

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 716 874**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/28** (2006.01)  
**C07K 14/705** (2006.01)  
**A61K 39/395** (2006.01)  
**G01N 33/50** (2006.01)  
**C12N 5/10** (2006.01)  
**A61P 35/00** (2006.01)  
**A61P 37/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.03.2006 E 12178780 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.01.2019 EP 2535355**

54 Título: **Anticuerpos contra cd38 para el tratamiento del mieloma múltiple**

30 Prioridad:

**23.03.2005 DK 200500429**  
**01.04.2005 US 667579 P**  
**01.07.2005 US 696163 P**  
**20.10.2005 US 728561 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**17.06.2019**

73 Titular/es:

**GENMAB A/S (100.0%)**  
**Kalvebod Brygge 43**  
**1560 Copenhagen V, DK**

72 Inventor/es:

**GRAUS, YVO;**  
**PARREN, PAUL;**  
**VAN DE WINKEL, JAN;**  
**DE WEERS, MICHEL;**  
**OPRINS, JUDITH y**  
**VAN VUGT, MARTINE**

74 Agente/Representante:

**PONS ARIÑO, Ángel**

**ES 2 716 874 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 contra cd38 para el tratamiento del mieloma múltiple

**5 Campo de la invención**

La presente invención se refiere a anticuerpos que se unen a CD38, teniendo dichos anticuerpos características específicas y siendo útiles para tratar, entre otras cosas, el mieloma múltiple.

**10 Antecedentes**

El mieloma múltiple es una neoplasia maligna de células B caracterizada por la acumulación latente en la médula ósea de células secretorias plasmáticas con un bajo índice proliferativo y una esperanza de vida prolongada. La enfermedad, en última instancia, ataca a los huesos y a la médula ósea, dando como resultado múltiples tumores y lesiones por todo el sistema esquelético.

Aproximadamente un 1% de todos los cánceres, y poco más del 10% de todas las neoplasias malignas hematológicas, pueden atribuirse al mieloma múltiple (MM). La incidencia del MM aumenta en la población envejecida, siendo la mediana de edad en el momento del diagnóstico de aproximadamente 61 años.

Las terapias disponibles en la actualidad para el mieloma múltiple incluyen quimioterapia, trasplante de células madre, Thalomid<sup>®</sup> (talidomida), Velcade<sup>®</sup> (bortezomib), Aredia<sup>®</sup> (pamidronato), y Zometa<sup>®</sup> (ácido zoledrónico). Los protocolos de tratamiento actuales, que incluyen una combinación de agentes quimioterapéuticos, tales como vincristina, BCNU, melfalano, ciclofosfamida, adriamicina, y prednisona o dexametasona, proporcionan una tasa de remisión completa únicamente de aproximadamente el 5%, y la mediana de supervivencia es de aproximadamente 36-48 meses desde el momento del diagnóstico. Los avances recientes usando altas dosis de quimioterapia seguido de trasplante autólogo de médula ósea o de células mononucleares de sangre periférica han aumentado la tasa de remisión completa y la duración de la remisión. Sin embargo, la supervivencia general se ha prolongado solo ligeramente, y no se han obtenido pruebas de una cura. En última instancia, todos los pacientes de MM padecen una recidiva, incluso con una terapia de mantenimiento con interferón alfa (IFN- $\alpha$ ) solo o en combinación con esteroides.

La eficacia de los regímenes de tratamiento quimioterapéuticos disponibles para la MM está limitada por la baja velocidad de proliferación celular y el desarrollo de la resistencia a múltiples fármacos. Para más del 90% de los pacientes de MM, la enfermedad se vuelve quimiorresistente. Como resultado, se están buscando regímenes de tratamiento alternativos dirigidos a una inmunoterapia adoptiva que se dirija a antígenos de la superficie de las células plasmáticas.

CD38 es un ejemplo de antígeno expresado en dichas células plasmáticas malignas, y se expresa en una serie de enfermedades hematológicas malignas, incluyendo, pero sin restringirse a, mieloma múltiple, leucemia linfocítica crónica de células B, leucemia linfocítica aguda de células B, macroglobulinemia de Waldenström, amiloidosis sistémica primaria, linfoma de células del manto, leucemia pro-linfocítica/mielocítica, leucemia mieloide aguda, leucemia mieloide crónica, linfoma folicular, leucemia de células NK y leucemia de células plasmáticas. Se ha descrito la expresión de CD38 en las células epiteliales/endoteliales de diferente origen, incluyendo el epitelio glandular en la próstata, las células de islote en el páncreas, el epitelio ductal en las glándulas, incluyendo la glándula parotídea, las células epiteliales bronquiales, las células en testículo y ovario y en el epitelio tumoral en el adenocarcinoma colorrectal. Las enfermedades en donde podría estar implicada la expresión de CD38 incluyen, pero sin restringirse a, carcinomas bronco-epiteliales del pulmón, cáncer de mama (que evoluciona a partir de una proliferación maligna del revestimiento epitelial en los conductos y lóbulos de la mama), tumores pancreáticos, que evolucionan a partir de las células b (insulinomas), tumores que evolucionan a partir del epitelio intestinal (por ejemplo, adenocarcinoma y carcinoma de células escamosas). En el SNC, los neuroblastomas expresan CD38. Otras enfermedades incluyen carcinoma en la glándula prostática, seminomas en los testículos y cánceres de ovario.

Normalmente, CD38 se expresa por las células hematopoyéticas, y en tejidos sólidos. En referencia a las células hematopoyéticas, la mayoría de los timocitos medulares son CD38<sup>+</sup>, las células T y B en reposo y circulación son CD38<sup>-</sup>, y las células activadas son CD38<sup>+</sup>. CD38 se expresa también en aproximadamente el 80% de las células NK y monocitos en reposo, y en los linfoblastos del centro germinal de los nódulos linfáticos, en las células B plasmáticas y en algunas células intrafoliculares. CD38 puede expresarse también por células dendríticas. Una proporción significativa de las células normales de la médula ósea, en particular las células precursoras, expresan CD38. Además, el 50-80% de las células del cordón umbilical es CD38<sup>+</sup> y siguen siéndolo en la sangre humana durante los dos a tres primeros años de vida. Además de las células precursoras linfoides, CD38 se expresa también en eritrocitos y en plaquetas.

Con respecto a los tejidos sólidos, CD38 se expresa en el intestino por las células intra-epiteliales y por los linfocitos de la lámina propia, por las células de Purkinje y por los ovillos neurofibrilares en el cerebro, por las células epiteliales en la próstata, por las células  $\beta$  en el páncreas, por los osteoclastos en el hueso, por las células retinales en el ojo, y por el sarcolemma del músculo liso y estriado.

Las funciones adscritas a CD38 incluyen tanto mediación de receptor en eventos de adhesión y señalización como actividad (ecto-)enzimática. Como ectoenzima, CD38 usa NAD<sup>+</sup> como sustrato para la formación de ADP-ribosa cíclica (cADPR) y ADPR, y también de nicotinamida y ácido nicotínico-adenina dinucleótido fosfato (NAADP). Se ha demostrado que el cADPR actúa como segundo mensajero para la movilización de Ca<sup>2+</sup> desde el retículo endoplasmático. Además de la señalización a través de Ca<sup>2+</sup>, la señalización de CD38 se produce mediante un diálogo cruzado con complejos de antígeno-receptor en las células T y B u otros tipos de complejos de receptor, por ejemplo, moléculas del CMH, y de este modo está implicado en varias respuestas celulares, pero también en el cambio y la secreción de IgG1.

En la bibliografía se describen anticuerpos anti-CD38, por ejemplo, en Lande R, et al., Cell Immunol. 220(1) 30-8 (2002), Ausiello CM, et al., Tissue Antigens. 56(6), 539-47 (2000), y Cotner T, et al., Int J Immunopharmacol. 3(3), 255-68 (1981). Ellis, J. H. et al (J. Immunol., 1995, 155: 925-937) describe un mAb de ratón anti-CD38 denominado AT13/5 y una forma humanizada de AT13/5. CD38 tiene una serie de funciones, que pueden activarse o no por una molécula que se une a CD38. Por ejemplo, el anticuerpo de ratón anti-CD38 IB4 tiene propiedades agonistas en relación a CD38 (Ausiello CM, et al., anteriormente citado). Se ha demostrado que IB4 induce la activación de células T indicada por la movilización de Ca<sup>2+</sup> en células Jurkat (Zubiaur M, et al., J Immunol. 159(1), 193-205 (1997), que induce una proliferación significativa de células mononucleares de sangre periférica (PBMC), que induce la liberación de niveles significativos de IL-6 y que induce la liberación de niveles detectables de IFN-γ (Lande, Zubiaur Morra, Ansiello, anteriormente citado).

### Breve descripción de la invención

La presente invención proporciona un anticuerpo que se une a CD38 humano en donde dicho anticuerpo:

- (a) se une de manera específica a los motivos RNIQF y WVIH de CD38 humano (SEQ ID NO: 31), o
- (b) comprende las regiones variables de cadena ligera humana y de cadena pesada humana, en donde la región variable de la cadena ligera comprende una CDR1 de VL que tiene la secuencia descrita en la SEQ ID NO:3, una CDR2 de VL que tiene la secuencia descrita en la SEQ ID NO:4 y una CDR3 de VL que tiene la secuencia descrita en la SEQ ID NO: 5, y la región variable de cadena pesada comprende una CDR1 de VH que tiene la secuencia tal como se describe en la SEQ ID NO:8, una CDR2 de VH que tiene una secuencia descrita en la SEQ ID NO:9, y una CDR3 de VH que tiene la secuencia descrita en la SEQ ID NO:10.

Un anticuerpo de la invención puede estar codificado por:

- (i) ácidos nucleicos de cadena ligera humana que comprenden secuencias de nucleótidos en sus regiones variables tal como se establece en la SEQ ID NO:1; y
- (ii) ácidos nucleicos de cadena pesada humana que comprenden secuencias de nucleótidos en sus regiones variables tal como se establece en la SEQ ID NO:6.

Un anticuerpo de la invención puede comprender una región de V<sub>L</sub> que tiene la secuencia de aminoácidos descrita en la SEQ ID NO: 2 o puede comprender una región de V<sub>L</sub> que tiene al menos aproximadamente el 90 %, tal como al menos aproximadamente el 95 % de identidad de secuencias de aminoácidos con la secuencia descrita en la SEQ ID NO:2.

Un anticuerpo de la invención puede comprender una región de V<sub>H</sub> que tiene la secuencia de aminoácidos tal como se describe en la SEQ ID NO: 7 o puede comprender una región de V<sub>H</sub> que tiene al menos aproximadamente el 90 %, tal como al menos aproximadamente el 95 % de identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia descrita en la SEQ ID NO:7.

Un anticuerpo de la invención puede comprender: (a) una región de V<sub>L</sub> que tiene la secuencia de aminoácidos descrita en la SEQ ID NO:2 o una región de V<sub>L</sub> que tiene al menos aproximadamente el 90 %, tal como al menos aproximadamente el 95 % de identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia descrita en la SEQ ID NO:2 y (b) una región de V<sub>H</sub> que tiene la secuencia de aminoácidos descrita en la SEQ ID NO:7 o una región de V<sub>H</sub> que tiene al menos aproximadamente el 90 %, tal como al menos aproximadamente el 95 % de identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia descrita en la SEQ ID NO:7.

Un anticuerpo de la invención puede comprender una región de V<sub>H</sub> que comprende la secuencia de aminoácidos que abarca la región de CDR1 de V<sub>H</sub> – CDR3 de V<sub>H</sub> de la SEQ ID NO:7.

Un anticuerpo de la invención puede comprender un anticuerpo de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgD, IgA, IgE, o IgM de longitud completa, opcionalmente un anticuerpo de IgG1,k o un anticuerpo de IgM,k.

Un anticuerpo de la invención puede comprender un fragmento de anticuerpo o un anticuerpo monocatenario. Un anticuerpo de la invención puede ser una forma sustancialmente aislada.

Un anticuerpo de la invención puede comprender además un enlazador quelante para acoplar un radioisótopo.

La presente invención proporciona también un ácido nucleico aislado que codifica un anticuerpo de la invención.

5 La presente invención también proporciona un vector de expresión que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un anticuerpo de la invención. El vector de expresión puede comprender una secuencia de nucleótidos de  $V_L$  de la SEQ ID NO: 1 y una secuencia de nucleótidos de  $V_H$  de la SEQ ID NO:6.

La presente invención también proporciona un transfectoma que produce un anticuerpo de la invención

10 La presente invención también proporciona una célula hospedadora eucariota o procariota que produce un anticuerpo de la invención.

15 La presente invención también proporciona un inmunoconjugado que comprende cualquiera de los anticuerpos anteriormente descritos unido a un agente citotóxico, un radioisótopo, o un fármaco.

20 La presente invención también proporciona una molécula biespecífica o multiespecífica que comprende un anticuerpo de la invención y una especificidad de unión por una célula efectora humana, o un anticuerpo de la invención y una especificidad de unión por CD3, CD4, CD138, IL-15R, TNF- $\alpha$  unido a membrana o unido a receptor, un receptor Fc humano, o IL-15 unida a membrana o unida a receptor.

25 La presente invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo, un inmunoconjugado o una molécula biespecífica o multiespecífica de la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Dicha composición farmacéutica puede comprender además uno o más agentes terapéuticos adicionales.

La presente invención también proporciona un anticuerpo, un inmunoconjugado, una molécula biespecífica o multiespecífica, una composición farmacéutica, o un vector de expresión para su uso como un medicamento.

30 La presente invención también proporciona un anticuerpo, un inmunoconjugado, una molécula biespecífica o multiespecífica, una composición farmacéutica o un vector de expresión de la invención para su uso en un método para tratar o prevenir una enfermedad o trastorno que implica a células que expresan CD38, en donde la enfermedad o trastorno se selecciona entre el grupo que consiste en linfoma/leucemias de células B, incluyendo leucemia/linfoma linfoblástico de células B precursoras, y linfomas no Hodgkin de células B; leucemia linfoblástica aguda; neoplasias de células B maduras, incluyendo leucemia linfocítica crónica de células B (CLL)/linfoma linfocítico pequeño (SLL); leucemia linfocítica aguda de células B; leucemia prolinfocítica de células B; linfoma linfoplasmacítico; linfoma de células del manto (MCL); linfoma folicular (FL), incluyendo FL de grado bajo, de grado intermedio y de grado alto; linfoma cutáneo del centro folicular; linfoma de células B de la zona marginal, incluyendo de tipo MALT, de tipo nodal y de tipo esplénico; tricoleucemia; linfoma difuso de células B grandes; linfoma de Burkitt; plasmacitoma; mieloma de células plasmáticas; leucemia de células plasmáticas; trastorno linfoproliferativo post-trasplante; macroglobulinemia de Waldenstrom; leucemias de células plasmáticas; linfoma anaplásico de células grandes (ALCL); mieloma múltiple; linfoma de Hodgkin; neoplasias de células T y células NK maduras, incluyendo leucemia prolinfocítica de células T; leucemia linfocítica granular de células T grandes; leucemia agresiva de células NK; leucemia/linfoma de células T adultas; linfoma extranodal de células NK/T; linfoma de células T de tipo enteropático de tipo nasal; linfoma hepatoesplénico de células T; linfoma subcutáneo de células T similar a la

35 40 45 50

paniculitis; linfoma blástico de células NK; micosis fungoide/síndrome de Sezary; trastornos linfoproliferativos cutáneos primarios de células T positivas a CD30, incluyendo linfoma anaplásico de células grandes cutáneo C-ALCL, papulosis linfomatoide y lesiones en el borde; linfoma angioinmunoblástico de células T, linfoma inespecífico periférico de células T; linfoma anaplásico de células grandes; leucemia mieloide aguda, incluyendo leucemia promielocítica aguda; y enfermedades mieloproliferativas crónicas, incluyendo leucemia mieloide crónica. El linfoma no Hodgkin de células B puede seleccionarse entre el grupo que consiste en granulomatosis linfomatoide; linfoma de efusión primario; linfoma intravascular de células B grandes; linfoma mediastinal de células B grandes; enfermedades de la cadena pesada, incluyendo enfermedad de  $\gamma$ ,  $\mu$  y  $\alpha$ ; linfomas inducidos por terapia con agentes inmunosupresores, incluyendo linfoma inducido por ciclosporina; y linfoma inducido por metotrexato.

55 Los anticuerpos, inmunoconjugados, moléculas biespecíficas o multiespecíficas, o composiciones farmacéuticas anteriormente mencionadas, o los vectores de expresión de la invención para su uso en los métodos anteriormente mencionados, puede comprender métodos que incluyen uno o más agentes terapéuticos adicionales seleccionados entre un agente quimioterapéutico, un agente antiinflamatorio, o un agente inmunosupresor y/o inmunomodulador. Los uno o más agentes terapéuticos adicionales pueden seleccionarse entre un grupo que consiste en cisplatino, gefitinib, cetuximab, rituximab, bevacizumab, erlotinib, bortezomib, talidomida, pamidronato, ácido zoledrónico, clodronato, risendronato, ibandronato, etidronato, alendronato, tiludronato, trióxido de arsénico, lenalidomida, filgrastim, pegfilgrastim, sargramostim, ácido suberoilánilida hidroxámico, y SCIO-469.

60

65 La presente invención también proporciona un método *in vitro* para detectar la presencia del antígeno CD38, o de una célula que expresa CD38, en una muestra que comprende:

- (a) poner en contacto la muestra con un anticuerpo de la invención en condiciones que permiten la formación de un complejo entre el anticuerpo y CD38; y
- (b) detectar la formación de un complejo.

5 El anticuerpo que se une a CD38 humano puede comprender una CDR3 de V<sub>H</sub> que tiene la secuencia descrita en la SEQ ID NO: 10.

El anticuerpo que se une a CD38 humano, puede comprender una CDR3 de V<sub>L</sub> que tiene la secuencia descrita en la SEQ ID NO: 5 y una CDR3 de V<sub>H</sub> que tiene la secuencia descrita en la SEQ ID NO: 10.

10 El anticuerpo que se une a CD38 humano puede comprender una región V<sub>H</sub> que tiene al menos aproximadamente un 90%, tal como al menos aproximadamente un 95% de identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia descrita en la SEQ ID NO: 7 o con la región que abarca CDR1 de V<sub>H</sub>- CDR3 de V<sub>H</sub> de SEQ ID NO: 7.

15 El anticuerpo que se une a CD38 humano puede comprender una región V<sub>H</sub> que tiene 1-5, tal como 1-3 sustituciones, eliminaciones o adiciones de aminoácidos en comparación con la secuencia descrita en la SEQ ID NO: 7 o con la región que abarca CDR1 de V<sub>H</sub>- CDR3 de V<sub>H</sub> de SEQ ID NO: 7.

20 La presente invención proporciona un anticuerpo que se une a CD38 humano mutante, en donde el residuo de treonina en la posición 237 se ha sustituido con un residuo de alanina (SEQ ID NO: 32), en el mismo grado que se une a CD38 humano (SEQ ID NO: 31). La CE<sub>50</sub> de la unión del anticuerpo a CD38 humano mutante, en donde el residuo de treonina en la posición 237 se ha sustituido con un residuo de alanina (SEQ ID NO: 32) se puede corresponder con el 75 % - 12 % de la CE<sub>50</sub> de la unión del péptido a CD38 humano (SEQ ID NO: 31).

25 La presente invención proporciona un anticuerpo que se une a CD38 humano (SEQ ID NO: 31), en donde el anticuerpo posee las siguientes características de unión: (i) se une a un CD38 humano mutante, en donde el residuo de serina en la posición 274 se ha sustituido con un residuo de fenilalanina (SEQ ID NO: 34), en el mismo grado que se une a CD38 humano (SEQ ID NO: 31), (ii) se une a un CD38 humano mutante, en donde el residuo de glutamina en la posición 272 se ha sustituido con un residuo de arginina (SEQ ID NO: 33), en el mismo grado que se une a CD38 humano (SEQ ID NO: 31), e (iii) se une a un CD38 humano mutante, en donde el residuo de treonina en la posición 237 se ha sustituido con un residuo de alanina (SEQ ID NO: 32), en el mismo grado que se une a CD38 humano (SEQ ID NO: 31).

La CE<sub>50</sub> se puede determinar mediante el uso de un ELISA como se describe en el ejemplo 17 de la descripción.

35 Los anticuerpos anti-CD38 de la invención se unen específicamente a un epítipo de CD38, uniéndose dicho epítipo a un anticuerpo como se ha definido anteriormente.

Los anticuerpos anti-CD38 de la invención se unen específicamente a la región SKRNIQFSCKNYR y a la región EKVQTLEAWVIHGG de CD38 humano (SEQ ID NO: 31).

40 El anticuerpo que se une a CD38 humano, puede poseer una o más de las siguientes características:

- (i) actúa como un antagonista de CD38;
- (ii) no induce una proliferación significativa de células mononucleares de sangre periférica según se determina mediante el método descrito en el ejemplo 18 de la descripción;
- (iii) no induce la liberación de IL-6 significativa por monocitos humanos o células mononucleares de sangre periférica, tal como se determina mediante el método descrito en el ejemplo 19 de la descripción;
- (iv) no induce la liberación de IFN- $\gamma$  detectable por células T humanas o células mononucleares de sangre periférica según se determina mediante el método descrito en el ejemplo 20 de la descripción;
- (v) se internaliza por células que expresan CD38; tal como internalizado por células CHO-CD38 en 5 a 15 minutos a 37°C mediante el método descrito en el ejemplo 12 de la descripción;
- (vi) induce ADCC; tal como con un valor de CE<sub>50</sub> menor de 15 ng/ml, tal como menor de 10 ng/ml en células Daudi-luc y con un valor de CE<sub>50</sub> menor de 75 ng/ml, tal como menor de 50 ng/ml, 30 ng/ml o 10 ng/ml en células MM según se determina mediante el método descrito en el ejemplo 5 de la descripción;
- (vii) induce CDC en presencia de complemento; tal como con un valor de CE<sub>50</sub> menor de 5  $\mu$ g /ml, tal como menor de 1  $\mu$ g /ml en células daudi-luc o CD38-CHO mediante el método descrito en el ejemplo 6 de la descripción;
- (viii) inhibe la síntesis de cGDPR;
- (ix) inhibe la síntesis de cADPR;
- (x) se une a CD38 humano con una afinidad (K<sub>D</sub>) menor de 10<sup>-8</sup> M, tal como en el intervalo de 10<sup>-8</sup> M a 10<sup>-11</sup> M, por ejemplo, en el intervalo de 7 x 10<sup>-9</sup> M a 10<sup>-10</sup> M, según se determina mediante resonancia de plasmón superficial tal como se describe en el ejemplo 20 de la descripción.

65 El anticuerpo puede inhibir la síntesis de cGDPR en al menos un 25%, tal como al menos un 30% después de 90 minutos a una concentración de 3  $\mu$ g /ml según se determina mediante un método espectrofotométrico descrito en el ejemplo 24 de la descripción.

El anticuerpo puede inhibir la síntesis de cADPR en al menos un 25%, tal como al menos un 30% después de 90 minutos a una concentración de 3 µg/ml determinada mediante el método de HPLC descrito en Munshi et al., J. Biol. Chem. 275, 21566-21571 (2000).

