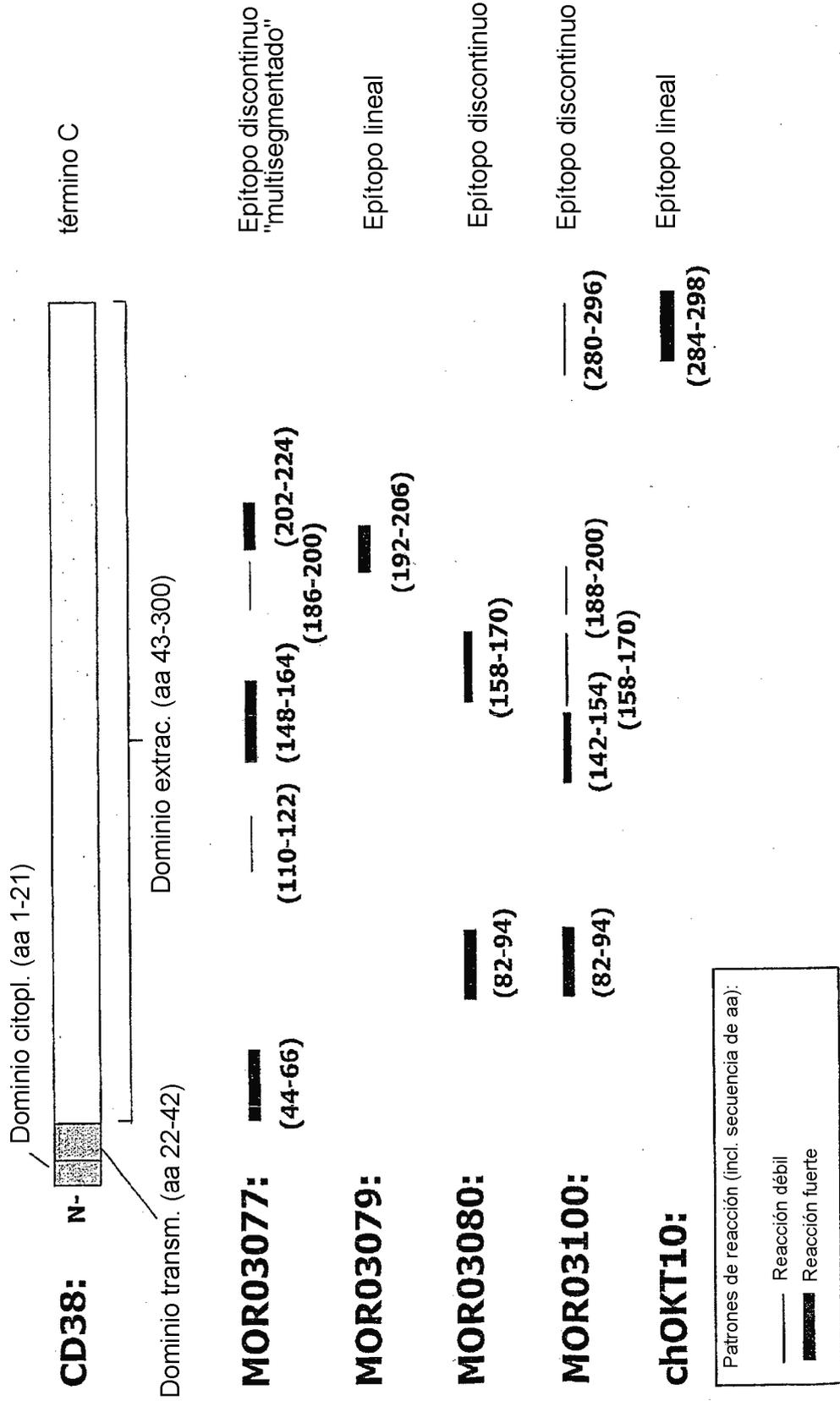


Figura 8: Secuencia de ADN de pMOPRH[®]_h_IgG1_1

```

                StyI
                -----
601   TCGCTATTAC CATGGTGATG CGGTTTTGGC AGTACATCAA TGGGCGTGGA
      AGCGATAATG GTACCACTAC GCCAAAACCG TCATGTAGTT ACCCGCACCT

                                                AatII
                                                -----
651   TAGCGGTTTG ACTCACGGGG ATTTCCAAGT CTCCACCCCA TTGACGTCAA
      ATCGCCAAAC TGAGTGCCCC TAAAGGTTCA GAGGTGGGGT AACTGCAGTT

701   TGGGAGTTTG TTTTGGCACC AAAATCAACG GGACTIONTCCA AAATGTCGTA
      ACCCTCAAAC AAAACCGTGG TTTTAGTTGC CCTGAAAGGT TTTACAGCAT

751   ACAACTCCGC CCCATTGACG CAAATGGGCG GTAGGCGTGT ACGGTGGGAG
      TGTTGAGGCG GGGTAACTGC GTTTACCCGC CATCCGCACA TGCCACCCTC

801   GTCTATATAA GCAGAGCTCT CTGGCTAACT AGAGAACCCA CTGCTTACTG
      CAGATATATT CGTCTCGAGA GACCGATTGA TCTCTTGGGT GACGAATGAC

                pMORPH®_Ig_ para 100,0%
                -----
851   GCTTATCGAA ATTAATACGA CTCACTATAG GGAGACCCAA GCTGGCTAGC