- 5 El anticuerpo monoclonal humano puede comprender
- (i) una secuencia de aminoácidos de región variable de cadena pesada derivada de una secuencia de línea germinal humana Hv1263/3M28 (V<sub>H</sub>I) y una secuencia de aminoácidos de región variable de cadena ligera derivada de una secuencia de línea germinal humana L15 (V<sub>K</sub>I); o
- 10 (ii) una secuencia de aminoácidos de región variable de cadena pesada derivada de una secuencia de línea germinal humana V<sub>H</sub>3-DP-47/V3-23 (V<sub>H</sub>III) y una secuencia de aminoácidos de región variable de cadena ligera derivada de una secuencia de línea germinal humana L6 (V<sub>K</sub>I).

- 15 El anticuerpo se puede glucosilar en una célula eucariota.

El vector de expresión puede comprender

- (i) una secuencia de nucleótidos de V<sub>L</sub> de SEQ ID NO: 1,
- 20 (ii) una secuencia de nucleótidos de V<sub>H</sub> de SEQ ID NO: 6,
- (iii) una secuencia de nucleótidos de V<sub>L</sub> de SEQ ID NO: 1 y una secuencia de nucleótidos de V<sub>H</sub> de SEQ ID NO: 6.

- 25 Los vectores de expresión pueden comprender adicionalmente una secuencia de nucleótidos que codifica la región constante de una cadena ligera, una cadena pesada o ambas cadenas ligera y pesada de un anticuerpo humano.

La secuencia de nucleótidos que codifica la región constante de una cadena ligera, una cadena pesada o ambas cadenas ligera y pesada de un anticuerpo humano puede codificar un anticuerpo IgG1.

- 30 El transfectoma que produce un anticuerpo monoclonal anti-CD38 humano codificado por ácidos nucleicos de cadena ligera humana y de cadena pesada humana puede comprender

- (i) los ácidos nucleicos de cadena ligera humana y de cadena pesada humana que comprenden las secuencias de nucleótidos en sus regiones variables como se exponen en la SEQ ID NO: 1 y la SEQ ID NO: 6, respectivamente; o
- 35 (ii) los ácidos nucleicos de cadena ligera humana y de cadena pesada humana que comprenden las secuencias de nucleótidos en sus regiones variables, que son modificaciones conservativas de secuencia de las secuencias descritas en (i).

- 40 El transfectoma que produce un anticuerpo monoclonal humano anti-CD38 que tiene regiones variables de cadena pesada humana y regiones variables de cadena ligera que pueden comprender

- (i) la secuencia de aminoácidos de región variable de cadena ligera humana descrita en la SEQ ID NO: 2, y la secuencia de aminoácidos de región variable de cadena pesada humana descrita en la SEQ ID NO: 7; o
- 45 (ii) modificaciones conservativas de secuencia de las secuencias de aminoácidos de región variable de cadena ligera humana y de cadena pesada humana descritas en (i).

La composición farmacéutica puede comprender uno o más agentes terapéuticos adicionales.

- 50 Los uno o más agentes terapéuticos adicionales se pueden seleccionar entre un agente quimioterapéutico, un agente antiinflamatorio, o un agente inmunosupresor y/o inmunomodulador.

- Los uno o más agentes terapéuticos adicionales se pueden seleccionar entre un grupo que consiste en cisplatino, gefitinib, cetuximab, rituximab, bevacizumab, erlotinib, bortezomib, talidomida, pamidronato, ácido zoledrónico, clodronato, risendronato, ibandronato, etidronato, alendronato, tiludronato, trióxido de arsénico, lenalidomida, filgrastim, pegfilgrastim, sargramostim, ácido suberoilánilida hidroxámico, y SCIO-469.
- 55

El anticuerpo puede estar comprendido en un kit para detectar la presencia del antígeno CD38, o de una célula que expresa CD38, en una muestra.

60 **Breve descripción de las figuras**

- La figura 1A muestra la unión de -003, -005 y el anticuerpo de control de isotipo HuMab-KLH a células CHO transfectadas con CD38 (CHO-CD38) medida mediante citometría de flujo. La configuración experimental se describe en el ejemplo 4.
- 65

La figura 1B muestra la unión de -024 y HuMab-KLH a células CHO transfectadas con CD38 (CHO-CD38)

medida mediante citometría de flujo. La configuración experimental se describe en el ejemplo 4.

La figura 2A muestra la unión de -003, -005 y HuMab-KLH a células Daudi medida mediante citometría de flujo. La configuración experimental se describe en el ejemplo 4.

5 La figura 2B muestra la unión de -024 y HuMab-KLH a células Daudi medida mediante citometría de flujo. La configuración experimental se describe en el ejemplo 4.

La figura 3 muestra la unión de -003, -005, -024 y HuMab-KLH a células de mieloma múltiple. La configuración experimental se describe en el ejemplo 4.

La figura 4A muestra la capacidad de -003 y -005 para inducir la lisis de células Daudi mediante ADCC en comparación con rituximab y HuMab-KLH. La configuración experimental se describe en el ejemplo 5.

10 La figura 4B muestra la capacidad de -024 para inducir la lisis de células Daudi mediante ADCC en comparación con HuMab-KLH. La configuración experimental se describe en el ejemplo 5.

La figura 5A muestra la capacidad de -003, -005 y -024 para inducir la lisis de células tumorales de mieloma múltiple recientes mediante ADCC en comparación con HuMab-KLH. La configuración experimental se describe en el ejemplo 5.

15 La figura 5B muestra la capacidad de -003, -005 y -024 para inducir la lisis de células tumorales de leucemia de células plasmáticas recientes mediante ADCC en comparación con HuMab-KLH. La configuración experimental se describe en el ejemplo 5.

La figura 6 muestra la capacidad de -003 y -005 para inducir la lisis de JK6L (una línea celular de mieloma múltiple) mediante ADCC en comparación con HuMab-KLH. La configuración experimental se describe en el ejemplo 5.

20 La figura 7 muestra la capacidad de -003 y -005 para inducir la lisis de AMO-1 (una línea celular de mieloma múltiple) mediante ADCC en comparación con HuMab-KLH. La configuración experimental se describe en el ejemplo 5.

La figura 8 muestra la lisis mediada por CDC de células Daudi-luc inducida por -003 y -005 en comparación con HuMab-KLH. La configuración experimental se describe en el ejemplo 6.

25 La figura 9A muestra la lisis mediada por CDC de células CHO-CD38 inducida por -003 y -005 en comparación con HuMab-KLH. La configuración experimental se describe en el ejemplo 6.

La figura 9B muestra la lisis mediada por CDC de células CHO-CD38 inducida por -024 en comparación con HuMab-KLH. La configuración experimental se describe en el ejemplo 6.

30 La figura 10A muestra la lisis mediada por CDC del 3% de las células tumorales refractarias en presencia de -003, -005 y HuMab-KLH. La configuración experimental se describe en el ejemplo 6.

La figura 10B muestra la lisis mediada por CDC del 9% de las células tumorales refractarias en presencia de -003, -005 y HuMab-KLH. La configuración experimental se describe en el ejemplo 6.

35 La figura 10C muestra la lisis mediada por CDC del 30-40% de las células tumorales en presencia de -003, -005 y HuMab-KLH. La configuración experimental se describe en el ejemplo 6.

La figura 10D muestra la lisis mediada por CDC del 70% de las células tumorales en presencia de -003, -005 y HuMab-KLH. La configuración experimental se describe en el ejemplo 6.

La figura 10E muestra la lisis mediada por CDC de células de mieloma múltiple en presencia de -024 y HuMab-KLH. La configuración experimental se describe en el ejemplo 6.

40 La figura 11 muestra que -003 y -005 no bloquea de manera cruzada la unión a CD38. La configuración experimental se describe en el ejemplo 7.

La figura 12A muestra la tinción inmunológica de macrófagos, linfocitos y células B plasmáticas con -003. La configuración experimental se describe en el ejemplo 10.

45 La figura 12B muestra la tinción inmunohistológica del epitelio bronquial con -003. La configuración experimental se describe en el ejemplo 10.

La figura 12C muestra la tinción inmunohistológica de monocitos con -003. La configuración experimental se describe en el ejemplo 10.

La figura 12D muestra la tinción inmunohistológica de tejido linfóide de macaco con -003. La configuración experimental se describe en el ejemplo 10.

50 La figura 13A muestra la tinción inmunológica de macrófagos, linfocitos y células B plasmáticas con -005. La configuración experimental se describe en el ejemplo 10.

La figura 13B muestra la tinción inmunohistológica del epitelio bronquial con -005. La configuración experimental se describe en el ejemplo 10.

La figura 13C muestra la tinción inmunohistológica de monocitos con -005. La configuración experimental se describe en el ejemplo 10.

55 La figura 13D muestra la tinción inmunohistológica de tejido linfóide de macaco con -005. La configuración experimental se describe en el ejemplo 10.

La figura 14A muestra la tinción inmunohistológica de endotelio de hígado con CD31. La configuración experimental se describe en el ejemplo 10.

60 La figura 14B muestra la tinción inmunohistológica de endotelio de hígado con vWF. La configuración experimental se describe en el ejemplo 10.

La figura 14C muestra la tinción inmunohistológica de endotelio de hígado con anti-KLH. La configuración experimental se describe en el ejemplo 10.

La figura 14D muestra la tinción inmunohistológica de endotelio de hígado con -003. La configuración experimental se describe en el ejemplo 10.

65 La figura 14E muestra la tinción inmunohistológica de endotelio de hígado con -005. La configuración

experimental se describe en el ejemplo 10.

La figura 15A muestra la reactividad cruzada de -003 y -005 en comparación con HuMab-KLH en linfocitos de macaco medida mediante citometría de flujo. La configuración experimental se describe en el ejemplo 11.

La figura 15B muestra la reactividad cruzada de -003 y -005 en comparación con HuMab-KLH en monocitos de macaco medida mediante citometría de flujo. La configuración experimental se describe en el ejemplo 11.

La figura 15C muestra la reactividad cruzada de -003 y -005 en comparación con HuMab-KLH en PBMC de monos rhesus medida mediante citometría de flujo. La configuración experimental se describe en el ejemplo 11.

La figura 16A muestra la internalización de -003 medida mediante inactivación de EtBr. La configuración experimental se describe en el ejemplo 12.

La figura 16B muestra la internalización de -005 medida mediante inactivación de EtBr. La configuración experimental se describe en el ejemplo 12.

La figura 17A muestra la inhibición causada por -003 y -005 en comparación con un anticuerpo monoclonal anti-CD20 (rituximab) y HuMab-KLH del crecimiento de células tumorales en una configuración preventiva medida mediante obtención de imágenes de luciferasa *in vivo* de SCID. La configuración experimental se describe en el ejemplo 13.

La figura 17B muestra la inhibición causada por -003 y -005 en comparación con un anticuerpo monoclonal anti-CD20 (rituximab) y HuMab-KLH del crecimiento de células tumorales en la configuración terapéutica I medida mediante obtención de imágenes de luciferasa *in vivo* de SCID. La configuración experimental se describe en el ejemplo 13.

La figura 17C muestra la inhibición causada por -003 y -005 en comparación con un anticuerpo monoclonal anti-CD20 (rituximab) y HuMab-KLH del crecimiento de células tumorales en la configuración terapéutica II medida mediante obtención de imágenes de luciferasa *in vivo* de SCID. La configuración experimental se describe en el ejemplo 13.

La figura 17D muestra la inhibición del crecimiento de células tumorales mediante -003 y -024 en comparación con HuMab-KLH en la configuración terapéutica III medida mediante obtención de imágenes de luciferasa *in vivo* de SCID. La configuración experimental se describe en el ejemplo 13.

La figura 18 muestra la inducción de la apoptosis mediante -003 y -005 en comparación con un anticuerpo monoclonal anti-CD20 (rituximab) y HuMab-KLH sin o con sobrecruzamiento. La configuración experimental se describe en el ejemplo 14.

La figura 19 muestra la puntuación histológica para células positivas a CD38 en xenoinjertos de ratón RA-SCID implantados en el día 14, después del tratamiento con anti-KLH (HuMab-KLH) o -005. Los métodos se describen en el ejemplo 15.

La figura 20 muestra la puntuación histológica para células positivas a CD138 en xenoinjertos de ratón RA-SCID implantados en el día 14, después del tratamiento con anti-KLH o -005. Los métodos se describen en el ejemplo 15.

La figura 21 muestra la tinción de CD38 de células B en xenoinjertos antes del implante (A), o después del tratamiento con anti-KLH (B), o -005 (C). Los métodos se describen en el ejemplo 15.

La figura 22 muestra la tinción de CD138 de células B en xenoinjertos antes del implante (A), o después del tratamiento con anti-KLH (B), o -005 (C). Los métodos se describen en el ejemplo 15.

La figura 23 muestra la unión de -003 y -005 a CD38 humano de tipo silvestre y mutante medida mediante ELISA. 23A: Unión de -003 y -005 a CD38 humano mutante en T237A. 23B: Unión de -003 y -005 a CD38 humano mutante en Q272R. 23C: Unión de -003 y -005 a CD38 humano mutante en S274F. Los métodos se describen en el ejemplo 17.

La figura 24 muestra el efecto de -003 y -005 en comparación con HuMab-KLH en la proliferación (A), producción de IL-6 (B) y producción de IFN- $\gamma$  (C) de PBMC humanos. Los métodos se describen en los ejemplos 18, 19 y 20, respectivamente.

La figura 25 muestra la producción enzimática de cGMP ribosa en presencia de varias concentraciones de -003 (B), -005 (C), -024 (D) o anti-KLH (A). Los métodos se describen en el ejemplo 23.

La figura 26 muestra la comparación entre -003, -005 y el anticuerpo TH-3079 de Morphosys en la CDC de células CHO-CD38 (26A), la CDC de células Daudi (26B), y la ADCC de células Daudi (26C).

SEQ ID NO: 1 es la secuencia de nucleótidos de la región V<sub>L</sub> del anticuerpo -003.

SEQ ID NO: 2 es la secuencia de aminoácidos de la región V<sub>L</sub> del anticuerpo -003.

SEQ ID NO: 3 es la secuencia de aminoácidos de la CDR1 de V<sub>L</sub> del anticuerpo -003 que comprende los aa 24-34 de la SEQ ID NO: 2.

SEQ ID NO: 4 es la secuencia de aminoácidos de la CDR2 de V<sub>L</sub> del anticuerpo -003 que comprende los aa 50-56 de la SEQ ID NO: 2.

SEQ ID NO: 5 es la secuencia de aminoácidos de la CDR3 de V<sub>L</sub> del anticuerpo -003 que comprende los aa 89-97 de la SEQ ID NO: 2.

SEQ ID NO: 6 es la secuencia de nucleótidos de la región V<sub>H</sub> del anticuerpo -003.

SEQ ID NO: 7 es la secuencia de aminoácidos de la región V<sub>H</sub> del anticuerpo -003.

SEQ ID NO: 8 es la secuencia de aminoácidos de la CDR1 de V<sub>H</sub> del anticuerpo -003 que comprende los aa 31-35 de la SEQ ID NO: 7.

SEQ ID NO: 9 es la secuencia de aminoácidos de la CDR2 de V<sub>H</sub> del anticuerpo -003 que comprende los aa 50-66 de la SEQ ID NO: 7.

SEQ ID NO: 10 es la secuencia de aminoácidos de la CDR3 de V<sub>H</sub> del anticuerpo -003 que comprende los aa 99-109 de la SEQ ID NO: 7.

SEQ ID NO: 11 es la secuencia de nucleótidos de la región V<sub>L</sub> del anticuerpo -005.  
 SEQ ID NO: 12 es la secuencia de aminoácidos de la región V<sub>L</sub> del anticuerpo -005.  
 SEQ ID NO: 13 es la secuencia de aminoácidos de la CDR1 de V<sub>L</sub> del anticuerpo -005 que comprende los aa 24-34 de la SEQ ID NO: 12.  
 5 SEQ ID NO: 14 es la secuencia de aminoácidos de la CDR2 de V<sub>L</sub> del anticuerpo -005 que comprende los aa 50-56 de la SEQ ID NO: 12.  
 SEQ ID NO: 15 es la secuencia de aminoácidos de la CDR3 de V<sub>L</sub> del anticuerpo -005 que comprende los aa 89-97 de la SEQ ID NO: 12.  
 SEQ ID NO: 16 es la secuencia de nucleótidos de la región V<sub>H</sub> del anticuerpo -005.  
 10 SEQ ID NO: 17 es la secuencia de aminoácidos de la región V<sub>H</sub> del anticuerpo -005.  
 SEQ ID NO: 18 es la secuencia de aminoácidos de la CDR1 de V<sub>H</sub> del anticuerpo -005 que comprende los aa 31-35 de la SEQ ID NO: 17.  
 SEQ ID NO: 19 es la secuencia de aminoácidos de la CDR2 de V<sub>H</sub> del anticuerpo -005 que comprende los aa 50-66 de la SEQ ID NO: 17.  
 15 SEQ ID NO: 20 es la secuencia de aminoácidos de la CDR3 de V<sub>H</sub> del anticuerpo -005 que comprende los aa 99-111 de la SEQ ID NO: 17.  
 SEQ ID NO: 21 es la secuencia de nucleótidos de la región V<sub>L</sub> del anticuerpo -024.  
 SEQ ID NO: 22 es la secuencia de aminoácidos de la región V<sub>L</sub> del anticuerpo -024.  
 20 SEQ ID NO: 23 es la secuencia de aminoácidos de la CDR1 de V<sub>L</sub> del anticuerpo -024 que comprende los aa 24-34 de la SEQ ID NO: 22.  
 SEQ ID NO: 24 es la secuencia de aminoácidos de la CDR2 de V<sub>L</sub> del anticuerpo -024 que comprende los aa 50-56 de la SEQ ID NO: 22.  
 SEQ ID NO: 25 es la secuencia de aminoácidos de la CDR3 de V<sub>L</sub> del anticuerpo -024 que comprende los aa 89-97 de la SEQ ID NO: 22.  
 25 SEQ ID NO: 26 es la secuencia de nucleótidos de la región V<sub>H</sub> del anticuerpo -024.  
 SEQ ID NO: 27 es la secuencia de aminoácidos de la región V<sub>H</sub> del anticuerpo -024.  
 SEQ ID NO: 28 es la secuencia de aminoácidos de la CDR1 de V<sub>H</sub> del anticuerpo -024 que comprende los aa 31-35 de la SEQ ID NO: 27.  
 SEQ ID NO: 29 es la secuencia de aminoácidos de la CDR2 de V<sub>H</sub> del anticuerpo -024 que comprende los aa 50-66 de la SEQ ID NO: 27.  
 30 SEQ ID NO: 30 es la secuencia de aminoácidos de la CDR3 de V<sub>H</sub> del anticuerpo -024 que comprende los aa 99-111 de la SEQ ID NO: 27.  
 SEQ ID NO: 31 es la secuencia de CD38 humano.  
 SEQ ID NO: 32 es la secuencia de un CD38 humano mutante, en donde el residuo de treonina en la posición 237 se ha sustituido con un residuo de alanina.  
 35 SEQ ID NO: 33 es la secuencia de un CD38 humano mutante, en donde el residuo de glutamina en la posición 272 se ha sustituido con un residuo de arginina.  
 SEQ ID NO: 34 es la secuencia de un CD38 humano mutante, en donde el residuo de serina en la posición 274 se ha sustituido con un residuo de fenilalanina.

#### Descripción detallada

La presente invención proporciona anticuerpos anti-CD38, que pueden ser útiles en el tratamiento, el diagnóstico y la prevención de una diversidad de trastornos que implican células que expresan CD38, tales como el mieloma múltiple.

En una realización, un anticuerpo anti-CD38 de la invención es el anticuerpo -003. -003 es un anticuerpo monoclonal de IgG1 humano que tiene una región V<sub>L</sub> que consiste en la secuencia de la SEQ ID NO: 2 y una región V<sub>H</sub> que consiste en la secuencia de la SEQ ID NO: 7.

Otros CD38BP incluyen el anticuerpo -005 y el anticuerpo -024. -005 es un anticuerpo monoclonal de IgG1 humano que tiene una región V<sub>L</sub> que consiste en la secuencia de la SEQ ID NO:12 y una región de V<sub>H</sub> que consiste en la secuencia de la SEQ ID NO:17.

-024 es un anticuerpo monoclonal de IgG1 humano que tiene una región V<sub>L</sub> que consiste en la secuencia de la SEQ ID NO: 22 y una región V<sub>H</sub> que consiste en la secuencia de la SEQ ID NO: 27.

Los anticuerpos interactúan con antígenos diana principalmente a través de residuos de aminoácidos que se ubican en las seis regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de cadena pesada y ligera. Por este motivo, las secuencias de aminoácidos dentro de las CDR son más diversas entre anticuerpos individuales que las secuencias fuera de las CDR. Debido a que las secuencias de CDR son responsables de la mayor parte de las interacciones anticuerpo-antígeno, es posible expresar anticuerpos recombinantes que imitan las propiedades de anticuerpos específicos de origen natural mediante la construcción de vectores de expresión que incluyen secuencias de CDR del anticuerpo específico de origen natural injertadas en secuencias marco conservadas de un anticuerpo diferente con propiedades diferentes (véase, por ejemplo, Riechmann, L. et al., Nature 332, 323-327 (1998), Jones, P. et al., Nature 321, 522-525 (1986) y Queen, C. et al., PNAS USA 86, 10029-10033 (1989)).

Es de sobra conocido en la técnica que los dominios CDR3 de cadena pesada de un anticuerpo desempeñan un papel particularmente importante en la especificidad/afinidad de unión de un anticuerpo por un antígeno (Ditzel HJ, et al., J Immunol. 157(2), 739-49 (1996), Barbas SM et al., J. Am. Chem. Soc. 116, 2161-2162 (1994), y Barbas SM et al., Proc Natl Acad Sci USA 92(7), 2529-33(1995)).

En el presente documento se describen los CDBP que comprenden las CDR3 de cadena pesada de -003 o -005 o -024, las CDR3 de cadena pesada y ligera de -003 o -005 o -0024, las CDR2 de -003 y -005 y -0024 y/o las CDR1 de -003 y -005 y -024.

También se describen en el presente documento CD38BP, que compiten con -003, -005 o -024 por la unión a CD38.

La competición se puede determinar mediante el uso de un ELISA o de un FACS, tal como se describe en la sección de ejemplos.

En el presente documento se describen CD38BP que se unen específicamente a un epítipo de CD38, uniéndose dicho epítipo específicamente a -003 o -005 o -024, y CD38BP que tienen sustancialmente las mismas características específicas de unión por la unión a CD38 humano que -003 o -005 o -024.

Los anticuerpos de la invención pueden comprender una CDR1 de  $V_L$  que tiene la secuencia descrita en la SEQ ID NO: 3.

Los anticuerpos de la invención pueden comprender una CDR2 de  $V_L$  que tiene la secuencia descrita en la SEQ ID NO: 4.

Los anticuerpos de la invención pueden comprender una CDR3 de  $V_L$  que tiene la secuencia descrita en la SEQ ID NO: 5.

Los anticuerpos de la invención pueden comprender una CDR3 de  $V_L$  que tiene la secuencia descrita en la SEQ ID NO: 5 y una CDR1 de  $V_L$  que tiene la secuencia descrita en la SEQ ID NO: 3.

Los anticuerpos de la invención pueden comprender una CDR3 de  $V_L$  que tiene la secuencia descrita en la SEQ ID NO: 5 y una CDR2 de  $V_L$  que tiene la secuencia descrita en la SEQ ID NO: 4.

Los anticuerpos de la invención comprenden una CDR3 de  $V_L$  que tienen la secuencia descrita en la SEQ ID NO: 5 y una CDR2 de  $V_L$  que tiene la secuencia descrita en la SEQ ID NO: 4 y una CDR1 de  $V_L$  que tiene la secuencia descrita en la SEQ ID NO: 3.

Los anticuerpos de la invención pueden comprender una CDR1 de  $V_H$  que tiene la secuencia descrita en la SEQ ID NO: 8.

Los anticuerpos de la invención pueden comprender una CDR2 de  $V_H$  que tiene la secuencia descrita en la SEQ ID NO: 9.

Los anticuerpos de la invención pueden comprender una CDR3 de  $V_H$  que tiene la secuencia descrita en la SEQ ID NO: 10.

Los anticuerpos de la invención pueden comprender una CDR3 de  $V_H$  que tiene la secuencia descrita en la SEQ ID NO: 10 y una CDR1 de  $V_H$  que consiste esencialmente en la SEQ ID NO: 8.

Los anticuerpos de la invención pueden comprender una CDR3 de  $V_H$  que tiene la secuencia descrita en la SEQ ID NO: 10 y una CDR2 de  $V_H$  que consiste esencialmente en la SEQ ID NO: 9.

Los anticuerpos de la invención comprenden una CDR3 de  $V_H$  que tiene la secuencia descrita en la SEQ ID NO: 10 y una CDR2 de  $V_H$  que tiene la secuencia descrita en la SEQ ID NO: 9 y una CDR1 de  $V_H$  que tiene la secuencia descrita en la SEQ ID NO: 8.

Los anticuerpos de la invención pueden comprender

- (a) una primera región  $V_L$  que comprende tres CDR de  $V_L$ , que independientemente entre sí consisten esencialmente en las SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, y SEQ ID NO: 5; y
- (b) una primera región  $V_H$  que comprende tres CDR de  $V_H$ , que independientemente entre sí consisten esencialmente en las SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, y SEQ ID NO: 10.

En una realización, la región  $V_L$  y la región  $V_H$  están presentes en la misma cadena en el anticuerpo.

En una realización adicional, la región V<sub>L</sub> y la región V<sub>H</sub> están separadas por un enlazador flexible.

En una realización, la región V<sub>L</sub> y la región V<sub>H</sub> están presentes en cadenas separadas en el anticuerpo.

- 5 En una realización adicional, la región V<sub>L</sub> y la región V<sub>H</sub> están presentes en cadenas separadas en el anticuerpo en el contexto de una proteína plegada de inmunoglobulina.

- 10 En una realización, la primera región V<sub>L</sub> y la primera región V<sub>H</sub> están orientadas de tal forma que las tres CDR en la región V<sub>L</sub> y las tres CDR en la región V<sub>H</sub> se asocian de manera cooperativa para contribuir en la unión selectiva y/o específica a un determinante antigénico en CD38 humano.

- 15 En una realización adicional, el anticuerpo comprende una segunda región V<sub>L</sub> idéntica a la primera región V<sub>L</sub> y una segunda región V<sub>H</sub> idéntica a la primera región V<sub>H</sub>, donde la segunda región V<sub>L</sub> y la segunda región V<sub>H</sub> se asocian de manera cooperativa para contribuir en la unión selectiva y/o específica a un determinante antigénico en CD38 humano.

Los anticuerpos de la invención pueden comprender una región V<sub>L</sub> que es una variante funcional de la región V<sub>L</sub> de -003.

- 20 En una realización, la región V<sub>L</sub> del anticuerpo consiste esencialmente en una secuencia que tiene al menos aproximadamente un 50%, al menos un 60%, al menos aproximadamente un 70%, al menos aproximadamente un 75%, al menos aproximadamente un 80%, al menos aproximadamente un 85%, al menos aproximadamente un 90%, o al menos aproximadamente un 95% de identidad de secuencia de aminoácidos con una secuencia según la SEQ ID NO: 2.

- 25 Los anticuerpos de la invención pueden comprender una región V<sub>H</sub> que es una variante funcional de la región V<sub>H</sub> de -003.

- 30 En una realización, la región V<sub>H</sub> del anticuerpo consiste esencialmente en una secuencia que tiene al menos aproximadamente un 50%, al menos un 60%, al menos aproximadamente un 70%, al menos aproximadamente un 75%, al menos aproximadamente un 80%, al menos aproximadamente un 85%, al menos aproximadamente un 90%, o al menos aproximadamente un 95% de identidad de secuencia de aminoácidos con una secuencia según la SEQ ID NO: 7.

- 35 Los anticuerpos de la invención pueden comprender al menos una CDR que es una variante funcional de una CDR de -003.

- 40 En una realización, al menos una de las CDR del anticuerpo consiste esencialmente en una secuencia que tiene al menos aproximadamente un 50%, al menos un 60%, al menos aproximadamente un 70%, al menos aproximadamente un 75%, al menos aproximadamente un 80%, al menos aproximadamente un 85%, al menos aproximadamente un 90%, o al menos aproximadamente un 95% de identidad de secuencia de aminoácidos con una secuencia según la SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, o SEQ ID NO: 10. En una realización, el anticuerpo tiene al menos aproximadamente un 50%, al menos aproximadamente un 60%, al menos aproximadamente un 70%, al menos aproximadamente un 80%, al menos aproximadamente un 90%, o al menos aproximadamente un 95% de la afinidad, avidéz o especificidad de -003.

- 50 En una realización, el anticuerpo compite con -003 por la unión a CD38. En una realización adicional, la competición se determina mediante el uso de un ELISA tal como se describe en la sección de ejemplos. En otra realización adicional, la competición se determina mediante el uso de un FACS, tal como se describe en la sección de ejemplos.

En una realización, el anticuerpo puede unirse específicamente a un epítipo de CD38, uniéndose dicho epítipo específicamente a -003.

- 55 Los anticuerpos de la invención se pueden unir a CD38 humano con mayor afinidad que -003, o pueden tener sustancialmente las mismas características de unión específicas a CD38 que -003.

Los anticuerpos pueden ser sustancialmente libres de otros péptidos de unión a CD38.

- 60 Un anticuerpo de la invención puede ser un anticuerpo humano, un anticuerpo humanizado o un anticuerpo quimérico.

En una realización, el anticuerpo de la presente invención es un anticuerpo monoclonal.

- 65 En una realización, el anticuerpo de la presente invención es un anticuerpo de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgD, IgA, IgE o IgM. En una realización adicional, el anticuerpo es un anticuerpo de IgG1. En una realización adicional, el anticuerpo es un anticuerpo de IgG1,κ. En otra realización adicional, el anticuerpo es un anticuerpo de IgM. En una

realización adicional, el anticuerpo es un anticuerpo de IgM, $\kappa$ .

En una realización, el anticuerpo de la presente invención es un fragmento de anticuerpo o un anticuerpo monocatenario.

5 En una realización, el anticuerpo se glucosila en una célula eucariota.

En una realización, el anticuerpo comprende además un enlazador quelante para acoplar un radioisótopo.

10 En una realización, el anticuerpo se encuentra en una forma sustancialmente aislada.

La presente invención proporciona un ácido nucleico aislado que codifica un anticuerpo CD38 de la presente invención.

15 La presente invención proporciona un vector de expresión que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un anticuerpo anti-CD38 de la presente invención.

En una realización, el vector de expresión comprende una secuencia de nucleótidos de  $V_L$  de SEQ ID NO: 1, una secuencia de nucleótidos de  $V_H$  de la SEQ ID NO:6, o una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO:1 y una secuencia de nucleótidos de  $V_H$  de la SEQ ID NO:6.

También se describe en el presente documento un vector de expresión que comprende una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 11, una secuencia de nucleótidos de  $V_H$  de SEQ ID NO: 16, o una secuencia de nucleótidos de  $V_L$  de SEQ ID NO: 11 y una secuencia de nucleótidos de  $V_H$  de SEQ ID NO: 16.

25 También se describe en el presente documento un vector de expresión que comprende una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO:21, una secuencia de nucleótidos de  $V_H$  de la SEQ ID NO:26, o una secuencia de nucleótidos de  $V_L$  de la SEQ ID NO:21 y una secuencia de nucleótidos de  $V_H$  de la SEQ ID NO:26.

30 En una realización adicional, el vector de expresión comprende además una secuencia de nucleótidos que codifica la región constante de una cadena ligera, una cadena pesada o ambas cadenas ligera y pesada de un anticuerpo humano.

En una realización adicional, la secuencia de nucleótidos que codifica la región constante de una cadena ligera, una cadena pesada o las cadenas tanto pesada como ligera de un anticuerpo humano codifica un anticuerpo IgG1.

El anticuerpo de la invención se puede producir mediante un hibridoma que produce un anticuerpo monoclonal humano anti-CD38 codificado por los ácidos nucleicos de la cadena ligera humana y la cadena pesada humana que comprenden la secuencia de nucleótidos en la región variable de la cadena ligera como se expone en la SEQ ID NO:1, o modificaciones de secuencia conservativas de la misma, y secuencias de nucleótidos en la región variable de la cadena pesada como se expone en la SEQ ID NO:6 o modificaciones de secuencia conservativas de la misma. En una realización, los ácidos nucleicos de cadena ligera humana comprenden una secuencia de nucleótidos como se expone en la SEQ ID NO:1 y los ácidos nucleicos de cadena pesada humana comprenden una secuencia de nucleótidos como se expone en la SEQ ID NO:6.

El anticuerpo de la invención se puede producir mediante un hibridoma que produce un anticuerpo monoclonal humano anti-CD38 que tiene regiones variables de cadena pesada humana y de cadena ligera humana que comprenden la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera humana tal como se expone en la SEQ ID NO:2, o modificaciones de secuencia conservativas de las mismas, y la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera humana como se expone en la SEQ ID NO:7, o modificaciones de secuencia conservativas de las mismas. En una realización, la región variable de la cadena ligera humana comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO:2, y la región variable de la cadena pesada humana comprende una secuencia de aminoácidos tal como se expone en la SEQ ID NO:7.

La presente invención proporciona un transfectoma que produce un anticuerpo monoclonal humano anti-CD38 codificados por ácidos nucleicos de la región variable de la cadena ligera humana como se expone en la SEQ ID NO:1, o modificaciones de secuencia conservativas de la misma, y ácidos nucleicos de la cadena pesada humana como se expone en la SEQ ID NO:6, o modificaciones de secuencia conservativas de la misma. En una realización, el anticuerpo monoclonal humano anti-CD38 se codifica por ácidos nucleicos de la región variable de cadena ligera humana como se expone en la SEQ ID NO:1, y ácidos nucleicos de cadena pesada humana como se expone en la SEQ ID NO:6.

La presente invención proporciona un transfectoma que produce un anticuerpo monoclonal humano anti-CD38 que tiene las regiones variables de la cadena ligera humana y de la cadena pesada humana que comprenden la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera humana como se expone en la SEQ ID NO:2, o modificaciones de secuencia conservativas de la misma, y la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada humana como se expone en la SEQ ID NO:7, o modificaciones de secuencia conservativas de la

misma. En una realización, la cadena ligera humana comprende la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera tal como se expone en la SEQ ID NO:2, y la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada humana como se expone en la SEQ ID NO:7.

5 En el presente documento se describe un hibridoma que produce un anticuerpo anti-CD38 monoclonal humano codificado por los ácidos nucleicos de cadena ligera humana y de cadena pesada humana que comprenden secuencias de ácidos nucleicos en la región variable de cadena ligera tal como se exponen en la SEQ ID NO: 11, o modificaciones conservativas de secuencia de las mismas, y secuencias de nucleótidos en la región variable de cadena pesada tal como se expone en la SEQ ID NO: 16, o modificaciones conservativas de secuencia de las mismas. En una realización, los ácidos nucleicos de cadena ligera humana comprenden una secuencia de nucleótidos tal como se expone en la SEQ ID NO: 11, y los ácidos nucleicos de cadena pesada humana comprenden una secuencia de nucleótidos tal como se expone en la SEQ ID NO: 16.

15 En el presente documento se describe un hibridoma que produce un anticuerpo monoclonal humano anti-CD38 que tiene regiones variables de cadena pesada y de cadena ligera humana que comprenden la secuencia de aminoácidos de cadena ligera humana tal como se expone en la SEQ ID NO: 12, o modificaciones conservativas de secuencia de las mismas, y la secuencia de aminoácidos de región variable de cadena ligera humana descrita en la SEQ ID NO: 17, o modificaciones conservativas de secuencia de las mismas. En una realización, la región variable de cadena ligera humana comprende una secuencia de aminoácidos tal como se expone en la SEQ ID NO: 12, y la región variable de cadena pesada humana comprende una secuencia de aminoácidos tal como se expone en la SEQ ID NO: 17.

25 En el presente documento se describe un transfectoma que produce un anticuerpo monoclonal humano anti-CD38 codificado por ácidos nucleicos de secuencia variable de cadena ligera humana tal como se exponen en la SEQ ID NO: 11, o modificaciones conservativas de secuencia de las mismas, y ácidos nucleicos de cadena pesada humana tal como se exponen en la SEQ ID NO: 16, o modificaciones conservativas de secuencia de las mismas. En una realización, el anticuerpo monoclonal humano anti-CD38 está codificado por los ácidos nucleicos de región variable de cadena ligera humana tal como se exponen en la SEQ ID NO: 11, y ácidos nucleicos de cadena pesada humana tal como se exponen en la SEQ ID NO: 16.

30 En el presente documento se describe un transfectoma que produce un anticuerpo monoclonal humano anti-CD38 que tiene las regiones variables de cadena ligera y cadena pesada humana que comprenden la secuencia de aminoácidos de región variable de cadena ligera tal como se expone en la SEQ ID NO: 12, o modificaciones conservativas de secuencia de las mismas, y la secuencia de aminoácidos de región variable de cadena pesada humana descrita en la SEQ ID NO: 17, o modificaciones conservativas de secuencia de las mismas. En una realización, la cadena ligera humana comprende la secuencia de aminoácidos de región variable de cadena ligera humana tal como se expone en la SEQ ID NO: 12, y la cadena pesada humana comprende la secuencia de aminoácidos de región variable de cadena pesada humana tal como se expone en la SEQ ID NO: 17.

40 En el presente documento se describe un hibridoma que produce un anticuerpo anti-CD38 monoclonal humano codificado por los ácidos nucleicos de cadena ligera humana y de cadena pesada humana que comprenden secuencias de ácidos nucleicos en la región variable de cadena ligera tal como se exponen en la SEQ ID NO: 21, o modificaciones conservativas de secuencia de las mismas, y secuencias de nucleótidos en la región variable de cadena pesada tal como se expone en la SEQ ID NO: 26, o modificaciones conservativas de secuencia de las mismas. En una realización, los ácidos nucleicos de cadena ligera humana comprenden una secuencia de nucleótidos tal como se expone en la SEQ ID NO: 21, y los ácidos nucleicos de cadena pesada humana comprenden una secuencia de nucleótidos tal como se expone en la SEQ ID NO: 26.

50 En el presente documento se describe un hibridoma que produce un anticuerpo monoclonal humano anti-CD38 que tiene regiones variables de cadena pesada y de cadena ligera humana que comprenden la secuencia de aminoácidos de cadena ligera humana tal como se expone en la SEQ ID NO: 22, o modificaciones conservativas de secuencia de las mismas, y la secuencia de aminoácidos de región variable de cadena ligera humana descrita en la SEQ ID NO: 27, o modificaciones conservativas de secuencia de las mismas. En una realización, la región variable de cadena ligera humana comprende una secuencia de aminoácidos tal como se expone en la SEQ ID NO: 22, y la región variable de cadena pesada humana comprende una secuencia de aminoácidos tal como se expone en la SEQ ID NO: 27.

60 En el presente documento se describe un transfectoma que produce un anticuerpo monoclonal humano anti-CD38 codificado por ácidos nucleicos de secuencia variable de cadena ligera humana tal como se exponen en la SEQ ID NO: 21, o modificaciones conservativas de secuencia de las mismas, y ácidos nucleicos de cadena pesada humana tal como se exponen en la SEQ ID NO: 26, o modificaciones conservativas de secuencia de las mismas. En una realización, el anticuerpo monoclonal humano anti-CD38 está codificado por los ácidos nucleicos de región variable de cadena ligera humana tal como se exponen en la SEQ ID NO: 21, y ácidos nucleicos de cadena pesada humana tal como se exponen en la SEQ ID NO: 26.

65 En el presente documento se describe un transfectoma que produce un anticuerpo monoclonal humano anti-CD38

- que tiene las regiones variables de cadena ligera y cadena pesada humana que comprenden la secuencia de aminoácidos de región variable de cadena ligera tal como se expone en la SEQ ID NO: 22, o modificaciones conservativas de secuencia de las mismas, y la secuencia de aminoácidos de región variable de cadena pesada humana descrita en la SEQ ID NO: 27, o modificaciones conservativas de secuencia de las mismas. En una  
5 realización, la cadena ligera humana comprende la secuencia de aminoácidos de región variable de cadena ligera humana tal como se expone en la SEQ ID NO: 22, y la cadena pesada humana comprende la secuencia de aminoácidos de región variable de cadena pesada humana tal como se expone en la SEQ ID NO: 27.
- La presente invención proporciona una célula hospedadora eucariota o procariota que produce un anticuerpo anti-  
10 CD38 de la presente invención.
- La presente invención proporciona una célula hospedadora eucariota o procariota que contiene un vector de expresión de la presente invención.
- 15 En el presente documento se describe un animal no humano o una planta transgénica que comprende ácidos nucleicos que codifican una cadena pesada humana y una cadena ligera humana, en donde el animal o la planta producen una cantidad detectable de un CD38BP tal como se describe en el presente documento.
- La presente invención proporciona un inmunoconjugado que comprende un anticuerpo anti-CD38 de la presente  
20 invención unido a un agente citotóxico, un radioisótopo, o un fármaco. En una realización, el anticuerpo es un anticuerpo IgM monomérico unido a un agente citotóxico, un radioisótopo, o un fármaco.
- La presente invención proporciona una molécula biespecífica o multiespecífica que comprende un anticuerpo anti-  
25 CD38 de la presente invención y una especificidad de unión para una célula efectora humana. En una realización, la especificidad de unión para una célula efectora humana es una especificidad de unión para CD3, CD4, CD138, IL-15R, TNF- $\alpha$  unido a membrana o unido a receptor, un receptor Fc humano, o IL-15 unida a membrana o unida a receptor.
- La presente divulgación proporciona un anticuerpo anti-idiotípico que se une a un CD38BP tal como se describe en  
30 el presente documento.
- La presente divulgación proporciona el uso de un anticuerpo anti-idiotípico para detectar el nivel de anticuerpo monoclonal humano contra CD38 en una muestra.
- 35 A continuación, se presenta una lista de las realizaciones seleccionadas.
- Realización 1: Un anticuerpo que se une a CD38 humano codificado por los ácidos nucleicos de cadena ligera y de  
40 cadena pesada humana que comprenden las secuencias de nucleótidos en sus regiones variables, tal como se exponen en la SEQ ID NO: 1 y la SEQ ID NO: 6, respectivamente, o modificaciones conservativas de secuencia de las mismas.
- Realización 2: Un anticuerpo que se une a CD38 humano codificado por los ácidos nucleicos de cadena ligera y de  
45 cadena pesada humana que comprenden las secuencias de nucleótidos en sus regiones variables, tal como se exponen en la SEQ ID NO: 1 y la SEQ ID NO: 6, respectivamente.
- Realización 3: Un anticuerpo que se une específicamente a un epítipo de CD38, uniéndose dicho epítipo  
específicamente a un anticuerpo de acuerdo con la realización 2.
- Realización 4: Un anticuerpo que tiene sustancialmente las mismas características de unión específicas por la unión  
50 a CD38 humano que un anticuerpo de acuerdo con la realización 2.
- Realización 5: Un anticuerpo que comprende una CDR1 de  $V_L$  que consiste esencialmente en la SEQ ID NO: 3.
- Realización 6: Un anticuerpo que comprende una CDR2 de  $V_L$  que consiste esencialmente en la SEQ ID NO: 4.  
55 Realización 7: Un anticuerpo que comprende una CDR3 de  $V_L$  que consiste esencialmente en la SEQ ID NO: 5.
- Realización 8: Un anticuerpo de acuerdo con la realización 14, comprendiendo además dicho anticuerpo una CDR1  
60 de  $V_L$  que consiste esencialmente en la SEQ ID NO: 3.
- Realización 9: Un anticuerpo de acuerdo con la realización 14, comprendiendo además dicho anticuerpo una CDR2  
de  $V_L$  que consiste esencialmente en la SEQ ID NO: 4.
- Realización 10: Un anticuerpo de acuerdo con la realización 9, comprendiendo además dicho anticuerpo una CDR1  
65 de  $V_L$  que consiste esencialmente en la SEQ ID NO: 3.