      CGAATAGCTT TAATTATGCT GAGTGATATC CCTCTGGGTT CGACCGATCG

                M K H L W F F L L L V A A P R

901   GCCACCATGA AACACCTGTG GTTCTTCCTC CTGCTGGTGG CAGCTCCCAG
      CGGTGGTACT TTGTGGACAC CAAGAAGGAG GACGACCACC GTCGAGGGTC

                StyI
                -----
                EcoRI
                -----
                BspI
                -----
                A S T

      · W V L S Q V E F C R R L A Q
951   ATGGGTCCTG TCCCAGGTGG AATTCCTGCAG GCGGTTAGCT CAGCCTCCAC
      TACCCAGGAC AGGGTCCACC TTAAGACGTC CGCCAATCGA GTCGGAGGTG

                StyI
                -----
                BbsI
                -----
      · K G P S V F P L A P S S K S T S G

1001  CAAGGGTCCA TCGGTCTTCC CCCTGGCACC CTCCTCCAAG AGCACCTCTG
      GTTCCCAGGT AGCCAGAAGG GGGACCGTGG GAGGAGGTTT TCGTGGAGAC

      · G T A A L G C L V K D Y F P E P
1051  GGGGCACAGC GGCCCTGGGC TGCCTGGTCA AGGACTACTT CCCCGAACCG
      CCCCCTGTCTG CCGGGACCCG ACGGACCAGT TCCTGATGAA GGGGCTTGGC
    
```