## ES 2 716 874 T3

- Realización 11: Un anticuerpo que comprende una CDR1 de  $V_H$  que consiste esencialmente en la SEQ ID NO: 8.
- Realización 12: Un anticuerpo que comprende una CDR2 de  $V_H$  que consiste esencialmente en la SEQ ID NO: 9.
- 5 Realización 13: Un anticuerpo que comprende una CDR3 de  $V_H$  que consiste esencialmente en la SEQ ID NO: 10.
- Realización 14: Un anticuerpo de acuerdo con la realización 13, comprendiendo además dicho anticuerpo una CDR1 de  $V_H$  que consiste esencialmente en la SEQ ID NO: 8.
- 10 Realización 15: Un anticuerpo de acuerdo con la realización 13, comprendiendo además dicho anticuerpo una CDR2 de  $V_H$  que consiste esencialmente en la SEQ ID NO: 9.
- Realización 16: Un anticuerpo de acuerdo con la realización 15, comprendiendo además dicho anticuerpo una CDR1 de  $V_H$  que consiste esencialmente en la SEQ ID NO: 8.
- 15 Realización 17: Un anticuerpo que comprende
- (a) una primera región  $V_L$  que comprende tres CDR de  $V_L$ , que independientemente entre sí consisten esencialmente en las SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, y SEQ ID NO: 5; y
  - 20 (b) una primera región  $V_H$  que comprende tres CDR de  $V_H$ , que independientemente entre sí consisten esencialmente en las SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, y SEQ ID NO: 10.
- Realización 18: Un anticuerpo de acuerdo con la realización 17, en donde la región  $V_L$  y la región  $V_H$  están presentes en la misma cadena en el anticuerpo.
- 25 Realización 19: Un anticuerpo de acuerdo con la realización 18, en donde la región  $V_L$  y la región  $V_H$  están separadas por un enlazador flexible.
- Realización 20: Un anticuerpo de acuerdo con la realización 17, en donde la región  $V_L$  y la región  $V_H$  están presentes en cadenas separadas en el anticuerpo.
- 30 Realización 21: Un anticuerpo de acuerdo con la realización 20, en donde la región  $V_L$  y la región  $V_H$  están presentes en cadenas separadas en el anticuerpo en el contexto de una proteína plegada de inmunoglobulina.
- 35 Realización 22: Un anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 17 a 21, en donde la primera región  $V_L$  y la primera región  $V_H$  están orientadas de tal forma que las tres CDR en la región  $V_L$  y las tres CDR en la región  $V_H$  se asocian de manera cooperativa para contribuir en la unión selectiva y/o específica a un determinante antigénico en CD38 humano.
- 40 Realización 23: Un anticuerpo de acuerdo con la realización 22, en donde el anticuerpo comprende una segunda región  $V_L$  idéntica a la primera región  $V_L$  y una segunda región  $V_H$  idéntica a la primera región  $V_H$ , donde la segunda región  $V_L$  y la segunda región  $V_H$  se asocian de manera cooperativa para contribuir en la unión selectiva y/o específica a un determinante antigénico en CD38 humano.
- 45 Realización 24: Un anticuerpo que comprende una región  $V_L$  que es una variante funcional de la región  $V_L$  de un anticuerpo de la realización 2.
- Realización 25: Un anticuerpo de acuerdo con la realización 31, en donde la región  $V_L$  del anticuerpo consiste esencialmente en una secuencia que tiene al menos aproximadamente un 50%, al menos un 60%, al menos aproximadamente un 70%, al menos aproximadamente un 75%, al menos aproximadamente un 80%, al menos aproximadamente un 85%, al menos aproximadamente un 90%, o al menos aproximadamente un 95% de identidad de secuencia de aminoácidos con una secuencia según la SEQ ID NO: 2.
- 50 Realización 26: Un anticuerpo que comprende una región  $V_H$  que es una variante funcional de la región  $V_H$  de un anticuerpo de la realización 2.
- 55 Realización 27: Un anticuerpo de acuerdo con la realización 33, en donde la región  $V_H$  del anticuerpo consiste esencialmente en una secuencia que tiene al menos aproximadamente un 50%, al menos un 60%, al menos aproximadamente un 70%, al menos aproximadamente un 75%, al menos aproximadamente un 80%, al menos aproximadamente un 85%, al menos aproximadamente un 90%, o al menos aproximadamente un 95% de identidad de secuencia de aminoácidos con una secuencia según la SEQ ID NO: 7.
- 60 Realización 28: Un anticuerpo que comprende al menos una CDR que es una variante funcional de una CDR de un anticuerpo de la realización 2.
- 65 Realización 29: Un anticuerpo de acuerdo con la realización 28, en donde al menos una de las CDR del anticuerpo

## ES 2 716 874 T3

- 5 consiste esencialmente en una secuencia que tiene al menos aproximadamente un 50%, al menos un 60%, al menos aproximadamente un 70%, al menos aproximadamente un 75%, al menos aproximadamente un 80%, al menos aproximadamente un 85%, al menos aproximadamente un 90%, o al menos aproximadamente un 95% de identidad de secuencia de aminoácidos con una secuencia según la SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, o SEQ ID NO: 10.
- 10 Realización 30: Un anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 24 a 29, en donde el anticuerpo tiene al menos aproximadamente un 50%, al menos aproximadamente un 60%, al menos aproximadamente un 70%, al menos aproximadamente un 80%, al menos aproximadamente un 90%, o al menos aproximadamente un 95% de las características de unión a epítipo de un anticuerpo de la realización 2.
- 15 Realización 31: Un anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 24 a 29, en donde el anticuerpo tiene al menos aproximadamente un 50%, al menos aproximadamente un 60%, al menos aproximadamente un 70%, al menos aproximadamente un 80%, al menos aproximadamente un 90%, o al menos aproximadamente un 95% de la afinidad, avidez o especificidad de un anticuerpo de la realización 2.
- 20 Realización 32: Un anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 5 a 31, uniéndose dicho anticuerpo específicamente a CD38 humano.
- 25 Realización 33: Un anticuerpo de acuerdo con la realización 32, uniéndose dicho anticuerpo específicamente a un epítipo de CD38, uniéndose dicho epítipo específicamente a un anticuerpo de acuerdo con la realización 2.
- 30 Realización 34: Un anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 32 a 33, en donde el anticuerpo se une a CD38 humano con mayor afinidad que un anticuerpo de acuerdo con la realización 2.
- 35 Realización 35: Un anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 32 a 33, en donde el anticuerpo tiene sustancialmente las mismas características de unión a CD38 que un anticuerpo de acuerdo con la realización 2.
- 40 Realización 36: Un anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 32 a 33, en donde el anticuerpo está sustancialmente libre de otros anticuerpos de CD38.
- 45 Realización 37: Un anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 1 a 36, en donde el anticuerpo no es un agonista de CD38.
- 50 Realización 38: Un anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 37, en donde el anticuerpo no induce una proliferación significativa de las células mononucleares de sangre periférica.
- 55 Realización 39: Un anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 1 a 38, en donde el anticuerpo no induce la liberación significativa de IL-6 por monocitos humanos o células mononucleares de sangre periférica.
- 60 Realización 40: Un anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 1 a 39, en donde el anticuerpo no induce la liberación de IFN- $\gamma$  detectable por células T humanas o células mononucleares de sangre periférica.
- 65 Realización 41: Un anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 1 a 40, siendo dicho anticuerpo un anticuerpo humano.
- Realización 42: Un anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 1 a 40, siendo dicho anticuerpo un anticuerpo humanizado.
- Realización 43: Un anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 1 a 40, siendo dicho anticuerpo un anticuerpo quimérico.
- Realización 44: Un anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 1 a 43, siendo dicho anticuerpo un anticuerpo monoclonal.
- Realización 45: Un anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 1 a 44, caracterizado por que es un anticuerpo IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgD, IgA, IgE o IgM.
- Realización 46: Un anticuerpo de acuerdo con la realización 45, caracterizado por que es un anticuerpo de IgG1.
- Realización 47: Un anticuerpo de acuerdo con la realización 46, en donde el anticuerpo es un anticuerpo de IgG1,<sub>k</sub>.
- Realización 48: Un anticuerpo de acuerdo con la realización 45, caracterizado por que es un anticuerpo de IgM.
- Realización 49: Un anticuerpo de acuerdo con la realización 48, en donde el anticuerpo es un anticuerpo de IgM,<sub>k</sub>.

- Realización 50: Un anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 1 a 49, en donde el anticuerpo se glucosila en una célula eucariota.
- 5 Realización 51: Un anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 1 a 50, que es un fragmento de anticuerpo o un anticuerpo monocatenario.
- Realización 52: Un anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 1 a 51, que además comprende un enlazador quelante para acoplar un radioisótopo.
- 10 Realización 53: Un anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 1 a 52, que se encuentra en una forma sustancialmente aislada.
- Realización 54: Un ácido nucleico aislado que codifica un anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 1 a 52.
- 15 Realización 55: Un vector de expresión que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 1 a 52.
- Realización 56: Un vector de expresión que comprende una secuencia de nucleótidos de  $V_L$  de SEQ ID NO: 1, una secuencia de nucleótidos de  $V_H$  de SEQ ID NO: 6, o una secuencia de nucleótidos de  $V_L$  de SEQ ID NO: 1 y una secuencia de nucleótidos de  $V_H$  de SEQ ID NO: 6.
- 20 Realización 57: Un vector de expresión de acuerdo con la realización 56, que además comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la región constante de una cadena ligera, una cadena pesada o ambas cadenas ligera y pesada de un anticuerpo humano.
- 25 Realización 58: Un vector de expresión de acuerdo con la realización 57, en donde la secuencia de nucleótidos que codifica la región constante de una cadena ligera, una cadena pesada o las cadenas tanto pesada como ligera de un anticuerpo humano codifica un anticuerpo IgG1.
- 30 Realización 59: Un hibridoma que produce un anticuerpo anti-CD38 monoclonal humano codificado por los ácidos nucleicos de cadena ligera humana y de cadena pesada humana que comprenden secuencias de ácidos nucleicos en la región variable de cadena ligera tal como se exponen en la SEQ ID NO: 1, o modificaciones conservativas de secuencia de las mismas, y secuencias de nucleótidos en la región variable de cadena pesada tal como se expone en la SEQ ID NO: 6, o modificaciones conservativas de secuencia de las mismas.
- 35 Realización 60: Un hibridoma de acuerdo con la realización 59, en donde los ácidos nucleicos de cadena ligera humana comprenden una secuencia de nucleótidos tal como se expone en la SEQ ID NO: 1, y los ácidos nucleicos de cadena pesada humana comprenden una secuencia de nucleótidos tal como se expone en la SEQ ID NO: 6.
- 40 Realización 61: Un hibridoma que produce un anticuerpo monoclonal humano anti-CD38 que tiene regiones variables de cadena pesada y de cadena ligera humana que comprenden la secuencia de aminoácidos de cadena ligera humana tal como se expone en la SEQ ID NO: 2, o modificaciones conservativas de secuencia de las mismas, y la secuencia de aminoácidos de región variable de cadena ligera humana descrita en la SEQ ID NO: 7, o modificaciones conservativas de secuencia de las mismas.
- 45 Realización 62: Un hibridoma de acuerdo con la realización 61, en donde la región variable de la cadena ligera humana comprende una secuencia de aminoácidos tal como se expone en la SEQ ID NO: 2, y la región variable de la cadena pesada humana comprende una secuencia de aminoácidos tal como se expone en la SEQ ID NO: 7.
- 50 Realización 63: Un transfectoma que produce un anticuerpo monoclonal humano anti-CD38 codificado por los ácidos nucleicos de la región variable de la cadena ligera humana tal como se expone en la SEQ ID NO: 1, o modificaciones conservativas de secuencia de las mismas.
- 55 Realización 64: Un transfectoma de acuerdo con la realización 53, en donde el anticuerpo monoclonal humano anti-CD38 está codificado por los ácidos nucleicos de la región variable de la cadena ligera humana tal como se expone en la SEQ ID NO: 1 y los ácidos nucleicos de la cadena pesada humana tal como se expone en la SEQ ID NO: 6.
- Realización 65: Un transfectoma que produce un anticuerpo monoclonal humano anti-CD38 que tiene las regiones variables de la cadena ligera humana y de la cadena pesada humana que comprenden la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera humana tal como se expone en la SEQ ID NO:2, o modificaciones conservativas de secuencia de las mismas, y la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada humana tal como se expone en la SEQ ID NO:7, o modificaciones conservativas de secuencia de las mismas.
- 60 Realización 66: Un transfectoma de acuerdo con la realización 65, en donde la cadena ligera humana comprende la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera humana tal como se expone en la SEQ ID NO: 2,
- 65

y la cadena pesada humana comprende una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada humana tal como se expone en la SEQ ID NO: 7.

5 Realización 67: Una célula hospedadora eucariota o procariota que produce un anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 1 a 52.

Realización 68: Una célula hospedadora eucariota o procariota que contiene un vector de expresión de acuerdo con la realización 55.

10 Realización 69: Un animal no humano o una planta transgénica que comprende ácidos nucleicos que codifican una cadena pesada humana y una cadena ligera humana, en donde el animal o la planta produce una cantidad detectable de un anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 1 a 52.

15 Realización 70: Un inmunoconjugado que comprende un anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 1 a 51 unido a un agente citotóxico, un radioisótopo, o un fármaco.

20 Realización 71: Un inmunoconjugado que comprende un anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 1 a 45 o las realizaciones 48 a 49, en donde el anticuerpo es un anticuerpo IgM monomérico unido a un agente citotóxico, un radioisótopo, o un fármaco.

Realización 72: Una molécula biespecífica o multiespecífica que comprende un anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 1 a 52 y una especificidad de unión por una célula efectora humana.

25 Realización 73: Una molécula biespecífica o multiespecífica que comprende un anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 1 a 52 y una especificidad de unión por CD3, CD4, IL-15R, TNF- $\alpha$  unido a membrana o unido a receptor, un receptor Fc humano, o IL-15 unida a membrana o unida a receptor.

30 Realización 74: Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 1 a 53 o un inmunoconjugado de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 70 a 71 o una molécula biespecífica o multiespecífica de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 72 a 73 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

35 Realización 75: Una composición farmacéutica de acuerdo con la realización 74 que comprende uno o más agentes terapéuticos adicionales.

40 Realización 76: Un método *in vitro* para inhibir el crecimiento y/o la proliferación de una célula que expresa CD38, que comprende la administración de un anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 1 a 53, un inmunoconjugado de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 70 a 71, o una molécula biespecífica o multiespecífica de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 72 a 73, o una composición farmacéutica de acuerdo con la realización 74 o 75, o un vector de expresión de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 55 a 57, de tal forma que se inhibe el crecimiento y/o la proliferación de la célula.

45 Realización 77: Un anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 1 a 53, un inmunoconjugado de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 70 a 71, o una molécula biespecífica o multiespecífica de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 72 a 73, o una composición farmacéutica de acuerdo con la realización 74 o 75, o un vector de expresión de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 55 a 57, para su uso en un método de tratamiento de una enfermedad o trastorno que implica células que expresan CD38.

50 Realización 78: Un anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 1 a 53, un inmunoconjugado de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 70 a 71, o una molécula biespecífica o multiespecífica de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 72 a 73, o una composición farmacéutica de acuerdo con la realización 74 o 75, o un vector de expresión de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 55 a 57, para su uso en un método de prevención de una enfermedad o trastorno que implica células que expresan CD38 en un sujeto.

55 Realización 79: Un anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 1 a 53, un inmunoconjugado de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 70 a 71, o una molécula biespecífica o multiespecífica de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 72 a 73, o una composición farmacéutica de acuerdo con la realización 74 o 75, o un vector de expresión de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 55 a 57, para su uso de acuerdo con la realización 77 o la realización 78, en donde la enfermedad o trastorno es artritis reumatoide.

60 Realización 80: Un anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 1 a 53, un inmunoconjugado de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 70 a 71, o una molécula biespecífica o multiespecífica de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 72 a 73, o una composición farmacéutica de acuerdo con la realización 74 o 75, o un vector de expresión de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 55 a 57 para su uso de acuerdo con la realización 77 o la realización 78, en donde la enfermedad o trastorno es mieloma múltiple.

65

Realización 81: Un anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 1 a 53, un inmunoconjugado de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 70 a 71, o una molécula biespecífica o multiespecífica de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 72 a 73, o una composición farmacéutica de acuerdo con la realización 74 o 75, o un vector de expresión de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 55 a 57 para su uso de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 77 a 80, en donde el método comprende la administración de uno o más agentes terapéuticos adicionales al sujeto.

Realización 82: Un anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 1 a 53, un inmunoconjugado de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 70 a 71, o una molécula biespecífica o multiespecífica de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 72 a 73, o una composición farmacéutica de acuerdo con la realización 74 o 75, o un vector de expresión de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 55 a 57 para su uso de acuerdo con la realización 81, en donde los uno o más agentes terapéuticos adicionales se seleccionan entre un agente quimioterapéutico, un agente antiinflamatorio, o un agente inmunosupresor y/o inmunomodulador.

Realización 83: Un anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 1 a 53, un inmunoconjugado de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 70 a 71, o una molécula biespecífica o multiespecífica de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 72 a 73, o una composición farmacéutica de acuerdo con la realización 74 o 75, o un vector de expresión de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 55 a 57 para su uso de acuerdo con la realización 81, en donde los uno o más agentes terapéuticos se seleccionan entre el grupo que consiste en cisplatino, gefitinib, cetuximab, rituximab, bevacizumab, erlotinib, bortezomib, talidomida, pamidronato, ácido zoledrónico, clodronato, risendronato, ibandronato, etidronato, alendronato, tiludronato, trióxido de arsénico, lenalidomida, filgrastim, pegfilgrastim, sargramostim, ácido suberoilánilida hidroxámico, y SCIO-469.

Realización 84: Un método *in vitro* para detectar la presencia de un antígeno CD38, o de una célula que expresa CD38, en una muestra que comprende:

- a) poner en contacto la muestra con un anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 1 a 53 en condiciones que permiten la formación de un complejo entre el anticuerpo y CD38; y
- b) detectar la formación de un complejo.

Realización 85: Un kit para detectar la presencia del antígeno CD38, o de una célula que expresa CD38, en una muestra que comprende un anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 1 a 53.

Los términos "CD38" y "antígeno CD38" se usan de manera intercambiable en el presente documento, e incluyen cualquier variante, isocora y homólogos de especie de CD38 humano, que se expresan naturalmente por células o se expresan en células transfectadas con el gen de CD38. Los sinónimos de CD38, tal como se reconocen en la técnica, incluyen ADP ribosil ciclasa 1, cADPr hidrolasa 1, Cd38-rs1, ADP-ribosa hidrolasa 1 cíclica, I-19, antígeno NIM-R5.

El término péptido, con respecto tanto a péptidos de unión a CD38 y péptidos no de CD38 descritos en el presente documento incluye cualquier péptido adecuado y puede usarse de manera sinónima con los términos polipéptido y proteína, a menos que se afirme lo contrario o se contradiga a partir del contexto; siempre que el lector reconozca que cada tipo de molécula que contiene polímero de aminoácido respectivo pueda asociarse con diferencias significativas y de este modo formar realizaciones individuales (por ejemplo, un péptido, tal como un anticuerpo, que está compuesto de múltiples cadenas polipeptídicas, es significativamente diferente de, por ejemplo, un anticuerpo monocatenario, una inmunoadhesina peptídica, o un péptido inmunogénico monocatenario). Por lo tanto, el término péptido en el presente documento debe entenderse de manera general como referido a cualquier péptido adecuado de cualquier tamaño y composición adecuada (con respecto al número de aminoácidos y el número de cadenas asociadas en una molécula de proteína). Además, los péptidos en el contexto de los métodos y composiciones de la invención descrita en el presente documento pueden comprender residuos de aminoácidos de origen no natural y/o no L, a menos que se afirme lo contrario o se contradiga a partir del contexto.

Tal como se describirá con más detalle en el presente documento, a menos que se afirme lo contrario o se contradiga a partir del contexto, el término péptido (como si se describiese como realizaciones individuales de los términos polipéptido y/o proteína) también abarca moléculas peptídicas derivatizadas. En resumen, un derivado es un péptido en el que uno o más de los residuos de aminoácido del péptido se han modificado químicamente (por ejemplo, mediante alquilación, acilación, formación de éster, o formación de amida) o asociado con uno o más sustituyentes orgánicos no de aminoácido y/o atómicos o moleculares inorgánicos (por ejemplo, un grupo polietilenglicol (PEG), un sustituyente lipófilo (que puede unirse opcionalmente a la secuencia de aminoácidos del péptido mediante un residuo o grupo espaciador, tal como  $\beta$ -alanina, ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA), ácido L/D-glutámico, ácido succínico, y similares), un fluoróforo, biotina, un radionúclido, etc.) y también o como alternativa puede comprender residuos de aminoácidos no esenciales, de origen no natural y/o no L, a menos que se afirme lo contrario o se contradiga a partir del contexto (sin embargo, de nuevo debe reconocerse que dichos derivados pueden, por sí mismos, considerarse características independientes y la inclusión de dichas moléculas dentro del significado de péptido se efectúa por simple conveniencia para describir la presente divulgación en lugar de para

implicar cualquier tipo de equivalencia entre péptidos desnudos y dichos derivados). Los ejemplos no limitantes de dichos residuos de aminoácidos incluyen, por ejemplo, ácido 2-aminoadípico, ácido 3-aminoadípico, 3-alanina, ácido  $\beta$ -aminopropiónico, ácido 2-aminobutírico, ácido 4-aminobutírico, ácido 6-aminocaproico, ácido 2-aminoheptanoico, ácido 2-aminoisobutírico, ácido 3-aminoisobutírico, ácido 2-aminopimélico, ácido 2,4-diaminobutírico, desmosina, ácido 2,2'-diaminopimélico, ácido 2,3-diaminopropiónico, N-etilglicina, N-etilasparagina, hidroxilisina, alohidroxilisina, 3-hidroxiprolina, 4-hidroxiprolina, isodesmosina, aloisoleucina, N-metilglicina, N-metilisoleucina, 6-N-metilisina, N-metilvalina, norvalina, norleucina, ornitina, y aminoácidos halogenados con estatina.

Péptidos de unión a antígeno se refiere a cualquier péptido que se una específicamente a una parte de un antígeno dado en condiciones celulares y/o fisiológicas durante un tiempo suficiente para inducir, promover, potenciar, y/o de otro modo modular un efecto fisiológico asociado con el antígeno; para permitir la detección mediante ELISA, Western blot, u otra técnica de unión a proteínas similarmente adecuada descrita en el presente documento y/o conocida en la técnica y/o para que de otro modo se una de manera detectable después de un periodo de tiempo relevante (por ejemplo, al menos 15 minutos, al menos aproximadamente 30 minutos, al menos aproximadamente 45 minutos, al menos aproximadamente 1 hora, al menos aproximadamente 2 horas, al menos aproximadamente 4 horas, al menos aproximadamente 6 horas, al menos aproximadamente 12 horas, aproximadamente 1-24 horas, aproximadamente 1-36 horas, aproximadamente 1-48 horas, aproximadamente 1-72 horas, aproximadamente una semana, o más tiempo).

Un péptido de unión a CD38, o CD38BP, es un péptido de unión a antígeno que se une específicamente al antígeno CD38. La unión de un CD38BP a CD38 se puede medir mediante el uso del método descrito en el ejemplo 4.

El término inmunoglobulina se refiere a una clase de glucoproteínas estructuralmente relacionadas que consisten en dos pares de cadenas de polipéptido, un par de cadenas ligeras (L) de bajo peso molecular y un par de cadenas pesadas (H), las cuatro interconectadas por enlaces disulfuro. La estructura de las inmunoglobulinas se ha caracterizado exhaustivamente. Véase, por ejemplo, *Fundamental Immunology* Cap. 7 (Paul, W., ed., 2ª ed. Raven Press, N.Y. (1989)). En resumen, cada cadena pesada está formada típicamente de una región variable de cadena pesada (abreviada en el presente documento como  $V_H$ ) y una región constante de cadena pesada. La región constante de la cadena pesada está compuesta típicamente por tres dominios,  $C_{H1}$ ,  $C_{H2}$ , y  $C_{H3}$ . Cada cadena ligera está formada típicamente de una región variable de cadena ligera (abreviada en el presente documento como  $V_L$ ) y una región constante de cadena ligera. La región constante de cadena ligera está compuesta típicamente por un dominio,  $C_L$ . Las regiones  $V_H$  y  $V_L$  pueden subdividirse adicionalmente en regiones de hipervariabilidad (o regiones hipervariables que pueden ser hipervariables en secuencia y/o en forma de bucles estructuralmente definidos), también denominadas regiones determinantes de la complementariedad (CDR), entremezcladas con regiones que están más conservadas, denominadas regiones marco conservadas (FR).