ES 2 541 436 T3

V T V S W N S G A L T S G V H T F

1101 GTGACGGTGT CGTGGAATC AGGCGCCCTG ACCAGCGGCG TGCACACCTT
 CACTGCCACA GCACCTTGAG TCCGCGGGAC TGGTCGCCGC ACGTGTGGAA

· P A V L Q S S G L Y S L S S V V T

1151 CCCGGCTGTC CTACAGTCCT CAGGACTCTA CTCCTCAGC AGCGTGGTGA
 GGGCCGACAG GATGTCAGGA GTCCTGAGAT GAGGGAGTCG TCGCACCCT

· V P S S S L G T Q T Y I C N V N

1201 CCGTGCCCTC CAGCAGCTTG GGCACCCAGA CCTACATCTG CAACGTGAAT
 GGCACGGGAG GTCGTCGAAC CCGTGGGTCT GGATGTAGAC GTTGCACCTA

StyI

H K P S N T K V D K K V E P K S C

1251 CACAAGCCCA GCAACACCAA GGTGGACAAG AAAGTTGAGC CCAAATCTTG
 GTGTCGGGT CATTGTGGTT CCACCTGTTT TTTCAACTCG GGTTTAGAAC

· D K T H T C P P C P A P E L L G G

1301 TGACAAAAC CACACATGCC CACCGTGCC AGCACCTGAA CTCCTGGGGG
 ACTGTTTTGA GTGTGTACGG GTGGCACGGG TCGTGGACTT GAGGACCCCC

BbsI StyI

· P S V F L F P P K P K D T L M I

1351 GACCGTCAGT CTTCTCTTC CCCCCAAAAC CCAAGGACAC CCTCATGATC
 CTGGCAGTCA GAAGGAGAAG GGGGGTTTTG GGTTCCTGTG GGACTACTAG

BbsI

S R T P E V T C V V V D V S H E D

1401 TCCCGGACCC CTGAGGTCAC ATGCCGTGGT GTGGACGTGA GCCACGAAGA
 AGGGCCTGGG GACTCCAGTG TACGCACCAC CACCTGCACT CGGTGCTTCT

BbsI

· P E V K F N W Y V D G V E V H N A

1451 CCCTGAGGTC AAGTTCAACT GGTACGTGGA CGGCGTGGAG GTGCATAATG
 GGGACTCCAG TTCAAGTTGA CCATGCACCT GCCGCACCTC CACGTATTAC

· K T K P R E E Q Y N S T Y R V V

1501 CCAAGACAAA GCCGCGGGAG GAGCAGTACA ACAGCACGTA CCGGGTGGTC
 GGTTCGTGTTT CGGCGCCCTC CTCGTCATGT TGTGCTGCAT GGCCACCAG

S V L T V L H Q D W L N G K E Y K

1551 AGCGTCCTCA CCGTCCTGCA CCAGGACTGG CTGAATGGCA AGGAGTACAA
 TCGCAGGAGT GGCAGGACGT GGTCTGACC GACTTACCGT TCCTCATGTT

· C K V S N K A L P A P I E K T I S

1601 GTGCAAGGTC TCCAACAAAG CCCTCCAGC CCCCATCGAG AAAACCATCT
 CACGTTCCAG AGGTTGTTTC GGGAGGGTCC GGGGTAGCTC TTTTGGTAGA

Figura 9: Secuencia de ADN de vector de expresión de cadena ligera kappa de Ig

pMORPH®_h_Igk_1

```

                                StyI
                                -----
601  TCGCTATTAC CATGGTGATG CGGTTTTGGC AGTACATCAA TGGGCGTGGA
    AGCGATAATG GTACCACTAC GCCAAAACCG TCATGTAGTT ACCCGCACCT

651  TAGCGGTTTTG ACTCACGGGG ATTTCCAAGT CTCCACCCCA TTGACGTCAA
    ATCGCCAAAC TGAGTGCCCC TAAAGGTTCA GAGGTGGGGT AACTGCAGTT

701  TGGGAGTTTTG TTTTGGCACC AAAATCAACG GGACTTTCCA AAATGTCGTA
    ACCCTCAAAC AAAACCGTGG TTTTAGTTGC CCTGAAAGGT TTTACAGCAT

751  ACAACTCCGC CCCATTGACG CAAATGGGCG GTAGGCGTGT ACGGTGGGAG
    TGTTGAGGCG GGGTAACTGC GTTTACCCGC CATCCGCACA TGCCACCCTC

801  GTCTATATAA GCAGAGCTCT CTGGCTAACT AGAGAACCCA CTGCTTACTG
    CAGATATATT CGTCTCGAGA GACCGATTGA TCTCTTGGGT GACGAATGAC

                                pMORPH®_Ig_ para 100%
                                =====
851  GCTTATCGAA ATTAATACGA CTCACTATAG GGAGACCCAA GCTGGCTAGC
    CGAATAGCTT TAATTATGCT GAGTGATATC CCTCTGGGTT CGACCGATCG

+1   M V L Q T Q V F I S L L L W I
      StyI
      -----
901  GCCACCATGG TGTTCAGAC CCAGGTCTTC ATTTCTCTGT TGCTCTGGAT
    CGGTGGTACC ACAACGTCTG GGTCCAGAAG TAAAGAGACA ACGAGACCTA

                                BbsI
                                -----

+1   S G A Y G D I V M I K R T V A A
      EcoRV                               BsiWI
      -----
951  CTCTGGTGCC TACGGGGATA TCGTGATGAT TAAACGTACG GTGGCTGCAC
    GAGACCACGG ATGCCCTAT AGCACTACTA ATTTGCATGC CACCGACGTG

+1   P S V F I F P P S D E Q L K S G T
1001 CATCTGTCTT CATCTTCCCG CCATCTGATG AGCAGTTGAA ATCTGGAACT
    GTAGACAGAA GTAGAAGGGC GGTAGACTAC TCGTCAACTT TAGACCCTGA

                                BbsI
                                -----

```

ES 2 541 436 T3

```

+1 A S V V C L L N N F Y P R E A K V
1051 GCCTCTGTTG TGTGCCTGCT GAATAACTTC TATCCCAGAG AGGCCAAAGT
CGGAGACAAC ACACGGACGA CTTATTGAAG ATAGGGTCTC TCCGGTTTCA

+1 Q W K V D N A L Q S G N S Q E S
1101 ACAGTGGGAG GTGGATAACG CCCTCCAATC GGGTAACTCC CAGGAGAGTG
TGTACCTTC CACCTATTGC GGGAGGTTAG CCCATTGAGG GTCCTCTCAC

+1 V T E Q D S K D S T Y S L S S T L
1151 TCACAGAGCA GGACAGCAAG GACAGCACCT ACAGCCTCAG CAGCACCTG
AGTGTCTCGT CCTGTCTTC CTGTCTGGA TGTCGGAGTC GTCGTGGGAC

+1 T L S K A D Y E K H K V Y A C E V
BlpI
-----
1201 ACGCTGAGCA AAGCAGACTA CGAGAAACAC AAAGTCTACG CCTGCGAAGT
TGGGACTCGT TTCGTCTGAT GCTCTTTGTG TTTTCAGATGC GGACGCTTCA

+1 T H Q G L S S P V T K S F N R G
1251 CACCCATCAG GGCCTGAGCT CGCCCGTCAC AAAGAGCTTC AACAGGGGAG
GTGGGTAGTC CCGGACTCGA GCGGGCAGTG TTTCTCGAAG TTGTCCCCTC

+1 E C *
PmeI pMORPH®_Ig_REV 100%
-----
1301 AGTGTTAGGG GCCCGTTTAA ACCCGCTGAT CAGCCTCGAC TGTGCCTTCT
TCACAATCCC CGGGCAAATT TGGGCGACTA GTCGGAGCTG ACACGGAAGA

=
1351 AGTTGCCAGC CATCTGTTGT TTGCCCTCC CCCGTGCCTT CCTTGACCCT
TCAACGGTCG GTAGACAACA AACGGGGAGG GGGCACGGA GGAAGTGGGA