Cada  $V_H$  y  $V_L$  está compuesta típicamente por tres CDR y cuatro FR, dispuestas desde el extremo amino al extremo carboxi en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4 (véase también Chothia y Lesk J. *Mol. Biol.* 196.901-917 (1987)). Normalmente, la numeración de residuos de aminoácido en esta región se lleva a cabo mediante el método descrito en Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ª ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991) (las expresiones, tales como numeración de residuos de dominio variable como en Kabat o de acuerdo con Kabat en el presente documento se refieren a este sistema de numeración para dominios variables de cadena pesada o dominios variables de cadena ligera). Usando este sistema de numeración, la secuencia lineal de aminoácidos real de un péptido puede contener menos o aminoácidos adicionales correspondientes a un acortamiento de, o a una inserción en, una FR o CDR del dominio variable. Por ejemplo, un dominio variable de cadena pesada puede incluir una sola inserción de aminoácido (residuo 52a de acuerdo con Kabat) después del residuo 52 de CDR2 de  $V_H$  y residuos insertados (por ejemplo, los residuos 82a, 82b, y 82c, etc. de acuerdo con Kabat) después del residuo 82 de la FR de cadena pesada. La numeración de residuos de Kabat puede determinarse para un anticuerpo dado mediante alineación en regiones de homología de la secuencia del anticuerpo con una secuencia numerada de Kabat "patrón".

El término anticuerpo (Ab) en el contexto de la presente invención se refiere a una molécula de inmunoglobulina, un fragmento de una molécula de inmunoglobulina, o un derivado de cualquiera de ambas, que tiene la capacidad para unirse específicamente a un antígeno en condiciones fisiológicas típicas durante periodos de tiempo significativos, tales como al menos aproximadamente 30 minutos, al menos aproximadamente 45 minutos, al menos aproximadamente una hora, al menos aproximadamente dos horas, al menos aproximadamente cuatro horas, al menos aproximadamente 8 horas, al menos aproximadamente 12 horas, aproximadamente 24 horas o más, aproximadamente 48 horas o más, aproximadamente 3, 4, 5, 6, 7 o más días, etc., o cualquier otro periodo relevante funcionalmente definido (tal como un tiempo suficiente para inducir, promover, potenciar, y/o modular una respuesta fisiológica asociada con la unión del anticuerpo al antígeno).

Las regiones variables de las cadenas pesada y ligera de la molécula de inmunoglobulina contienen un dominio de unión que interactúa con un antígeno. Las regiones constantes de los anticuerpos (Ab) pueden mediar la unión de la inmunoglobulina a tejidos o factores del hospedador, incluyendo diversas células del sistema inmunitario (tales como células efectoras) y el primer componente (C1q) del sistema de complemento clásico.

Un anticuerpo anti-CD38 puede ser un anticuerpo biespecífico, diacuerpo, o una molécula similar (véase, por

ejemplo, PNAS USA 90(14), 6444-8 (1993) para una descripción de los diacuerpos). De hecho, los anticuerpos biespecíficos, diacuerpos, y similares, proporcionados por la presente invención pueden unirse a cualquier diana adecuada además de a una parte de CD38.

5 Como se ha indicado anteriormente, el término anticuerpo en el presente documento, a menos que se afirme lo contrario o se contradiga claramente a partir del contexto, incluye fragmentos de un anticuerpo que retienen la capacidad para unirse específicamente a un antígeno. Se ha demostrado que la función de unión a antígeno de un anticuerpo puede llevarse a cabo mediante fragmentos de un anticuerpo de longitud completa. Los ejemplos de  
10 fragmentos de unión abarcados por el término "anticuerpo" incluyen (i) un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consiste en los dominios  $V_L$ ,  $V_H$ ,  $C_L$  y  $C_H1$ ; (ii) fragmentos  $F(ab)_2$  y  $F(ab')_2$ , fragmentos bivalentes que comprenden dos fragmentos Fab unidos por un puente disulfuro en la región bisagra; (iii) un fragmento Fd que consiste esencialmente en los dominios  $V_H$  y  $C_H1$ ; (iv) un fragmento Fv que consiste esencialmente en los dominios  $V_L$  y  $V_H$  de un solo brazo de un anticuerpo, (v) un fragmento dAb (Ward et al., Nature 341, 544-546 (1989)), que consiste esencialmente en un dominio  $V_H$ ; (vi) una región determinante de la complementariedad (CDR) aislada, y  
15 (vii) una combinación de dos o más CDR aisladas que pueden unirse opcionalmente mediante un enlazador sintético. Además, aunque los dos dominios del fragmento Fv,  $V_L$  y  $V_H$ , se codifican por genes separados, pueden unirse usando métodos recombinantes, mediante un enlazador peptídico que les permite producirse en forma de una sola cadena de proteína en la que el par de regiones  $V_L$  y  $V_H$  para formar moléculas monovalentes (conocidas como anticuerpos monocatenarios o Fv monocatenarios (scFv), véase, por ejemplo, Bird et al., Science 242, 423-426  
20 (1988) y Huston et al., PNAS USA 85, 5879-5883 (1988)). Los anticuerpos monocatenarios están abarcados dentro del término anticuerpo, a menos que se señale lo contrario o esté claramente indicado por el contexto. Otras formas de anticuerpos monocatenarios, tales como diacuerpos, están incluidas dentro del término anticuerpo. Aunque dichos fragmentos se incluyen generalmente dentro del significado de anticuerpo, de manera colectiva y cada uno independientemente son características únicas de la presente invención, que muestran propiedades y utilidades biológicas diferentes. Estos y otros fragmentos de anticuerpo útiles en el contexto de la presente invención se  
25 discuten con más detalle en el presente documento.

También debe entenderse que el término anticuerpo incluye también generalmente anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales (mAb), polipéptidos similares a anticuerpos, tales como anticuerpos quiméricos y  
30 anticuerpos humanizados, anticuerpos anti-idiotípicos para anticuerpos, y fragmentos de anticuerpo que retienen la capacidad para unirse específicamente al antígeno (fragmentos de unión a antígeno) proporcionados mediante cualquier técnica conocida, tal como escisión enzimática, síntesis peptídica, y técnicas recombinantes. Un anticuerpo generado puede poseer cualquier isotipo.

35 Las expresiones "anticuerpo anti-CD38" y "anticuerpo CD38" se usan de manera intercambiable en el presente documento. Un anticuerpo anti-CD38 o un anticuerpo de CD38 es un anticuerpo como se ha descrito anteriormente, que se une específicamente al antígeno CD38.

El término "epítopo" significa un determinante de proteína capaz de unirse específicamente a un anticuerpo. Los epítopos consisten normalmente en agrupamientos activos de superficie de moléculas, tales como aminoácidos o cadenas laterales de azúcar y normalmente tienen características tridimensionales estructurales específicas, así como características de carga específicas. Los epítopos conformacionales y no conformacionales se distinguen en que la unión de los primeros, pero no de los segundos, no se pierde en presencia de disolventes desnaturalizantes. El epítopo puede comprender residuos de aminoácidos implicados directamente en la unión (también denominado  
45 componente inmunodominante del epítopo) y otros residuos de aminoácidos, que no están implicados directamente en la unión, tal como residuos de aminoácidos que se bloquean de manera eficaz por el péptido de unión a antígeno específico (en otras palabras, el residuo de aminoácido se encuentra dentro de la huella del péptido de unión a antígeno específico).

50 La expresión "molécula biespecífica" pretende incluir cualquier agente, tal como una proteína, péptido, o complejo de proteína o péptido, que tiene dos especificidades de unión diferentes. Por ejemplo, la molécula puede unirse a, o interactuar con, (a) un antígeno de la superficie celular y (b) un receptor Fc en la superficie de una célula efectora. La expresión "molécula multiespecífica" pretende incluir cualquier agente, por ejemplo, una proteína, péptido, o complejo de proteína o péptido, que tiene más de dos especificidades de unión diferentes. Por ejemplo, la molécula  
55 puede unirse a, o interactuar con, (a) un antígeno de la superficie celular, (b) un receptor Fc sobre la superficie de una célula efectora, y (c) al menos otro componente distinto. Por consiguiente, la presente invención incluye, pero sin limitarse a, moléculas biespecíficas, trispecíficas, tetraespecíficas y otras moléculas multiespecíficas que se dirigen a CD38, y a otros antígenos o dianas de la superficie celular, tales como receptores Fc en células efectoras.

60 La expresión "anticuerpos biespecíficos" pretende incluir cualquier anticuerpo anti-CD38, que sea una molécula biespecífica. La expresión "anticuerpos biespecíficos" también incluye diacuerpos. Los diacuerpos son anticuerpos bivalentes, biespecíficos en los que los dominios  $V_H$  y  $V_L$  se expresan en una sola cadena polipeptídica, pero que usan un enlazante que es demasiado corto para permitir emparejamiento entre los dos dominios de la misma cadena, forzando de este modo a que los dominios se emparejen con dominios complementarios de otra cadena y creando dos sitios de unión a antígeno (véase, por ejemplo, Holliger, P. et al., PNAS USA 90, 6444-6448 (1993),  
65 Poljak, R.J. et al., Structure 2, 1121-1123 (1994)).

Tal como se usa en el presente documento, la expresión "célula efectora" se refiere a una célula inmunitaria que está implicada en la fase efectora de una respuesta inmunitaria, en contraposición a las fases cognitiva y de activación de una respuesta inmunitaria. Las células inmunitarias ejemplares incluyen una célula de origen mieloide o linfoide, por ejemplo, linfocitos (tales como células B y células T, incluyendo células T citolíticas (CTL)), células asesinas, linfocitos citolíticos naturales, macrófagos, monocitos, eosinófilos, neutrófilos, células polimorfonucleares, granulocitos, mastocitos, y basófilos. Algunas células efectoras expresan receptores Fc específicos y llevan a cabo funciones inmunitarias específicas. En algunas realizaciones, una célula efectora es capaz de inducir citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC), tal como un neutrófilo capaz de inducir ADCC. Por ejemplo, los monocitos, macrófagos, que expresan FcR están implicados en la eliminación específica de células diana y en la presentación de antígenos a otros componentes del sistema inmunitario, o en la unión a células que presentan antígenos. En algunas realizaciones, una célula efectora puede fagocitar un antígeno diana, una célula diana, o un microorganismo. La expresión de un FcR particular en una célula efectora puede estar regulada por factores humorales, tales como citocinas. Por ejemplo, se ha observado que la expresión de FcγRI está regulada positivamente por el interferón γ (IFN-γ) y/o G-CSF. Esta expresión potenciada aumenta la actividad citotóxica de células que portan FcγRI contra las dianas. Una célula efectora puede fagocitar o lisar un antígeno diana o una célula diana.

La expresión "anticuerpo humano", tal como se usa en el presente documento, pretende incluir anticuerpos que tienen regiones variables y constantes procedentes de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana. Los anticuerpos humanos de la presente invención pueden incluir residuos de aminoácidos no codificados por secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana (por ejemplo, mutaciones introducidas mediante mutagénesis aleatoria o de sitio dirigido *in vitro* o mediante mutación somática *in vivo*). Sin embargo, no se pretende que el término "anticuerpo humano", como se usa en el presente documento, incluya anticuerpos en los que las secuencias de la CDR derivadas de la línea germinal de otra especie de mamífero, tal como un ratón, se hayan injertado en secuencias marco humanas.

Tal como se usa en el presente documento, un anticuerpo humano se "deriva de" una secuencia de línea germinal particular si el anticuerpo se obtiene a partir de un sistema que usa secuencias de inmunoglobulina humanas, por ejemplo, mediante la inmunización de un ratón transgénico que porta genes de inmunoglobulina humanos o mediante la exploración de una genoteca de inmunoglobulina humana, y en donde el anticuerpo humano seleccionado es al menos un 90%, tal como al menos un 95%, por ejemplo, al menos un 96%, tal como al menos un 97%, por ejemplo, al menos un 98%, o tal como al menos un 99% idéntico en su secuencia de aminoácidos a la secuencia de aminoácidos codificada por el segmento génico de región variable VH o VL de línea germinal. Normalmente, un anticuerpo humano derivado a partir de un segmento génico de región variable VH o VL de línea germinal humana mostrará no más de 10 diferencias de aminoácidos, tal como no más de 5, por ejemplo, no más de 4, 3, 2, o 1 diferencia de aminoácidos respecto de la secuencia de aminoácidos codificada por el gen de inmunoglobulina de línea germinal.

Un anticuerpo quimérico es un anticuerpo que contiene una o más regiones de un anticuerpo y una o más regiones de otros uno o más anticuerpos derivados de otra especie. Un anticuerpo quimérico monovalente es un dímero (HL) formado por una cadena H quimérica asociada mediante puentes disulfuro a una cadena L quimérica. Un anticuerpo quimérico divalente es un tetrámero (H<sub>2</sub>L<sub>2</sub>) formado por dos dímeros de HL asociados mediante al menos un puente disulfuro. También puede producirse un anticuerpo quimérico polivalente, por ejemplo, empleando una región CH que se oligomeriza (por ejemplo, de una cadena H o cadena m de IgM). Normalmente, un anticuerpo quimérico se refiere a un anticuerpo en el que una porción de la cadena pesada y/o ligera es idéntica u homóloga a secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de una especie particular o que pertenecen a una clase o subclase particular de anticuerpos, mientras que la cadena (o las cadenas) restante es idéntica u homóloga a secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de otras especies o que pertenecen a otra clase o subclase de anticuerpos, así como fragmentos de dichos anticuerpos, en tanto que muestren la actividad biológica deseada (véase, por ejemplo, el documento US 4.816.567 y Morrison et al., PNAS USA 81, 6851-6855 (1984)). Los anticuerpos quiméricos se producen mediante procesos recombinantes bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Cabilly et al., PNAS USA 81, 3273-3277 (1984), Morrison et al., PNAS USA 81, 6851-6855 (1984), Boulianne et al., Nature 312, 643-646 (1984), EP125023, Neuberger et al., Nature 314, 268-270 (1985), EP171496, EP173494, WO86/01533, EP184187, Sahagan et al., J. Immunol. 137, 1066-1074 (1986), WO87/02671, Liu et al., PNAS USA 84, 3439-3443 (1987), Sun et al., PNAS USA 84, 214-218 (1987), Better et al., Science 240, 1041-1043 (1988) y Harlow et al., Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., (1988)).

Un anticuerpo humanizado es un anticuerpo que se deriva de una especie no humana, en el que determinados aminoácidos de los dominios marco conservados y constantes de las cadenas ligera y pesada se han mutado para evitar o suprimir una respuesta inmunitaria en seres humanos. Las formas humanizadas de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) son anticuerpos quiméricos que contienen una mínima parte de la secuencia derivada de inmunoglobulina no humana. En su mayoría, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que los residuos de una región hipervariable del receptor se reemplazan por residuos de una región hipervariable de una especie no humana (anticuerpo donante), tal como un ratón, rata, conejo o primate

no humano que tenga las características de unión deseadas, tales como especificidad, y afinidad. En algunos casos, los residuos de la región marco conservada (FR) de Fv de la inmunoglobulina humana se reemplazan por residuos correspondientes no humanos. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender residuos que no se encuentran en el anticuerpo receptor o en el anticuerpo donante. Estas modificaciones se efectúan para optimizar adicionalmente el rendimiento del anticuerpo. En general, un anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos de al menos uno, y típicamente dos, dominios variables, en los que todos o sustancialmente todos los bucles hipervariables se corresponden con aquellos de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las regiones FR son aquellas de una secuencia de inmunoglobulina humana. Un anticuerpo humanizado también comprenderá de manera opcional al menos una porción de la región constante de inmunoglobulina (Fc), típicamente aquella de una inmunoglobulina humana. Para detalles adicionales, véase Jones et al., Nature 321, 522-525 (1986), Riechmann et al., Nature 332, 323-329 (1988) y Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2, 593-596 (1992).

Las expresiones "anticuerpo monoclonal" o "composición de anticuerpo monoclonal", tal como se usan en el presente documento, se refieren a una preparación de moléculas de anticuerpo de una sola composición molecular. Una composición de anticuerpo monoclonal muestra una sola especificidad y afinidad de unión para un epítipo concreto. Por consiguiente, la expresión "anticuerpo monoclonal humano" se refiere a anticuerpos que muestran una sola especificidad de unión pero que tienen regiones variables y constantes procedentes de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana. Los anticuerpos monoclonales humanos pueden generarse por un hibridoma que incluye una célula B obtenida de un animal no humano transgénico o transcromosómico, tal como un ratón transgénico, que tiene un genoma que comprende un transgén de cadena pesada humana y un transgén de cadena ligera, fusionados a una célula inmortalizada. Puede emplearse la abreviatura mAb para referirse a un anticuerpo monoclonal.

La expresión "anticuerpo humano recombinante", tal como se usa en el presente documento, incluye todos los anticuerpos humanos que se preparan, expresan, crean o aíslan por medios recombinantes, tales como (a) anticuerpos aislados de un animal (tal como un ratón) que es transgénico o transcromosómico para genes de inmunoglobulina humanos o un hibridoma preparado a partir de los mismos (descrito en detalle en otras partes del presente documento), (b) anticuerpos aislados a partir de una célula hospedadora transformada para expresar el anticuerpo, tal como de un transfectoma, (c) anticuerpos aislados a partir de una biblioteca combinatoria de anticuerpos humanos recombinante, y (d) anticuerpos preparados, expresados, creados o aislados por cualquier otro medio que implique el corte y empalme de secuencias del gen de la inmunoglobulina humana en otras secuencias de ADN. Dichos anticuerpos humanos recombinantes tienen regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana. En determinadas realizaciones, sin embargo, dichos anticuerpos humanos recombinantes pueden someterse a mutagénesis *in vitro* (o, cuando se utiliza un animal transgénico para secuencias de Ig humanas, mutagénesis somática *in vivo*) y de esta manera, las secuencias de aminoácidos de las regiones de V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> de los anticuerpos recombinantes son secuencias que, aunque se derivan de y están relacionadas con secuencias de V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> de línea germinal humana, pueden no existir de manera natural en el repertorio de línea germinal de anticuerpo humano *in vivo*.

Tal como se usa en el presente documento, un "anticuerpo heterólogo" se define en relación al organismo transgénico no humano que produce dicho anticuerpo. Este término se refiere a un anticuerpo que tiene una secuencia de aminoácidos que corresponde a aquella hallada en un organismo que no consiste en el animal no humano, y generalmente de una especie distinta de aquella del animal transgénico no humano.

Un "anticuerpo aislado", tal como se usa en el presente documento, pretende hacer referencia a un anticuerpo que está sustancialmente libre de otros anticuerpos que tengan diferentes especificidades antigénicas (por ejemplo, un anticuerpo aislado que se une específicamente a CD38 está sustancialmente libre de anticuerpos que se unen a antígenos distintos de CD38). Un anticuerpo aislado que se une específicamente a un epítipo, isoforma o variante de CD38 humano puede, sin embargo, tener reactividad cruzada con otros antígenos relacionados, por ejemplo, de otras especies (tal como homólogos de especie de CD38). Además, un anticuerpo aislado puede estar sustancialmente exento de otros materiales celulares y/o químicos. En una realización de la presente invención, se combina en una composición bien definida una combinación de anticuerpos monoclonales "aislados" que tienen diferentes especificidades.

Tal como se usa en el presente documento, "unión específica" se refiere a un péptido de unión a antígeno, tal como un anticuerpo, que se une a un antígeno predeterminado. Normalmente, el péptido de unión a antígeno, tal como un anticuerpo, se une con una afinidad correspondiente a una K<sub>D</sub> de aproximadamente 10<sup>-7</sup> M o menor, tal como aproximadamente 10<sup>-8</sup> M o menor, tal como aproximadamente 10<sup>-9</sup> M o menor, aproximadamente 10<sup>-10</sup> M o menor, o aproximadamente 10<sup>-11</sup> M o incluso menor cuando se determina mediante tecnología de resonancia de plasmón superficial (SPR) en un instrumento BIAcore 3000 usando CD38 recombinante como ligando y el anticuerpo como analito. El péptido de unión a antígeno puede unirse al antígeno predeterminado con una afinidad correspondiente a una K<sub>D</sub> que es al menos diez veces menor, tal como al menos 100 veces menor, por ejemplo, al menos 1000 veces menor, tal como al menos 10.000 veces menor, por ejemplo, al menos 100.000 veces menor que su afinidad por la unión a un antígeno no específico (por ejemplo, BSA, caseína) distinto del antígeno predeterminado o un antígeno estrechamente relacionado. La cantidad con la que la afinidad es menor es dependiente de la K<sub>D</sub> del péptido de unión a antígeno, de tal forma que cuando la K<sub>D</sub> del péptido de unión a antígeno es muy baja (es decir, el péptido de

- unión a antígeno es altamente específico), la cantidad con la que la afinidad por el antígeno es menor que la afinidad por un antígeno no específico puede ser de al menos 10.000 veces. Las expresiones "un péptido de unión a antígeno que reconoce un antígeno" y "un péptido de unión a antígeno específico para un antígeno" se usan de manera indistinta en el presente documento con la expresión "un péptido de unión a antígeno que se une específicamente a un antígeno".
- 5 Del mismo modo, las expresiones "un anticuerpo que reconoce a un antígeno" y "un anticuerpo específico para un antígeno" se usan de manera indistinta en el presente documento con la expresión "un anticuerpo que se une específicamente a un antígeno".
- El término " $k_d$ " ( $s^{-1}$ ), tal como se usa en el presente documento, pretende hacer referencia a la constante de velocidad de disociación en equilibrio de una interacción anticuerpo-antígeno particular. Dicho valor también se cita como el valor de  $k_{off}$ .
- 10 El término " $k_a$ " ( $M^{-1} \times s^{-1}$ ), tal como se usa en el presente documento, pretende hacer referencia a la constante de velocidad de asociación en equilibrio de una interacción anticuerpo-antígeno particular.
- 15 El término " $K_D$ " (M), tal como se usa en el presente documento, pretende hacer referencia a la constante de disociación en equilibrio de una interacción anticuerpo-antígeno particular.
- El término " $K_A$ " ( $M^{-1}$ ), tal como se usa en el presente documento, pretende hacer referencia a la constante de asociación en equilibrio de una interacción anticuerpo-antígeno particular y se obtiene dividiendo la  $k_a$  entre la  $k_d$ .
- 20 Tal como se usa en el presente documento, "isotipo" se refiere a la clase de anticuerpo (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgD, IgA, IgE, o IgM) que se codifica por los genes de región constante de cadena pesada.
- 25 Tal como se usa en el presente documento, "intercambio de isotipo" se refiere al fenómeno mediante el cual la clase, o el isotipo, de un anticuerpo cambia de una clase de inmunoglobulina a otra de las clases de inmunoglobulina.
- Tal como se usa en el presente documento, "fenotipo no intercambiado" se refiere a la clase isotípica de cadena pesada que se produce cuando no se ha producido un intercambio de isotipo; el gen de CH que codifica el isotipo no intercambiado es típicamente el primer gen CH inmediatamente cadena abajo del gen VDJ reorganizado funcionalmente. El intercambio de isotipo se ha clasificado como intercambio de isotipo clásico o no clásico. El intercambio de isotipo clásico se produce por sucesos de recombinación que implican al menos una región de secuencia intercambiada en el transgén. El intercambio de isotipo no clásico puede producirse mediante, por ejemplo, recombinación de homólogos entre  $\sigma$  humano y  $\Sigma\mu$  humano (eliminación asociada a  $\delta$ ). Los mecanismos de intercambio no clásicos alternativos, tales como recombinación intertransgénica y/o intercromosómica, entre otros, pueden producirse y efectuar el intercambio de isotipo.
- 30 Tal como se usa en el presente documento, la expresión "secuencia de intercambio" se refiere a aquellas secuencias de ADN responsables de la recombinación de intercambio. Una secuencia "donante de intercambio", típicamente una región de intercambio m, se encontrará en 5' (es decir, cadena arriba) de la región de construcción que se va a eliminar durante la recombinación de intercambio. La región "acceptora de intercambio" se encontrará entre la región de construcción que se va a eliminar y la región constante de reemplazo (por ejemplo,  $\gamma$ ,  $\epsilon$ , etc.). Ya que no existe un sitio específico donde siempre se produzca la recombinación, la secuencia génica final no será típicamente predecible a partir de la construcción.
- 45 Tal como se usa en el presente documento, "patrón de glucosilación" se define como el patrón de unidades de carbohidrato que se unen covalentemente a una proteína, más específicamente, a una proteína inmunoglobulina (anticuerpo). Un patrón de glucosilación de un anticuerpo heterólogo puede caracterizarse como sustancialmente similar a los patrones de glucosilación que se producen de manera natural en los anticuerpos producidos por la especie del animal transgénico no humano, cuando un experto habitual en la materia reconozca el patrón de glucosilación del anticuerpo heterólogo como más similar a aquel patrón de glucosilación de la especie del animal transgénico no humano que a la especie de la que proceden los genes de CH del transgén.
- 50 La expresión "de origen natural", tal como se usa en el presente documento aplicada a un objeto, se refiere al hecho de que un objeto puede encontrarse en la naturaleza. Por ejemplo, una secuencia de polipéptido o de polinucleótido que está presente en un organismo (incluyendo virus) que puede aislarse de una fuente en la naturaleza y que no se ha modificado intencionalmente por la mano del hombre en un laboratorio es de origen natural.
- 55 El término "reorganizado" tal como se usa en el presente documento, se refiere a una configuración de un locus de cadena ligera o de cadena pesada de inmunoglobulina en donde se posiciona un segmento V inmediatamente adyacente a un segmento D-J o J en una conformación que codifica esencialmente un dominio  $V_H$  o  $V_L$  completo, respectivamente. Un locus génico de inmunoglobulina (anticuerpo) reorganizado puede identificarse mediante comparación con el ADN de la línea germinal; un locus reorganizado tendrá al menos un elemento de homología de heptámero/nonámero recombinado.
- 60 La expresión "no reorganizado" o "configuración de línea germinal", tal como se usa en el presente documento en
- 65

referencia a un segmento V, se refiere a la configuración en donde el segmento V no se recombina para que se encuentre inmediatamente adyacente a un segmento D o J.

La expresión "molécula de ácido nucleico", tal como se usa en el presente documento, pretende incluir moléculas de ADN y moléculas de ARN. Una molécula de ácido nucleico puede ser monocatenaria o bicatenaria, pero es preferentemente ADN bicatenario. Los ácidos nucleicos pueden estar presentes en células completas, en un lisado de células, o en forma parcialmente purificada o sustancialmente pura. Un ácido nucleico está "aislado" o "se purifica sustancialmente" cuando se purifica respecto de otros componentes celulares u otros contaminantes, tales como otros ácidos nucleicos o proteínas celulares, mediante técnicas convencionales, incluyendo tratamiento alcalino/SDS, bandedo de CsCl, cromatografía en columna, electroforesis en gel de agarosa y otros bien conocidos en la técnica. Véase, F. Ausubel et al., ed. Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing y Wiley InterScience, Nueva York (1987).

Un ácido nucleico se "une operativamente" cuando se coloca dentro de una relación funcional con otra secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, un promotor o potenciador se une operablemente a una secuencia codificante si afecta a la transcripción de la secuencia. Con respecto a la transcripción de secuencias reguladoras, unido operablemente significa que las secuencias de ADN que se unen son contiguas y, cuando sea necesario unir dos regiones codificantes de proteína, contiguas y en fase de lectura. Para las secuencias intercambiadas, unido operablemente indica que las secuencias son capaces de efectuar recombinación de intercambio.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión "inhibe el crecimiento" (por ejemplo, cuando se hace referencia a células) pretende incluir cualquier reducción medible en el crecimiento celular cuando se ponen en contacto con un CD38BP, tal como un anticuerpo anti-CD38, en comparación con el crecimiento de las mismas células que no estén en contacto con un CD38BP, tal como un anticuerpo anti-CD38, por ejemplo, una inhibición del crecimiento de un cultivo celular de al menos aproximadamente un 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 99%, o 100%.

Tal como se usa en el presente documento, las expresiones "inhibe la unión" y "bloquea la unión" (por ejemplo, cuando hace referencia a la inhibición/bloqueo de la unión de un compañero de unión de CD38 a CD38) se usan de manera intercambiable y abarcan la inhibición/bloqueo parcial y completa. La inhibición/bloqueo de la unión de un compañero de unión de CD38 puede reducir o alterar el nivel normal o el tipo de señalización celular que se produce cuando un compañero de unión de CD38 se une a CD38 sin inhibición o bloqueo. Por inhibición y bloqueo también se pretende incluir cualquier reducción medible en la afinidad de unión de un compañero de unión de CD38 a CD38 cuando se pone en contacto con un CD38BP, tal como un anticuerpo anti-CD38, en comparación con el ligando que no se encuentra en contacto con un CD38BP, tal como un anticuerpo anti-CD38, por ejemplo, un bloqueo de la unión de un compañero de unión de CD38 a CD38 en al menos aproximadamente un 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 99%, o 100%.

"Célula diana" pretende hacer referencia a cualquier célula no deseada en un sujeto (por ejemplo, un ser humano o un animal) que puede usarse como diana por una composición (que comprende, por ejemplo, un CD38BP, tal como un anticuerpo monoclonal humano anti-CD38, y/o una molécula biespecífica o multiespecífica dirigida contra CD38) de la presente invención. En algunas realizaciones, la célula diana es una célula que expresa o que sobreexpresa CD38. Las células que expresan CD38 incluyen típicamente células hematopoyéticas, tales como timocitos medulares, células T y B activadas, el 80% de las células NK y monocitos en reposo, linfoblastos del centro germinal del nódulo linfático, células B plasmáticas y algunas células intrafoliculares, células dendríticas, células normales de la médula ósea, en particular las células precursoras, el 50-80% de las células de la sangre del cordón umbilical, eritrocitos y plaquetas. CD38 también puede expresarse por células no hematopoyéticas, tales como células intraepiteliales y linfocitos de la lámina propia en el intestino, por las células de Purkinje y por los ovillos neurofibrilares en el cerebro, por las células epiteliales en la próstata, por las células  $\beta$  en el páncreas, por los osteoclastos en el hueso, por las células retinales en el ojo, y por el sarcolemma del músculo liso y estriado. En las células malignas, CD38 se expresa en una serie de enfermedades hematológicas malignas, incluyendo, pero sin restringirse a, mieloma múltiple, leucemia de células plasmáticas primaria o secundaria, leucemia linfocítica crónica de células B, leucemia linfocítica aguda de células B, macroglobulinemia de Waldenström, amiloidosis sistémica primaria, linfoma de células del manto, leucemia pro-linfocítica/mielocítica, leucemia mieloide aguda, leucemia mieloide crónica, linfoma folicular, y leucemia de células NK.

El término "vector", tal como se usa en el presente documento, pretende hacer referencia a una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico al que se ha unido. Un tipo de vector es un "plásmido", que se refiere a un bucle de ADN bicatenario en el que pueden ligarse segmentos de ADN adicionales. Otro tipo de vector es un vector viral, en el que pueden ligarse segmentos de ADN adicionales en el genoma viral. Determinados vectores son capaces de replicarse de manera autónoma en una célula hospedadora en la que se introducen (por ejemplo, vectores bacterianos que tienen un origen de replicación bacteriano y vectores episómicos de mamífero). Otros vectores (tales como vectores de mamífero no episómicos) pueden integrarse en el genoma de una célula hospedadora tras la introducción en la célula hospedadora, y de este modo se replican junto con el genoma del hospedador. Además, determinados vectores son capaces de dirigir la expresión de genes a los que se unen operativamente. Dichos vectores se citan en el presente documento como "vectores de expresión recombinante" (o

5 simplemente, "vectores de expresión"). En general, los vectores de expresión de utilidad en las técnicas de ADN recombinante están a menudo en forma de plásmidos. En la presente memoria descriptiva, "plásmido" y "vector" pueden usarse de manera intercambiable ya que el plásmido es la forma de vector usada más comúnmente. Sin embargo, la presente invención pretende incluir dichas otras formas de vectores de expresión, tales como vectores víricos (tales como retrovirus defectuosos para la replicación, adenovirus y virus adenoasociados), que cumplen funciones equivalentes.

10 La expresión "célula hospedadora recombinante" (o simplemente "célula hospedadora"), tal como se usa en el presente documento, pretende hacer referencia a una célula en la que se ha introducido un vector de expresión recombinante. Debe entenderse que dichos términos pretenden hacer referencia no solo a la célula objeto particular, sino a la progenie de dicha célula. Debido a que determinadas modificaciones pueden producirse en generaciones posteriores debido a mutaciones o influencias ambientales, dicha descendencia puede, de hecho, no ser idéntica a la célula parental, pero aun así se incluyen dentro del alcance de la expresión "célula hospedadora" tal como se usa en el presente documento. Las células hospedadoras recombinantes incluyen, por ejemplo, transfectomas, tales como células CHO, células NS/0, y células linfocíticas.

20 La expresión "secuencia reguladora" pretende incluir promotores, potenciadores y otros elementos de control de la expresión (por ejemplo, señales de poliadenilación) que controlan la transcripción o la traducción de los genes de la cadena de anticuerpo. Dichas secuencias reguladoras se describen, por ejemplo, en Goeddel, Gene Expression Technology. Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, Calif. (1990). Los expertos en la materia apreciarán que el diseño del vector de expresión, incluyendo la selección de secuencias reguladoras, puede depender de factores tales como la selección de la célula hospedadora que se va a transformar, el nivel de expresión de proteína deseado, etc. Los ejemplos de secuencias reguladoras para la expresión en células hospedadoras de mamífero incluyen elementos víricos que dirigen altos niveles de expresión de proteína en células de mamífero, tales como promotores y/o potenciadores derivados de citomegalovirus (CMV), virus de simio 40 (SV40), adenovirus, (por ejemplo, el promotor tardío principal de adenovirus (AdMLP) y poliovirus. Como alternativa, pueden usarse secuencias reguladoras no víricas, tales como el promotor de ubiquitina o el promotor de  $\beta$ -globina.

30 Tal como se usa en el presente documento, el término "sujeto" incluye cualquier animal humano o no humano. La expresión "animal no humano" incluye a todos los vertebrados, por ejemplo, mamíferos y no mamíferos, tales como primates no humanos, ovejas, perros, vacas, pollos, anfibios, reptiles, etc.

35 Las diversas formas del término "transfección" pretenden abarcar una gran variedad de técnicas usadas comúnmente para la introducción de ADN exógeno en una célula hospedadora procarionte o eucariota, por ejemplo, electroporación, precipitación con fosfato de calcio, transfección con DEAE-dextrano, transfección con lipofectina y similares.

40 El término "transfectoma", tal como se usa en el presente documento, incluye células eucariotas recombinantes que expresan el anticuerpo, tales como células CHO, células NS/0, células HEK293, células vegetales, u hongos, incluyendo células de levadura.

45 La expresión "animal no humano" incluye a todos los vertebrados, por ejemplo, mamíferos y no mamíferos, tales como primates no humanos, ovejas, perros, vacas, pollos, anfibios, reptiles, etc. La expresión "animal no humano" incluye a todos los vertebrados, por ejemplo, mamíferos y no mamíferos, tales como primates no humanos, ovejas, perros, vacas, pollos, anfibios, reptiles, etc. La expresión "animal no humano" incluye a todos los vertebrados, por ejemplo, mamíferos y no mamíferos, tales como primates no humanos, ovejas, perros, vacas, pollos, anfibios, reptiles, etc.

50 La expresión "animal transgénico no humano" se refiere a un animal no humano que tiene un genoma que comprende uno o más transgenes o transcromosomas de cadena pesada y/o ligera humana (integrados o no integrados en el ADN genómico natural del animal) y que es capaz de expresar anticuerpos completamente humanos. Por ejemplo, un ratón transgénico puede tener un transgén de cadena ligera humana y un transgén de cadena pesada humana o un transcromosoma de cadena pesada humana, de tal forma que el ratón produce anticuerpos anti-CD38 humanos cuando se inmuniza con antígeno CD38 y/o células que expresan CD38. El transgén de cadena pesada humana puede integrarse en el ADN cromosómico del ratón, como es el caso de los ratones transgénicos, por ejemplo, ratones HuMAb, tales como ratones HCo7 o HCo12, o el transgén de cadena pesada humana puede mantenerse de manera extracromosómica, como es el caso de los ratones transcromosómicos KM, tal como se describe en el documento WO02/43478. Dichos ratones transgénicos y transcromosómicos (citados de manera colectiva en el presente documento como "ratones transgénicos") son capaces de producir múltiples isotipos de anticuerpos monoclonales humanos para un antígeno dado (tales como IgG, IgA, IgM, IgD y/o IgE) sometiéndose a recombinación V-D-J e intercambio de isotipo. Un animal transgénico no humano también puede usarse para la producción de anticuerpos contra un antígeno específico mediante la introducción de genes que codifican dicho anticuerpo específico, por ejemplo, uniendo operativamente los genes para un gen que se expresa en la leche del animal.

65 El término especificidad en el presente documento se refiere a la capacidad de un péptido de unión a CD38, tal

como un anticuerpo anti-CD38, para reconocer un epítipo en CD38, a la vez que tiene una reactividad baja o no detectable con otras partes de CD38 (incluyendo otros epítipos que se unen a otros CD38BP, tales como anticuerpos anti-CD38). La especificidad puede determinarse de manera relativa mediante ensayos de competición, tal como se describen en el presente documento. La especificidad puede determinarse de manera más particular mediante cualquiera de las técnicas de identificación/caracterización de epítipos descritas en el presente documento o sus equivalentes conocidos en la técnica.

Un anticuerpo específico para un determinante antigénico específico puede, sin embargo, tener reactividad cruzada con otras biomoléculas que puedan estar presentes en algunos contextos biológicos con CD38. Más típicamente, un CD38BP, tal como un anticuerpo anti-CD38, puede tener reactividad cruzada con homólogos de CD38 de otras especies. En cualquiera de los dos o en ambos contextos, dichos anticuerpos con reactividad cruzada son típicamente selectivos para CD38 humano con respecto a factores de estructura y/o ambientales relevantes.

El término selectividad en el presente documento se refiere a la unión preferente de un CD38BP, tal como un anticuerpo anti-CD38, a una región, diana o péptido particular; típicamente, una región o epítipo en CD38, en contraposición con una o más moléculas biológicas, estructuras, células, tejidos, etc. diferentes. En una realización, un CD38BP, tal como un anticuerpo anti-CD38 de la presente invención, es selectivo para una parte de CD38 en el contexto de las células de cáncer de colon (es decir, el anticuerpo anti-CD38 se unirá de manera selectiva a la parte de CD38 frente a otros componentes de una célula de cáncer de colon).

Los anticuerpos de CD38 de la presente invención se usan y proporcionan típicamente al menos en una forma sustancialmente aislada. Una molécula sustancialmente aislada es una molécula que es la especie predominante en la composición en donde se encuentra con respecto a la clase de moléculas a la que pertenece (es decir, forma al menos aproximadamente un 50% del tipo de molécula en la composición y típicamente formará al menos aproximadamente un 70%, al menos aproximadamente un 80%, al menos aproximadamente un 85%, al menos aproximadamente un 90%, al menos aproximadamente un 95%, o más de la especie de molécula, por ejemplo, péptido, en la composición (por ejemplo, la composición mostrará al menos aproximadamente un 98%, 98%, o 99% de homogeneidad para el CD38BP en el contexto de todas las especies peptídicas presentes).

Una molécula aislada se refiere a una molécula que no está asociada con niveles significativos (tales como más de aproximadamente un 1%, más de aproximadamente un 2%, más de aproximadamente un 3%, o más de aproximadamente un 5%) de cualquier factor fisiológico extraño y no deseable, tal como biomoléculas no de unión a CD38 (o moléculas de unión a CD38 que puedan interferir con la unión y/o actividad de un anticuerpo de CD38 de la presente invención) contenida en una célula o animal en el que se produce el anticuerpo. Una molécula aislada se refiere también a cualquier molécula que ha pasado a través de dicha etapa de pureza debido a la intervención humana (ya sea automática, manual, o ambas). En muchas de las diversas composiciones proporcionadas por la presente invención, tal como en una composición que comprende uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables, un anticuerpo de CD38 puede estar presente en cantidades relativamente pequeñas en cuanto al número de especies moleculares totales en la composición (por ejemplo, en el caso de una composición que comprende una gran cantidad de un vehículo, estabilizante, y/o conservante farmacéuticamente aceptable). En algunos casos, pueden incluirse péptidos adicionales, tales como BSSA, en dicha composición con un anticuerpo previamente purificado. Sin embargo, siempre que dichos constituyentes adicionales de la composición sean aceptables para la aplicación prevista del anticuerpo, dicha composición puede seguir describiéndose como formada por un anticuerpo aislado.

Los anticuerpos de CD38 de la presente invención están típicamente sustancialmente libres de otros CD38BP, tales como CD38BP que tengan diferentes especificidades antigénicas. Sin embargo, la presente invención también proporciona una composición que comprende una serie de anticuerpos CD38BP con diferentes especificidades y características (por ejemplo, la presente invención proporciona un "cóctel" de CD38BP que tienen diferentes características de especificidad y/o selectividad).

"Tratamiento" significa la administración de una cantidad eficaz de un compuesto terapéuticamente activo de la presente invención con el fin de aliviar, mejorar, o erradicar (curar) los síntomas o patologías.

El anticuerpo de CD38 de la invención puede comprender una región  $V_L$  que consiste esencialmente en la secuencia de SEQ ID NO: 2.

El anticuerpo de CD38 de la invención puede comprender una región  $V_H$  que consiste esencialmente en la secuencia de SEQ ID NO: 6.

El anticuerpo de CD38 de la invención puede comprender una región  $V_L$  que consiste esencialmente en la secuencia de SEQ ID NO: 2 y una región  $V_H$  que consiste esencialmente en la secuencia de SEQ ID NO: 6.

El anticuerpo de CD38 de la invención puede comprender una CDR1 de  $V_L$  que consiste esencialmente en la secuencia de SEQ ID NO: 3.

El anticuerpo de CD38 de la invención puede comprender una CDR2 de  $V_L$  que consiste esencialmente en la secuencia de SEQ ID NO: 4.

5 El anticuerpo de CD38 de la invención puede comprender una CDR3 de  $V_L$  que consiste esencialmente en la secuencia de SEQ ID NO: 5.

El anticuerpo de CD38 de la invención puede comprender una CDR1 de  $V_H$  que consiste esencialmente en la secuencia de SEQ ID NO: 8.

10 El anticuerpo de CD38 de la invención puede comprender una CDR2 de  $V_H$  que consiste esencialmente en la secuencia de SEQ ID NO: 9.

El anticuerpo de CD38 de la invención puede comprender una CDR3 de  $V_H$  que consiste esencialmente en la secuencia de SEQ ID NO: 10.

15 El anticuerpo de CD38 de la invención puede comprender las CDR de  $V_L$  (CDR1, CDR2 y CDR3 de  $V_L$ ) que consisten esencialmente en las SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 y la SEQ ID NO: 5, respectivamente.

20 El anticuerpo de CD38 de la invención puede comprender las CDR de  $V_H$  (CDR1, CDR2 y CDR3 de  $V_H$ ) que consisten esencialmente en las SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 y la SEQ ID NO: 10, respectivamente.

El anticuerpo de CD38 de la invención puede comprender

25 (a) tres CDR de  $V_L$ , que consisten esencialmente de manera independiente en las SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 y la SEQ ID NO: 5 en estrecha proximidad entre sí (por ejemplo, cerca del espaciado de las CDR de  $V_L$  en un anticuerpo anti-CD38 de tipo silvestre) en el CD38BP y

(b) tres CDR de  $V_H$  que consisten esencialmente de manera independiente en las SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 y la SEQ ID NO: 10 en estrecha proximidad entre sí (por ejemplo, cerca del espaciado de las CDR de  $V_H$  en un anticuerpo anti-CD38 de tipo silvestre) en el CD38BP.

30 Los anticuerpos de CD38 de la invención pueden comprender un enlazador flexible posicionado entre la región  $V_L$  y la región  $V_H$  del anticuerpo de CD38. Las regiones  $V_L$  y  $V_H$  se pueden presentar en cadenas separadas en el contexto de una proteína plegada de inmunoglobulina y se orientan de tal forma que las CDR1, CDR2 y CDR3 de  $V_L$  y las CDR1, CDR2 y CDR3 de  $V_H$  se asocian de manera cooperativa para contribuir en la unión selectiva y/o específica a un determinante antigénico en CD38. El anticuerpo de CD38 puede comprender dos conjuntos de dominios variables (conjuntos de dominios  $V_L$  y  $V_H$  asociados en cadenas separadas asociadas), de tal forma que el anticuerpo de CD38 comprende dos sitios de unión a determinante antigénico idénticos.

35 Se espera que cualquiera de dichos CD38BP y anticuerpos descritos en este epígrafe, al menos en parte, tengan una especificidad, selectividad, y otras características de epítipo similares que un anticuerpo que tiene la región  $V_L$  que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 2 y una región  $V_H$  que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 7, y, por consiguiente, pueden ser útiles en el tratamiento del mieloma múltiple.