```

Figura 10: Secuencia de ADN de vector de cadena ligera lambda de Ig HuCAL®

pMORPH®_h_Igλ_1

```

                StyI
                ~~~~~
601  TCGCTATTAC CATGGTGATG CGGTTTTGGC AGTACATCAA TGGGCGTGGA
    AGCGATAATG GTACCACTAC GCCAAAACCG TCATGTAGTT ACCCGCACCT

651  TAGCGGTTTG ACTCACGGGG ATTTCCAAGT CTCCACCCCA TTGACGTCAA
    ATCGCCAAAC TGAGTGCCCC TAAAGGTTCA GAGGTGGGGT AACTGCAGTT

701  TGGGAGTTTG TTTTGGCACC AAAATCAACG GGACTTTCCA AAATGTCGTA
    ACCCTCAAAC AAAACCGTGG TTTTAGTTGC CCTGAAAGGT TTTACAGCAT

751  ACAACTCCGC CCCATTGACG CAAATGGGCG GTAGGCGTGT ACGGTGGGAG
    TGTGAGGGCG GGGTAACTGC GTTTACCCGC CATCCGCACA TGCCACCCTC

801  GTCTATATAA GCAGAGCTCT CTGGCTAACT AGAGAACCCA CTGCTTACTG
    CAGATATATT CGTCTCGAGA GACCGATTGA TCTCTTGGGT GACGAATGAC

                pM_Ig_ para 100,0%
                ~~~~~
851  GCTTATCGAA ATTAATACGA CTCACTATAG GGAGACCCAA GCTGGCTAGC
    CGAATAGCTT TAATTATGCT GAGTGATATC CCTCTGGGTT CGACCGATCG

+1      M A W A L L L L T L L T Q G T
        StyI
        ~~~~~
901  GCCACCATGG CCTGGGCTCT GCTGCTCCTC ACCCTCCTCA CTCAGGGCAC
    CGGTGGTACC GGACCCGAGA CGACGAGGAG TGGGAGGAGT GAGTCCCCTG

+2      T V L G Q
+1      G S W A D I V M H E V
        BamHI EcoRV HpaI StyI
        ~~~~~
951  AGGATCCTGG GCTGATATCG TGATGCACGA AGTTAACCCT CCTAGGTCAG
    TCCTAGGACC CGACTATAGC ACTACGTGCT TCAATTGGCA GGATCCAGTC

+2      P K A A P S V T L F P P S S E E L
        StyI
        ~~~~~
1001 CCCAAGGCTG CCCCTCGGT CACTCTGTTC CCGCCCTCCT CTGAGGAGCT
    GGGTTCCGAC GGGGGAGCCA GTGAGACAAG GGCGGGAGGA GACTCCTCGA

+2      Q A N K A T L V C L I S D F Y P
1051 TCAAGCCAAC AAGGCCACAC TGGTGTGTCT CATAAGTGAC TTCTACCCGG
    AGTTCGGTTG TTCCGGTGTG ACCACACAGA GTATTCCTG AAGATGGGCC
    
```

ES 2 541 436 T3

+2 G A V T V A W K G D S S P V K A G
 1101 GAGCCGTGAC AGTGGCCTGG AAGGGAGATA GCAGCCCCGT CAAGGCGGGA
 CTCGGCACTG TCACCGGACC TTCCCTCTAT CGTCGGGGCA GTTCCGCCCT

+2 V E T T T P S K Q S N N K Y A A S
 1151 GTGGAGACCA CCACACCCTC CAAACAAAGC AACAAACAAGT ACGCGGCCAG
 CACCTCTGGT GGTGTGGGAG GTTTGTTTCG TTGTTGTTCA TGCGCCGCTC

+2 S Y L S L T P E Q W K S H R S Y
 1201 CAGCTATCTG AGCCTGACGC CTGAGCAGTG GAAGTCCCAC AGAAGCTACA
 GTCGATAGAC TCGGACTGCG GACTCGTCAC CTTCAGGGTG TCTTCGATGT

+2 S C Q V T H E G S T V E K T V A P
 EbsI

1251 GCTGCCAGGT CACGCATGAA GGGAGCACCG TGGAGAAGAC AGTGGCCCCT
 CGACGGTCCA GTGCGTACTT CCCTCGTGGC ACCTCTTCTG TCACCGGGGA

+2 T E C S *

PmeI

1301 ACAGAAATGTT CATAGGGGCC CGTTTAAACC CGCTGATCAG CCTCGACTGT
 TGTCTTACAA GTATCCCCGG GCAAATTTGG GCGACTAGTC GGAGCTGACA
 pM_Ig_REV 100%

=====

1351 GCCTTCTAGT TGCCAGCCAT CTGTTGTTTG CCCCTCCCCC GTGCCTTCTT
 CGGAAGATCA ACGGTCGGTA GACAACAAAC GGGGAGGGGG CACGGAAGGA
 pM_Ig_REV 100.0%
 =====

Fig. 11: Ensayo de proliferación

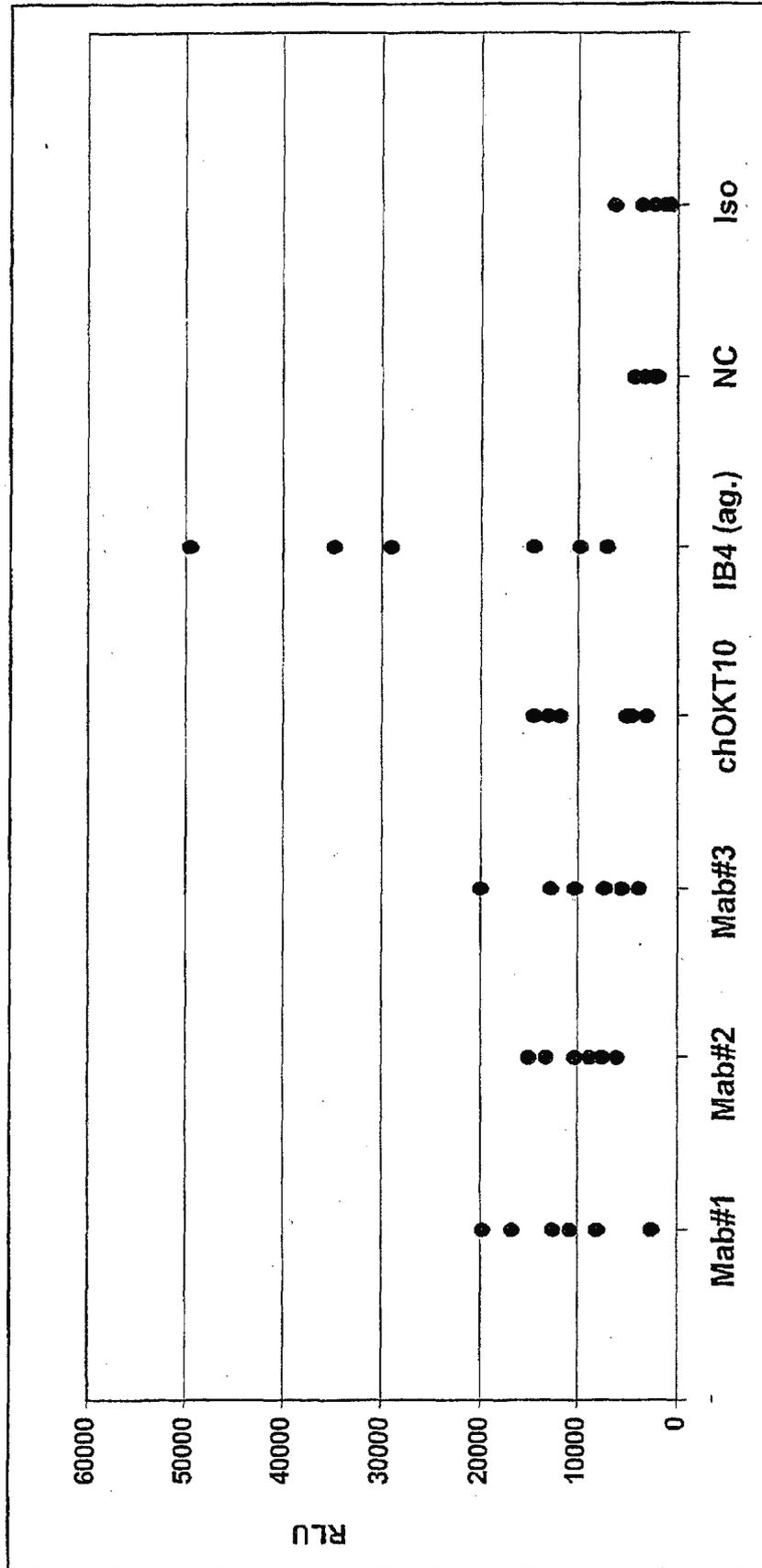


Fig. 12: Ensayo de liberación de IL-6

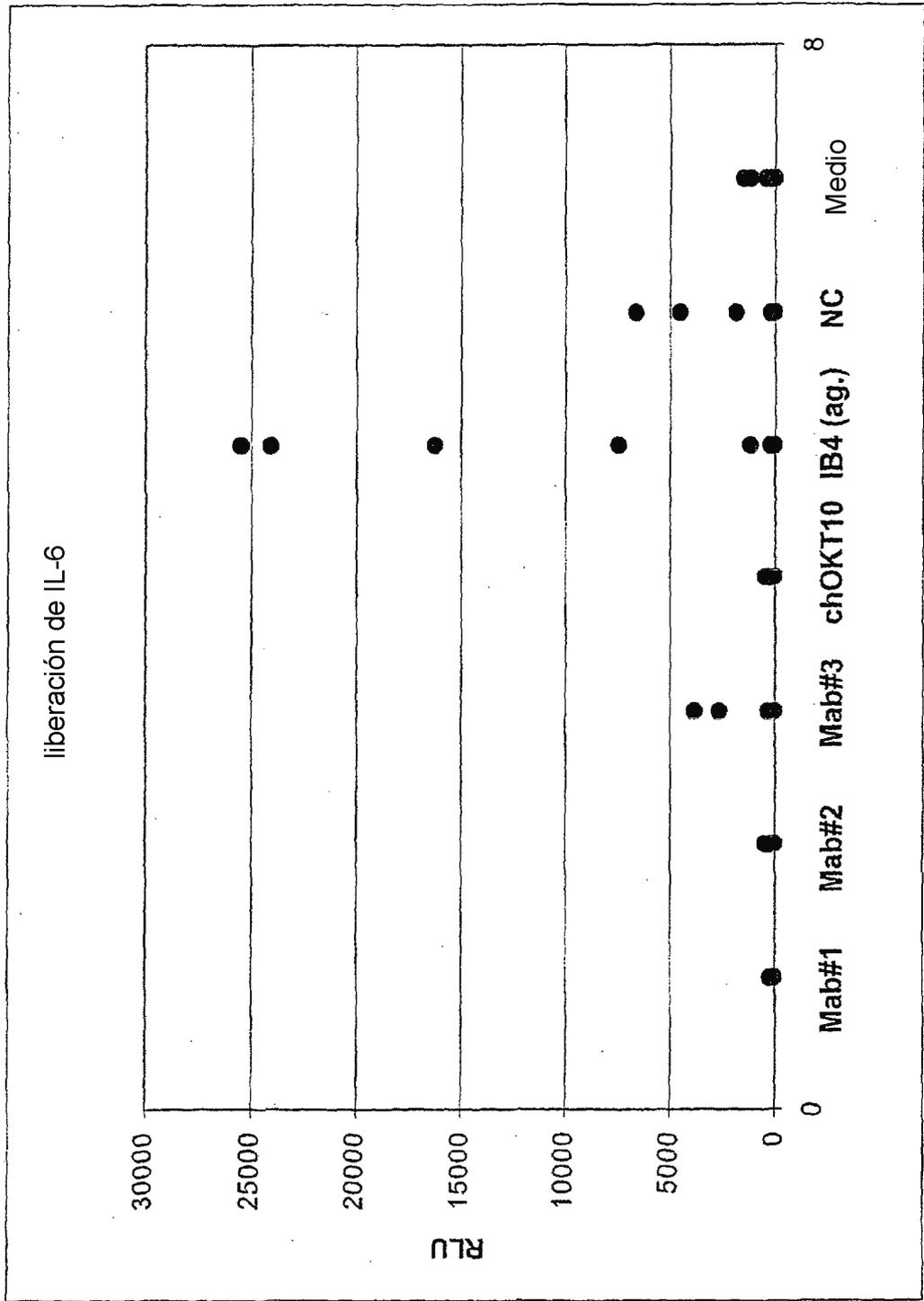


Fig. 13: Citotoxicidad frente a células progenitoras CD34+/CD38+

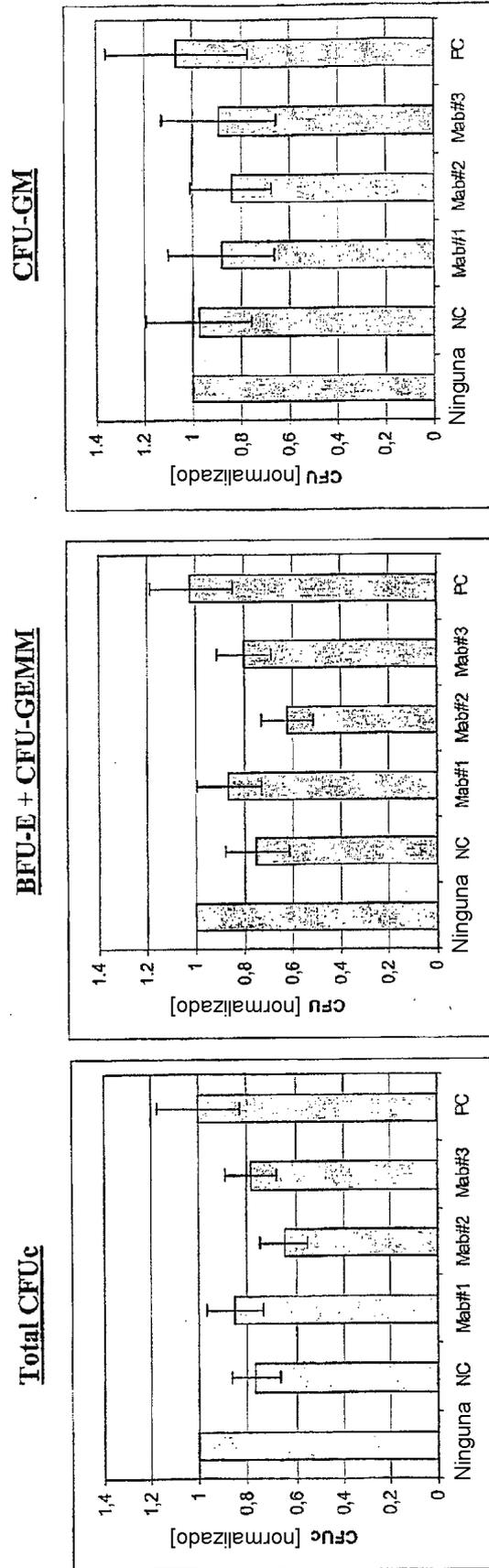


Fig. 14: ADCC con diferentes estirpes celulares

Estirpe celular	Colección de cultivo	Origen	Expresión [MFI]	Muerte espec. máx [%] en ADCC ^{a,c}			
				Mab#1	Mab#2	Mab#3	PC
RPMI 8226	ATCC CCL-155	MM	405,71	56	58	54	46