En el presente documento se describen:

- 45
- una región  $V_L$  que consiste esencialmente en la secuencia de SEQ ID NO: 12;
  - un CD38BP que comprende una región  $V_H$  que consiste esencialmente en la secuencia de SEQ ID NO: 17;
  - un CD38BP que comprende una región  $V_L$  que consiste esencialmente en la secuencia de SEQ ID NO: 12 y una región  $V_H$  que consiste esencialmente en la secuencia de SEQ ID NO: 17;
- 50
- un CD38BP que comprende una CDR1 de  $V_L$  que consiste esencialmente en la secuencia de SEQ ID NO: 13;
  - un CD38BP que comprende una CDR2 de  $V_L$  que consiste esencialmente en la secuencia de SEQ ID NO: 14;
  - un CD38BP que comprende una CDR3 de  $V_L$  que consiste esencialmente en la secuencia de SEQ ID NO: 15;
  - un CD38BP que comprende una CDR1 de  $V_H$  que consiste esencialmente en la secuencia de SEQ ID NO: 18;
  - un CD38BP que comprende una CDR2 de  $V_H$  que consiste esencialmente en la secuencia de SEQ ID NO: 19;
- 55
- un CD38BP que comprende una CDR3 de  $V_H$  que consiste esencialmente en la secuencia de SEQ ID NO: 20.
  - un CD38BP que comprende las CDR de  $V_L$  (CDR1, CDR2 y CDR3 de  $V_L$ ) que consisten esencialmente en las SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14 y la SEQ ID NO: 15, respectivamente;
  - un CD38BP que comprende las CDR de  $V_H$  (CDR1, CDR2 y CDR3 de  $V_H$ ) que consisten esencialmente en las SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19 y la SEQ ID NO: 20, respectivamente;
- 60
- un CD38BP que comprende

(a) tres CDR de  $V_L$ , que consisten esencialmente de manera independiente en las SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14 y la SEQ ID NO: 15 en estrecha proximidad entre sí (por ejemplo, cerca del espaciado de las CDR de  $V_L$  en un anticuerpo anti-CD38 de tipo silvestre) en el CD38BP y

65 (b) tres CDR de  $V_H$  que consisten esencialmente de manera independiente en las SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19 y la SEQ ID NO: 20 en estrecha proximidad entre sí (por ejemplo, cerca del espaciado de las CDR de  $V_H$  en

un anticuerpo anti-CD38 de tipo silvestre) en el CD38BP;

- un CD38BP que comprende un enlazador flexible situado entre la región  $V_L$  y la región  $V_H$  del CD38BP;
- un CD38BP, en donde las regiones  $V_L$  y  $V_H$  se presentan en cadenas separadas en el contexto de una proteína plegada de inmunoglobulina y se orientan de tal forma que las CDR1, CDR2 y CDR3 de  $V_L$  y las CDR1, CDR2 y CDR3 de  $V_H$  se asocian de manera cooperativa para contribuir en la unión selectiva y/o específica a un determinante antigénico en CD38;
- un CD38BP que comprende dos conjuntos de dominios variables (conjuntos de dominios  $V_L$  y  $V_H$  asociados en cadenas separadas asociadas), de tal forma que el CD38BP comprende dos sitios de unión a determinante antigénico idénticos.

Se espera que cualquiera de dichos CD38BP descritos en este epígrafe, al menos en parte, tengan una especificidad, selectividad, y otras características de epitopo similares que un anticuerpo que tiene la región  $V_L$  que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 12 y una región  $V_H$  que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 17, y, por consiguiente, pueden ser útiles en el tratamiento del mieloma múltiple.

En el presente documento se describen:

- un CD38BP que comprende una región  $V_L$  que consiste esencialmente en la secuencia de SEQ ID NO: 22;
- un CD38BP que comprende una región  $V_H$  que consiste esencialmente en la secuencia de SEQ ID NO: 27;
- un CD38BP que comprende una región  $V_L$  que consiste esencialmente en la secuencia de SEQ ID NO: 22 y una región  $V_H$  que consiste esencialmente en la secuencia de SEQ ID NO: 27;
- un CD38BP que comprende una CDR1 de  $V_L$  que consiste esencialmente en la secuencia de SEQ ID NO: 23;
- un CD38BP que comprende una CDR2 de  $V_L$  que consiste esencialmente en la secuencia de SEQ ID NO: 24;
- un CD38BP que comprende una CDR3 de  $V_L$  que consiste esencialmente en la secuencia de SEQ ID NO: 25;
- un CD38BP que comprende una CDR1 de  $V_H$  que consiste esencialmente en la secuencia de SEQ ID NO: 28;
- un CD38BP que comprende una CDR2 de  $V_H$  que consiste esencialmente en la secuencia de SEQ ID NO: 29;
- un CD38BP que comprende una CDR3 de  $V_H$  que consiste esencialmente en la secuencia de SEQ ID NO: 30;
- un CD38BP que comprende las CDR de  $V_L$  (CDR1, CDR2 y CDR3 de  $V_L$ ) que consisten esencialmente en las SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24 y la SEQ ID NO: 25, respectivamente;
- un CD38BP que comprende las CDR de  $V_H$  (CDR1, CDR2 y CDR3 de  $V_H$ ) que consisten esencialmente en las SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29 y la SEQ ID NO: 30, respectivamente;
- un CD38BP que comprende

(a) tres CDR de  $V_L$ , que consisten esencialmente de manera independiente en las SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24 y la SEQ ID NO: 25 en estrecha proximidad entre sí (por ejemplo, cerca del espaciado de las CDR de  $V_L$  en un anticuerpo anti-CD38 de tipo silvestre) en el CD38BP y

(b) tres CDR de  $V_H$  que consisten esencialmente de manera independiente en las SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29 y la SEQ ID NO: 30 en estrecha proximidad entre sí (por ejemplo, cerca del espaciado de las CDR de  $V_H$  en un anticuerpo anti-CD38 de tipo silvestre) en el CD38BP;

- un CD38BP que comprende un enlazador flexible posicionado entre la región  $V_L$  y la región  $V_H$  del CD38BP.

En otra realización adicional, la presente invención proporciona:

- un CD38BP, en donde las regiones  $V_L$  y  $V_H$  se presentan en cadenas separadas en el contexto de una proteína plegada de inmunoglobulina y se orientan de tal forma que las CDR1, CDR2 y CDR3 de  $V_L$  y las CDR1, CDR2 y CDR3 de  $V_H$  se asocian de manera cooperativa para contribuir en la unión selectiva y/o específica a un determinante antigénico en CD38.

En otra realización adicional, la presente invención proporciona:

- un CD38BP que comprende dos conjuntos de dominios variables (conjuntos de dominios  $V_L$  y  $V_H$  asociados en cadenas separadas asociadas), de tal forma que el CD38BP comprende dos sitios de unión a determinante antigénico idénticos.

Se espera que cualquiera de dichos CD38BP descritos en este epígrafe, al menos en parte, tengan una especificidad, selectividad, y otras características de epitopo similares que un anticuerpo que tiene la región  $V_L$  que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 22 y una región  $V_H$  que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 27, y, por consiguiente, pueden ser útiles en el tratamiento del mieloma múltiple.

Los anticuerpos anti-CD38 de la presente invención pueden comprender:

- una CDR1 de  $V_L$  que consiste esencialmente en una secuencia de acuerdo con la SEQ ID NO: 3, en donde el residuo N-terminal y/o uno, dos, o tres de los residuos de aminoácidos C-terminales están ausentes;
- un CD38BP que comprende una CDR2 de  $V_L$  que consiste esencialmente en una secuencia de acuerdo con la SEQ ID NO: 4, en donde uno o dos de los residuos N-terminales y/o uno, dos, o tres de los residuos C-terminales

están ausentes;

- una CDR3 de  $V_L$  que consiste esencialmente en una secuencia de acuerdo con la SEQ ID NO: 5, en donde el residuo N-terminal y/o uno, dos, tres, o cuatro de los residuos C-terminales están ausentes;
- una CDR1 de  $V_H$  que consiste esencialmente en una secuencia de acuerdo con la SEQ ID NO: 8, en donde uno, dos, tres, o cuatro de los residuos N-terminales y/o uno, dos, tres, o cuatro residuos C-terminales están ausentes;
- una CDR2 de  $V_H$  que consiste esencialmente en una secuencia de acuerdo con la SEQ ID NO: 9, en donde uno, dos, tres, cuatro, o cinco de los aminoácidos N-terminales del mismo y/o uno, dos, tres, cuatro, cinco, o seis de los aminoácidos C-terminales del mismo están ausentes;
- una CDR3 de  $V_H$  que consiste esencialmente en una secuencia de acuerdo con la SEQ ID NO: 10, en donde los uno, dos o tres residuos de aminoácidos N-terminales y/o los uno, dos, tres o cuatro residuos de aminoácidos C-terminales están ausentes.

También se describen CD38BP en donde estas secuencias de CDR "truncadas" se combinan entre sí y/o con otras secuencias de CDR descritas en el presente documento.

Los anticuerpos anti-CD38 de la presente invención pueden comprender

- (a) tres CDR de  $V_L$ , que consisten esencialmente de manera independiente en las SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 y la SEQ ID NO: 5 en estrecha proximidad entre sí en el anticuerpo (por ejemplo, cerca del espaciado de las CDR de  $V_L$  en un anticuerpo anti-CD38 de tipo silvestre) y
- (b) tres CDR de  $V_H$  que consisten esencialmente de manera independiente en las SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 y la SEQ ID NO: 10 en estrecha proximidad entre sí (por ejemplo, cerca del espaciado de las CDR de  $V_H$  en un anticuerpo anti-CD38 de tipo silvestre) en el anticuerpo.

Los anticuerpos pueden comprender un enlazador flexible posicionado entre la región  $V_L$  y la región  $V_H$ .

Las regiones  $V_L$  y  $V_H$  se pueden presentar en cadenas separadas en el contexto de una proteína plegada de inmunoglobulina y se orientan de tal forma que las CDR1, CDR2 y CDR3 de  $V_L$  y las CDR1, CDR2 y CDR3 de  $V_H$  se asocian de manera cooperativa para contribuir en la unión selectiva y/o específica a un determinante antigénico en CD38. El anticuerpo puede comprender dos conjuntos de dominios variables (conjuntos de dominios  $V_L$  y  $V_H$  asociados en cadenas separadas asociadas), de tal forma que el CD38BP comprende dos sitios de unión a determinante antigénico idénticos.

También se describe en el presente documento CD38BP que comprenden variantes funcionales de la región  $V_L$ , la región  $V_H$ , o una o más CDR de los anticuerpos de los ejemplos. Una variante funcional de una  $V_L$ ,  $V_H$ , o CDR usada en el contexto de un CD38BP aún permite al CD38BP retener al menos una proporción sustancial (al menos aproximadamente el 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% o más) de la afinidad/avidez y/o especificidad/selectividad del anticuerpo parental y en algunos casos, dicho CD38BP puede asociarse con una mayor afinidad, selectividad, y/o especificidad que el anticuerpo parental.

En una realización, en el presente documento se proporciona un anticuerpo de unión a CD38 humano que comprende una  $V_L$  variante que consiste esencialmente en una secuencia que tiene al menos aproximadamente un 50%, tal como al menos un 60%, por ejemplo, al menos aproximadamente un 70%, tal como al menos aproximadamente un 75%, por ejemplo, al menos aproximadamente un 80%, tal como al menos aproximadamente un 85%, por ejemplo, al menos aproximadamente un 90%, tal como al menos aproximadamente un 95% de identidad de secuencia de aminoácidos con una secuencia según las SEQ ID NO: 2, en donde el anticuerpo tiene al menos una proporción sustancial (al menos aproximadamente un 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% o más) de las características de unión a epítipo de un anticuerpo que tiene una secuencia de  $V_L$  variante de la SEQ ID NO: 2, tal como un anticuerpo que tenga una secuencia de  $V_L$  de SEQ ID NO: 2 y una secuencia de  $V_H$  de SEQ ID NO: 7.

En una realización, en el presente documento se proporciona un anticuerpo que se une al CD38 humano que comprende una CDR1 de  $V_L$  variante que consiste esencialmente en una secuencia que tiene al menos aproximadamente un 50%, tal como al menos un 60%, por ejemplo, al menos aproximadamente un 70%, tal como al menos aproximadamente un 75%, por ejemplo, al menos aproximadamente un 80%, tal como al menos aproximadamente un 85%, por ejemplo, al menos aproximadamente un 90%, tal como al menos aproximadamente un 95% de identidad de secuencia de aminoácidos con una secuencia según la SEQ ID NO: 3, en donde el anticuerpo tiene al menos una proporción sustancial (al menos aproximadamente un 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% o más) de las características de unión a epítipo de un anticuerpo que tiene una secuencia de CDR1 de  $V_L$  variante de la SEQ ID NO: 3, tal como un anticuerpo que tenga una secuencia de  $V_L$  de SEQ ID NO: 2, tal como un anticuerpo que tenga una secuencia de  $V_L$  de SEQ ID NO: 2 y una secuencia de  $V_H$  de SEQ ID NO: 7.

En una realización, en el presente documento se proporciona un anticuerpo que se une a la CD38 humana que comprende una CDR2 de  $V_L$  variante que consiste esencialmente en una secuencia que tiene al menos aproximadamente un 50%, tal como al menos un 60%, por ejemplo, al menos aproximadamente un 70%, tal como al menos aproximadamente un 75%, por ejemplo, al menos aproximadamente un 80%, tal como al menos aproximadamente un 85%, por ejemplo, al menos aproximadamente un 90%, tal como al menos aproximadamente un 95% de identidad de secuencia de aminoácidos con una secuencia según la SEQ ID NO: 4, en donde el

anticuerpo tiene al menos una proporción sustancial (al menos aproximadamente un 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% o más) de las características de unión a epítipo de un anticuerpo que tiene una secuencia de CDR2 de  $V_L$  variante de la SEQ ID NO: 4, tal como un anticuerpo que tenga una secuencia de  $V_L$  de SEQ ID NO: 2, tal como un anticuerpo que tenga una secuencia de  $V_L$  de SEQ ID NO: 2 y una secuencia de  $V_H$  de SEQ ID NO: 7.

5 En una realización, en el presente documento se proporciona un anticuerpo que se une al CD38 humano que comprende una CDR3 de  $V_L$  variante que consiste esencialmente en una secuencia que tiene al menos aproximadamente un 50%, tal como al menos un 60%, por ejemplo, al menos aproximadamente un 70%, tal como al menos aproximadamente un 75%, por ejemplo, al menos aproximadamente un 80%, tal como al menos aproximadamente un 85%, por ejemplo, al menos aproximadamente un 90%, tal como al menos aproximadamente un 95% de identidad de secuencia de aminoácidos con una secuencia según la SEQ ID NO: 5, en donde el anticuerpo tiene al menos una proporción sustancial (al menos aproximadamente un 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% o más) de las características de unión a epítipo de un anticuerpo que tiene una secuencia de CDR3 de  $V_L$  variante de la SEQ ID NO: 5, tal como un anticuerpo que tenga una secuencia de  $V_L$  de SEQ ID NO: 2, tal como un anticuerpo que tenga una secuencia de  $V_L$  de SEQ ID NO: 2 y una secuencia de  $V_H$  de SEQ ID NO: 7.

20 En una realización, en el presente documento se proporciona un anticuerpo que se une a CD38 humano que comprende una  $V_H$  variante que consiste esencialmente en una secuencia que tiene al menos aproximadamente un 50%, tal como al menos un 60%, por ejemplo, al menos aproximadamente un 70%, tal como al menos aproximadamente un 75%, por ejemplo, al menos aproximadamente un 80%, tal como al menos aproximadamente un 85%, por ejemplo, al menos aproximadamente un 90%, tal como al menos aproximadamente un 95% de identidad de secuencia de aminoácidos con una secuencia según la SEQ ID NO: 7, en donde el anticuerpo tiene al menos una proporción sustancial (al menos aproximadamente un 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% o más) de las características de unión a epítipo de un anticuerpo que tiene una secuencia de  $V_H$  variante de la SEQ ID NO: 7, tal como un anticuerpo que tenga una secuencia de  $V_H$  de SEQ ID NO: 7 y una secuencia de  $V_L$  de SEQ ID NO: 2.

30 En una realización, en el presente documento se proporciona un anticuerpo que se une al CD38 humano que comprende una CDR1 de  $V_H$  variante que consiste esencialmente en una secuencia que tiene al menos aproximadamente un 50%, tal como al menos un 60%, por ejemplo, al menos aproximadamente un 70%, tal como al menos aproximadamente un 75%, por ejemplo, al menos aproximadamente un 80%, tal como al menos aproximadamente un 85%, por ejemplo, al menos aproximadamente un 90%, tal como al menos aproximadamente un 95% de identidad de secuencia de aminoácidos con una secuencia según la SEQ ID NO: 8, en donde el anticuerpo tiene al menos una proporción sustancial (al menos aproximadamente un 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% o más) de las características de unión a epítipo de un anticuerpo que tiene una secuencia de CDR1 de  $V_H$  variante de la SEQ ID NO: 8, respectivamente, tal como un anticuerpo que tenga una secuencia de  $V_H$  de SEQ ID NO: 7, tal como un anticuerpo que tenga una secuencia de  $V_H$  de SEQ ID NO: 7 y una secuencia de  $V_L$  de SEQ ID NO: 2.

40 En una realización, en el presente documento se proporciona un anticuerpo que se une al CD38 humano que comprende una CDR2 de  $V_H$  variante que consiste esencialmente en una secuencia que tiene al menos aproximadamente un 50%, tal como al menos un 60%, por ejemplo, al menos aproximadamente un 70%, tal como al menos aproximadamente un 75%, por ejemplo, al menos aproximadamente un 80%, tal como al menos aproximadamente un 85%, por ejemplo, al menos aproximadamente un 90%, tal como al menos aproximadamente un 95% de identidad de secuencia de aminoácidos con una secuencia según la SEQ ID NO: 9, en donde el anticuerpo tiene al menos una proporción sustancial (al menos aproximadamente un 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% o más) de las características de unión a epítipo de un anticuerpo que tiene una secuencia de CDR2 de  $V_H$  variante de la SEQ ID NO: 9, tal como un anticuerpo que tenga una secuencia de  $V_H$  de SEQ ID NO: 7, tal como un anticuerpo que tenga una secuencia de  $V_H$  de SEQ ID NO: 7 y una secuencia de  $V_L$  de SEQ ID NO: 2.

50 En una realización, en el presente documento se proporciona un anticuerpo que se une a la CD38 humana que comprende una CDR3 de  $V_H$  variante que consiste esencialmente en una secuencia que tiene al menos aproximadamente un 50%, tal como al menos un 60%, por ejemplo, al menos aproximadamente un 70%, tal como al menos aproximadamente un 75%, por ejemplo, al menos aproximadamente un 80%, tal como al menos aproximadamente un 85%, por ejemplo, al menos aproximadamente un 90%, tal como al menos aproximadamente un 95% de identidad de secuencia de aminoácidos con una secuencia según la SEQ ID NO: 10, en donde el anticuerpo tiene al menos una proporción sustancial (al menos aproximadamente un 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% o más) de las características de unión a epítipo de un anticuerpo que tiene una secuencia de CDR3 de  $V_H$  variante de la SEQ ID NO: 10, tal como un anticuerpo que tenga una secuencia de  $V_H$  de SEQ ID NO: 7, tal como un anticuerpo que tenga una secuencia de  $V_H$  de SEQ ID NO: 7 y una secuencia de  $V_L$  de SEQ ID NO: 2.

60 El porcentaje de identidad entre dos secuencias es una función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias (es decir, % de homología =  $n.^{\circ}$  de posiciones idénticas/ $n.^{\circ}$  total de posiciones  $\times$  100), teniendo en cuenta el número de huecos, y la longitud de cada hueco, que han de ser introducidos para un alineamiento óptimo de las dos secuencias. La comparación de secuencias y la determinación del porcentaje de identidad entre dos secuencias debe llevarse a cabo usando un algoritmo matemático, tal como se describe en los ejemplos no limitantes más adelante.

El porcentaje de identidad entre dos secuencias de nucleótidos puede determinarse usando el programa GAP en el paquete informático GCG (disponible a través de <http://www.gcg.com>), usando una matriz NWSgapdna.CMP y una ponderación de hueco de 40, 50, 60, 70, u 80 y una ponderación de longitud de 1, 2, 3, 4, 5, o 6. El porcentaje de identidad entre dos secuencias de nucleótidos o de aminoácidos también puede determinarse usando el algoritmo de E. Meyers y W. Miller, *Comput. Appl. Biosci* 4, 11-17 (1988)) que se ha incorporado en el programa ALIGN (versión 2.0), usando una tabla de ponderación de residuos PAM120, una penalización por longitud de hueco de 12 y una penalización por hueco de 4. Además, el porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos puede determinarse usando el algoritmo de Neddleman y Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48, 444-453 (1970) que se ha incorporado en el programa GAP en el paquete informático GCG (disponible en <http://www.gcg.com>), usando una matriz Blossum 62 o una matriz PAM250, y una ponderación por hueco de 16, 14, 12, 10, 8, 6, u 4 y una ponderación de longitud de 1, 2, 3, 4, 5, o 6.

Las secuencias de ácido nucleico y de proteína tal como se describen en el presente documento pueden usarse además como "secuencia de búsqueda" para efectuar una búsqueda frente a bases de datos públicas para, por ejemplo, identificar secuencias relacionadas. Dichas búsquedas pueden efectuarse usando los programas NBLAST y XBLAST (versión 2.0) de Altschul et al., *J. Mol. Biol.* 215, 403-10 (1990). Las búsquedas BLAST de nucleótidos pueden efectuarse con el programa NBLAST, puntuación = 100, longitud de palabra = 12 para obtener secuencias de nucleótidos homólogas a las moléculas de ácido nucleico de la presente invención. Las búsquedas BLAST de proteínas pueden efectuarse con el programa XBLAST, puntuación = 50, longitud de palabra = 3 para obtener secuencias de aminoácidos homólogas a las moléculas de proteína de la presente invención. Para obtener alineaciones con huecos con fines de comparación, puede usarse Gapped BLAST tal como se describe en Altschul et al., *Nucleic Acids Res.* 25(17), 3389-3402 (1997). Cuando se utilizan los programas BLAST y Gapped BLAST, pueden usarse los parámetros por defecto de los respectivos programas (por ejemplo, XBLAST y NBLAST). Véase <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.

La secuencia de las variantes de CDR puede diferir de la secuencia de la CDR de las secuencias del anticuerpo parental principalmente mediante sustituciones conservativas; por ejemplo, al menos aproximadamente un 35%, aproximadamente un 50% o más, aproximadamente un 60% o más, aproximadamente un 70% o más, aproximadamente un 75% o más, aproximadamente un 80% o más, aproximadamente un 85% o más, aproximadamente un 90% o más, aproximadamente un 95% o más (por ejemplo, aproximadamente un 65-99%) de las sustituciones en la variante son reemplazos conservativos de residuos de aminoácidos. En el contexto de la presente invención, las sustituciones conservativas pueden definirse por sustituciones dentro de las clases de aminoácidos reflejadas en una o más de las tres tablas siguientes:

**Clases de residuo de aminoácido para sustituciones conservativas**

residuos ácidos	Asp y Glu
residuos básicos	Lys, Arg, e His
residuos hidrófilos no cargados	Ser, Thr, Asn, y Gln
residuos no cargados alifáticos	Gly, Ala, Val, Leu, e Ile
residuos no cargados no polares	Cys, Met, y Pro
residuos aromáticos	Phe, Tyr, y Trp

**Clases alternativas de sustitución conservativa de residuos de aminoácidos**

1	Ala (A)	Ser (S)	Thr (T)
2	Asp (D)	Glu (E)	
3	Asp (N)	Gln (Q)	
4	Arg (R)	Lys (K)	
5	Ile (I)	Leu (L)	Met (M)
6	Phe (F)	Tyr (Y)	Trp (W)

40

**Clasificaciones alternativas físicas y funcionales de residuos de aminoácidos**

residuos que contienen grupo alcohol	S y T
residuos alifáticos	I, L, V, y M
residuos asociados a cicloalqueno	F, H, W, e Y

residuos hidrófobos	A, C, F, G, H, I, L, M, R, T, V, W, e Y
residuos cargados negativamente	D y E
residuos polares	C, D, E, H, K, N, Q, R, S, y T
residuos cargados positivamente	H, K, y R
residuos pequeños	A, C, D, G, N, P, S, T, y V
residuos muy pequeños	A, G, y S
residuos implicados en la formación de puentes	A, C, D, E, G, H, K, N, Q, R, S, P, y T
residuos flexibles	Q, T, K, S, G, P, D, E, y R

Las agrupaciones de sustituciones más conservativas incluyen: valina-leucina-isoleucina, fenilalanina-tirosina, lisina-arginina, alanina-valina, y asparagina-glutamina. También pueden formularse grupos de aminoácidos adicionales usando los principios descritos en, por ejemplo, Creighton (1984) *Proteins: Structure and Molecular Properties* (2ª Ed. 1993), W.H. Freeman and Company.