KMS-12-BM	DSMZ ACC551	MM	142,29	26	32	30	34
NCI-H929	ECACC95050415	MM	45,01	68	73	38	54
OPM-2	DSMZ ACC50	MM	37,99	6	13	3	7
U-266	ECACC85051003	MM	26,14	17	14	12	16
KMS-11	Namba <i>et al.</i> , 1989 ^b	MM	26,81 ^d	22	30	26	28
JVM-13	DSMZACC19	CLL	463,93	11	20	12	15
JVM-2	DSMZACC12	CLL	140,84	22	28	10	24
CCRF-CEM	ECACC85112105	ALL	301,46	24	29	20	22
Jurkat	DSMZ ACC282	ALL	202,99	7	8	13	12
AML-193	DSMZ ACC549	AML	62,69 ^d	33	26	39	33
OCI-AML5	DSMZ ACC247	AML	207,55 ^d	20	21	16	26
NB-4	DSMZ ACC207	AML	164,7 ^d	36	38	32	37
THP-1	DSMZ ACC16	AML	34,41	64	59	38	43
HL-60 ^d	DSMZ ACC3	AML	18,43 ^d	29	35	29	29
Raji	Linfoma de Burkitt	Linfoma de Burkitt	n.d.	53	62	48	n.d.

Fig. 15: ADCC con muestras de MM

Anticuerpos	Mab#1	Mab#2	Mab#3	PC
Parámetros:				
Muestras de MM: EC50 [nM] ^a :	0,116-0,202	0,006-0,185	0,027-0,249	0,282-0,356
Muestras de MM: Muerte espec. máx [%]	13,1-61,6	16,2-57,9	13,6-36,0	15,5-49,5

Fig. 16: Tratamiento de xenoinjerto de mieloma humano con MOR03080