En una realización, la conservación en términos de propiedades hidropáticas/hidrófilas y de peso/tamaño del residuo se retiene también sustancialmente en una CDR variante en comparación con una CDR de un anticuerpo de los ejemplos (por ejemplo, la clase de peso, la puntuación hidropática, o ambas secuencias se mantienen en al menos aproximadamente un 50%, al menos aproximadamente un 60%, al menos aproximadamente un 70%, al menos aproximadamente un 75%, al menos aproximadamente un 80%, al menos aproximadamente un 85%, al menos aproximadamente un 90%, al menos aproximadamente un 95%, o más (por ejemplo, aproximadamente un 65-99%)). Por ejemplo, las sustituciones conservativas de residuos pueden basarse también o como alternativa en el reemplazo de grupos de conservación basados en peso de base fuerte o débil, que se conocen en la técnica.

La retención de residuos similares puede medirse también o como alternativa mediante una puntuación de similitud, determinada mediante el uso de un programa BLAST (por ejemplo, BLAST 2.2.8 disponible a través del NCBI). Las variantes adecuadas muestran típicamente al menos aproximadamente un 45%, tal como al menos aproximadamente un 55%, al menos aproximadamente un 65%, al menos aproximadamente un 75%, al menos aproximadamente un 85%, al menos aproximadamente un 90%, al menos aproximadamente un 95%, o más (por ejemplo, aproximadamente un 70-99%) de similitud con el péptido parental.

También pueden efectuarse cambios de función sustanciales seleccionando sustituciones que sean menos conservativas que aquellas mostradas en los grupos definidos anteriormente. Por ejemplo, pueden efectuarse sustituciones no conservativas que afectan de manera más significativa a la estructura del péptido en la zona de alteración, por ejemplo, la estructura alfa-helicoidal o beta-laminar; la carga o hidrofobicidad de la molécula en el sitio diana; o el volumen de la cadena lateral. Las sustituciones que se espera generalmente que produzcan los cambios mayores en las propiedades del péptido son aquellas donde 1) un residuo hidrófilo, por ejemplo, serilo o treonilo, se sustituye por (o con) un residuo hidrófobo, por ejemplo, leucilo, isoleucilo, fenilalanilo, valilo, o alanilo; 2) una cisteína o prolina se sustituye por (o con) cualquier otro residuo; 3) un residuo que tiene una cadena lateral electropositiva, por ejemplo, lisilo, arginilo, o histidilo, se sustituye por (o con) un residuo electronegativo, por ejemplo, glutamilo o aspartilo; o 4) un residuo que tiene una cadena lateral voluminosa, por ejemplo, fenilalanina, se sustituye por (o con) un residuo que no tiene una cadena lateral, por ejemplo, glicina. Por consiguiente, pueden introducirse estas y otras sustituciones no conservativas en variantes peptídicas en donde se desean cambios significativos en la función/estructura y evitarse dichos cambios cuando se desea la conservación de la estructura/función.

Una forma conveniente para generar variantes de sustitución es la maduración por afinidad usando fagos usando métodos conocidos en la técnica. Para identificar sitios candidatos para la modificación de región hipervariable, también puede llevarse a cabo la mutagénesis de barrido de alanina para identificar residuos de la región hipervariable que contribuyen significativamente a la unión al antígeno. Como alternativa o adicionalmente, puede ser beneficioso analizar una estructura cristalina del complejo antígeno-anticuerpo para identificar puntos de contacto entre el anticuerpo y el antígeno. Dichos residuos de contacto y residuos vecinos son probablemente candidatos adecuados para la sustitución.

Cuando se efectúan inserciones en la región variable para generar un anticuerpo variante, debe tomarse en consideración el intervalo típico de longitudes de la región hipervariable en cuestión en los anticuerpos conocidos. Por ejemplo, para la primera región hipervariable de un dominio variable de cadena ligera, pueden introducirse inserciones en la secuencia de CDR1 de  $V_L$  de un anticuerpo parental mientras que se retiene un tamaño sustancialmente similar y por lo tanto esperado, que, según Kabat et al., anteriormente citado, por ejemplo, tiene típicamente un promedio de aproximadamente 9-20 (por ejemplo, aproximadamente 10-17) residuos. De un modo similar, la CDR2 de  $V_L$  tiene típicamente una longitud promedio de aproximadamente 5-10 residuos; la CDR3 de  $V_L$  tiene típicamente una longitud promedio de aproximadamente 7-20 residuos; la CDR1 de  $V_H$  tiene típicamente una longitud promedio de aproximadamente 10-15 residuos; la CDR2 de  $V_H$  tiene típicamente una longitud promedio de

aproximadamente 15-20 residuos; y la CDR3 de V<sub>H</sub> tiene típicamente una longitud promedio de aproximadamente 6-30 residuos (por ejemplo, 3-25 residuos). Las inserciones en la región V<sub>H</sub> se efectúan típicamente en la CDR3 de V<sub>H</sub> y típicamente próximas al extremo C-terminal del dominio, tal como aproximadamente en los residuos 97-102 de la CDR3 de V<sub>H</sub> parental (por ejemplo, adyacentes a, o C-terminales en secuencia con, el residuo número 100 de la secuencia de CDR3 de V<sub>H</sub> parental) usando el alineamiento y numeración según se describe en Kabat. Las variantes de anticuerpo con residuos de aminoácidos insertados en una región hipervariable de las mismas pueden prepararse de manera aleatoria, especialmente cuando la afinidad de unión de partida del anticuerpo parental por el antígeno diana es tal que puedan explorarse fácilmente las variantes de anticuerpo producidas de manera aleatoria. Por ejemplo, la presentación en fagos proporciona un método conveniente para explorar dichas variantes aleatorias.

En el diseño, construcción, y/o evaluación de variantes de CDR debe prestarse atención al hecho de que las regiones CDR pueden alterarse para posibilitar una mejor unión al epítipo. Las CDR de anticuerpo funcionan típicamente proporcionando una superficie complementaria, posiblemente incluyendo dedos que pueden sobresalir sobre la superficie de proteína del antígeno, u otra estructura de parátipo, sobre la que se ajusta el epítipo. Si el epítipo no se ajusta de manera estrecha, el anticuerpo puede no ofrecer la mejor afinidad. Sin embargo, como en el caso de los epítopos, a menudo existen unos pocos residuos clave en una estructura de parátipo que proporcionan la mayor parte de esta unión. Por lo tanto, las secuencias de CDR pueden variar en longitud y composición de manera significativa entre anticuerpos para el mismo péptido. El experto en la materia reconocerá que determinados residuos, tales como los residuos de tirosina (por ejemplo, en el contexto de secuencias de CDR3 de V<sub>H</sub>), que normalmente son contribuyentes significativos a dicha unión al epítipo, se mantienen típicamente en una variante de CDR.

Las variantes de la región CDR también pueden aumentar los contactos de aminoácidos entre el antígeno y un anticuerpo variante, en comparación con los contactos de aminoácidos entre el antígeno y el anticuerpo parental, mediante la introducción de uno o más residuos de aminoácidos (ya sea mediante sustitución o inserción) que aumentan los contactos o las interacciones energéticamente favorables entre uno o más residuos de aminoácidos presentes en un antígeno y uno o más residuos de aminoácidos presentes en el anticuerpo. Las interacciones de aminoácidos de interés pueden seleccionarse entre interacciones de enlace de hidrógeno, interacciones de van der Waals, e interacciones iónicas.

Los expertos en la materia serán conscientes de los principios adicionales en el diseño y la selección de CD38BP que comprenden variantes de CDR de los anticuerpos de la presente invención.

En el contexto de las variantes de CDR, que son variantes de las CDR de los anticuerpos de los ejemplos, en particular en el contexto de variantes de CDR en los anticuerpos anti-CD38 o los fragmentos de los mismos, los residuos necesarios para soportar y/u orientar las estructuras de bucles estructurales de las CDR pueden típicamente retenerse; los residuos que se encuentran a aproximadamente 10 angstrom de un bucle estructural de CDR (pero opcionalmente solo los residuos en esta zona que también poseen una superficie accesible a disolvente acuoso de aproximadamente 5 angstrom<sup>2</sup> o más) pueden típicamente permanecer no modificados o modificarse únicamente mediante sustituciones de residuos de aminoácidos conservativas; y/o la secuencia de aminoácidos puede someterse típicamente a un número únicamente limitado de inserciones y/o eliminaciones (en caso de haberlas), de tal forma que las estructuras similares a bucles estructurales de CDR se mantienen en la variante (se proporciona una descripción de técnicas relacionadas y de principios relevantes en, por ejemplo, Schiweck et al., *J Mol Biol.* 268(5), 934-51 (1997), Morea, *Biophys Chem.* 68(1-3), 9-16 (1997), Shirai et al., *FEBS Lett.* 399(1-2), 1-8 (1996), Shirai et al., *FEBS Lett.* 455(1-2), 188-97 (1999), Reckzo et al., *Protein Eng.* 8(4), 389-95 (1995) y Eigenbrot et al., *J Mol Biol.* 229(4), 969-95 (1993). Véanse también los documentos WO 03/048185, WO 03/070747 y WO 03/027246.

Las técnicas adicionales que pueden usarse para generar anticuerpos variantes incluyen la evolución dirigida y otras técnicas de generación de variantes descritas en, por ejemplo, el documento US 20040009498, Marks et al., *Methods Mol Biol.* 248, 327-43(2004), Azriel-Rosenfeld et al., *J Mol Biol.* 335(1), 177-92 (2004), Park et al., *Biochem Biophys Res Commun.* 275(2), 553-7 (2000), Kang et al., *Proc Natl Acad Sci USA.* 88(24), 11120-3 (1991), Zahnd et al., *J Biol Chem.* 279(18), 18870-7 (2004), Xu et al., *Chem Biol.* 9(8), 933-42 (2002), Border et al., *Proc Natl Acad Sci USA.* 97(20), 10701-5 (2000), Cramer et al., *Nat Med.* 2(1), 100-2 (1996) y como se describe de manera más general en, por ejemplo, el documento WO 03/048185.

Las variantes de anticuerpo generadas pueden someterse a cualquier técnica de exploración adecuada y pueden seleccionarse los anticuerpos con propiedades adecuada y deseablemente superiores en uno o más ensayos relevantes para su posterior desarrollo.

Los CD38BP que comprenden secuencias de CDR como las descritas anteriormente pueden comprender cualquier número y combinación adecuada de dichas CDR de V<sub>L</sub> y V<sub>H</sub> a la vez que retienen al menos una proporción sustancial (al menos aproximadamente un 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% o más) de la afinidad/avidez y/o la especificidad/selectividad de un anticuerpo que tiene una secuencia de V<sub>L</sub> de SEQ ID NO: 2 y una secuencia de V<sub>H</sub> de SEQ ID NO: 7, y/o un anticuerpo que tiene una secuencia de V<sub>L</sub> de SEQ ID NO: 12 y una secuencia de V<sub>H</sub> de SEQ ID NO: 17 y/o un anticuerpo que tiene una secuencia de V<sub>L</sub> de SEQ ID NO: 22 y una secuencia de V<sub>H</sub> de SEQ

ID NO: 27, pero que difiere opcionalmente en otras características, tales como inmunogenicidad en un paciente humano, afinidad por el epítipo, semivida aumentada, etc. En algunos casos, dicho CD38BP puede asociarse con mayor afinidad, selectividad, y/o especificidad que el anticuerpo parental. En una realización, hay presente menos de un grupo completo de CDR de  $V_L$  y/o CDR de  $V_H$  en un CD38BP de la presente invención. En una realización, están presentes todas las CDR de  $V_L$  y las CDR de  $V_H$ .

Los ejemplos de otras propiedades funcionales de anticuerpos, que pueden alterarse o retenerse en los CD38BP variantes en comparación con -003 y -005 y -024, son:

- 10 (1) alta afinidad de unión a CD38;
- (2) baja velocidad de disociación de CD38
- (3) inhibición o bloqueo de la unión de CD38 a la diana de CD38;
- (4) eliminación de células T o células B que expresan CD38;
- 15 (5) inducción de un alto nivel de CDC de células negativas a CD55/59 o positivas a CD55/59;
- (6) traslocación en las balsas lipídicas tras la unión a CD38;
- (7) tolerización de células T;
- (8) inhibición de la proliferación de células T o B que expresan CD38;
- (9) internalización de CD38;
- (10) inhibición o inducción de la actividad enzimática de CD38;
- 20 (11) inhibición o inducción de la transducción de señales inducida por CD38;
- (12) inducción o inhibición de la producción de citocinas;
- (13) inducción o bloqueo de la diferenciación de células T o de células B;
- (14) inducción o rescate de la apoptosis;
- (15) atenuación o aumento de la inducción de lisis por células NK;
- 25 (16) inducción o inhibición de la producción de insulina por células  $\beta$  en el páncreas;
- (17) supervivencia prolongada de un sujeto que tiene células tumorales que expresan CD38; y/o
- (18) inducción de la ADCC de dianas de CD38 cuando se mezclan con células efectoras adecuadas. La presente divulgación también proporciona CD38B que se caracterizan respecto de su capacidad para competir (inhibir de manera competitiva) o competir de manera cruzada (es decir, inhibir de manera parcialmente relativa la unión al epítipo) con un anticuerpo que tiene una secuencia de  $V_L$  de SEQ ID NO: 2 y una secuencia de  $V_H$  de SEQ ID NO: 7 (tal como el anticuerpo -003), o un anticuerpo que tenga una secuencia de  $V_L$  de SEQ ID NO: 12 y una secuencia de  $V_H$  de SEQ ID NO: 17 (tal como el anticuerpo -005) o un anticuerpo que tiene una secuencia de  $V_L$  de SEQ ID NO: 22 y una secuencia de  $V_H$  de SEQ ID NO: 27, (tal como el anticuerpo -024), por la unión a CD38.
- 30
- 35 Dicho CD38BP puede ser, por ejemplo, un fragmento Fab, derivado de un anticuerpo que se une a un epítipo idéntico a o solapante con un epítipo al que se une un anticuerpo que tiene una secuencia de  $V_L$  de SEQ ID NO: 2 y una secuencia de  $V_H$  de SEQ ID NO: 7, o un anticuerpo que tenga una secuencia de  $V_L$  de SEQ ID NO: 12 y una secuencia de  $V_H$  de SEQ ID NO: 17 o un anticuerpo que tenga una secuencia de  $V_L$  de SEQ ID NO: 22 y una secuencia de  $V_H$  de SEQ ID NO: 27. Dicho fragmento Fab, debido a su tamaño relativamente pequeño en comparación con las moléculas de mAb, puede no competir de manera significativamente con dichos anticuerpos por la unión a CD38, aunque lo haga el anticuerpo del que se derivan. Sin embargo, dicho CD38BP puede ser útil de manera similar para dirigirse a regiones cercanas de CD38 (por ejemplo, en el contexto de dirigir una citotoxina, radionúclido, o similares en el contexto de un inmunocóncugado de CD38BP). Por lo tanto, dichos CD38BP pueden ser útiles en el contexto de los métodos descritos en el presente documento.
- 40
- 45 La competición por la unión a CD38 o a una porción de CD38 por dos o más CD38BP puede determinarse mediante cualquier técnica adecuada. En una realización, la competición se determina, por ejemplo, tal como se describe en el ejemplo 7, 8 y 9.
- 50 La competición se refiere a cualquier reducción detectablemente significativa en la propensión de una molécula concreta para unirse a un compañero de unión particular en presencia de otra molécula que se une al compañero de unión. Normalmente, competición significa una reducción de al menos aproximadamente el 10%, tal como de al menos aproximadamente el 15%, o una reducción de aproximadamente el 20% en la unión entre un CD38BP y
- 55 (a) una forma de CD38 (por ejemplo, CD38 "procesado", "maduro", "no procesado", "sin procesar" o "inmaduro");
- (b) una forma de CD38 libre (por ejemplo, un fragmento de CD38 producido mediante procesamiento *in vivo*);
- (c) un péptido heterodimérico compuesto de otro péptido asociado con CD38, tal como CD31, y CD38;
- (d) un complejo de CD38 y uno o más sustratos, tales como AMPc, NAD<sup>+</sup> y/o cADPR;
- (e) un dímero dimerizado, asociado y/o procesado de CD38 con un ligando soluble, tal como CD31; o
- 60 (f) una porción de CD38,

causada por la presencia de otro CD38BP según se determina mediante, por ejemplo, análisis ELISA o análisis FACS (tal como se describe en la sección de ejemplos) usando cantidades suficientes de los dos o más CD38BP competitivos y la molécula de CD38. También puede suceder que la competición pueda existir entre CD38BP con respecto a más de un CD38, y/o una parte de CD38, por ejemplo, en un contexto donde las propiedades de unión a anticuerpo de una región concreta de CD38 se retengan en fragmentos del mismo, tal como en el caso de un

epítipo lineal bien localizado en varios fragmentos ensayados o un epítipo conformacional que se presenta en fragmentos de CD38 lo suficientemente grandes así como en CD38.

5 La evaluación de la competición implica típicamente una evaluación de la unión inhibidora relativa usando una primera cantidad de una primera molécula; una segunda cantidad de una segunda molécula; y una tercera cantidad de una tercera molécula (o un patrón determinado mediante estudios de unión que pueden compararse razonablemente con nuevos datos de unión respecto de las moléculas primera y segunda como subrogado para datos contemporáneos reales), en donde las cantidades primera, segunda y tercera son suficientes para efectuar una comparación que proporciona información acerca de la selectividad y/o especificidad de las moléculas en  
10 cuestión respecto de las otras moléculas presentes. Las cantidades primera, segunda y tercera pueden variar dependiendo de la naturaleza del CD38BP y de las dianas potenciales del mismo en cuestión. Por ejemplo, para evaluaciones ELISA, similares a aquellas descritas en la sección de ejemplos, se necesitan aproximadamente 5-50 µg (por ejemplo, aproximadamente 10-50 µg, aproximadamente 20-50 µg, aproximadamente 5-20 µg, aproximadamente 10-20 µg, etc.) de CD38BP y/o de dianas de CD38 para evaluar si existe la competición. Las  
15 condiciones también han de ser adecuadas para la unión. Normalmente, las condiciones fisiológicas o próximas a las fisiológicas (por ejemplo, temperaturas de aproximadamente 20-40°C, pH de aproximadamente 7-8, etc.) son adecuadas para la unión CD38BP:CD38.

20 A menudo, la competición está marcada por una inhibición relativa significativamente mayor de aproximadamente un 5% según se determina mediante un análisis ELISA y/o FACS. Puede ser deseable establecer un umbral mayor de inhibición relativa como un criterio/determinante de lo que es un nivel adecuado de competición en un contexto particular (por ejemplo, donde se usa el análisis de competición para seleccionar o explorar respecto de nuevos anticuerpos diseñados con la función prevista de bloquear la unión de otro péptido o molécula que se une a CD38 (por ejemplo, los compañeros de unión naturales de CD38, tales como CD31, también denominado antígeno CD31, EndoCAM, GPIIA', PECAM-1, molécula de adhesión de plaquetas/células endoteliales o anticuerpo anti-CD38 de origen natural)). Por lo tanto, por ejemplo, es posible establecer un criterio de competitividad en donde se detecta una inhibición relativa de al menos aproximadamente el 10%; se detecta una inhibición relativa de al menos aproximadamente el 15%; o se detecta una inhibición relativa de al menos aproximadamente el 20% antes de que se considere que un anticuerpo es lo suficientemente competitivo. En los casos donde los epítopos que pertenecen a  
30 anticuerpos competitivos están ubicados estrechamente en un antígeno, la competición puede estar marcada por una inhibición relativa mayor de aproximadamente el 40% de la unión a CD38 (por ejemplo, una inhibición de al menos aproximadamente el 45%, tal como una inhibición de al menos aproximadamente el 50%, por ejemplo, una inhibición de al menos aproximadamente el 55%, tal como una inhibición de al menos aproximadamente el 60%, por ejemplo, una inhibición de al menos aproximadamente el 65%, tal como una inhibición de al menos aproximadamente el 70%, por ejemplo, una inhibición de al menos aproximadamente el 75%, tal como una inhibición de al menos aproximadamente el 80%, por ejemplo, una inhibición de al menos aproximadamente el 85%, tal como una inhibición de al menos aproximadamente el 90%, por ejemplo, una inhibición de al menos aproximadamente el 95%, o un mayor nivel de inhibición relativa).

40 La competición puede considerarse la inversa de la reactividad cruzada entre una molécula y dos compañeros de unión potenciales. En determinadas realizaciones, un anticuerpo CD38BP de la presente invención puede unirse específicamente a uno o más residuos o regiones en CD38 pero asimismo, no reacciona de manera cruzada con otros péptidos, regiones peptídicas, o moléculas, por ejemplo, un anticuerpo anti-CD38 de la presente invención puede reaccionar de manera cruzada con proteínas con homología para CD38, tales como BST-1 (antígeno-1 de células estromales de médula ósea) y Mo5, también denominado CD157; o los anticuerpos anti-CD38 pueden no reaccionar de manera cruzada con CD38 en el contexto de un tejido normal, tal como tejidos no implicados en el mieloma múltiple. Normalmente, la ausencia de reactividad cruzada significa menos de aproximadamente un 5% de inhibición competitiva relativa entre las moléculas cuando se evalúan mediante análisis ELISA y/o FACS usando cantidades suficientes de las moléculas en condiciones de ensayo adecuadas.

50 En el presente documento se describe:

- un CD38BP que compite con un anticuerpo que tiene una secuencia de V<sub>L</sub> de SEQ ID NO: 2 y una secuencia de V<sub>H</sub> de SEQ ID NO: 7, tal como el anticuerpo -003, por la unión a CD38 o una porción del mismo;
- 55 - un CD38BP que compite con un anticuerpo que tiene una secuencia de V<sub>L</sub> de SEQ ID NO: 12 y una secuencia de V<sub>H</sub> de SEQ ID NO: 17, tal como el anticuerpo -005, por la unión a CD38 o una porción del mismo; y
- un CD38BP que compite con un anticuerpo que tiene una secuencia de V<sub>L</sub> de SEQ ID NO: 22 y una secuencia de V<sub>H</sub> de SEQ ID NO: 27, tal como el anticuerpo -024, por la unión a CD38 o una porción del mismo.

60 Como se describe en cualquier parte del presente documento, a menos que se afirme lo contrario o se contradiga claramente a partir del contexto, las referencias a la unión de un CD38BP a CD38 pretenden hacer referencia a la unión en cualquier contexto adecuado, tal como en un contexto conformacional donde está presente la estructura de CD38; o en un contexto de epítipo lineal. Por supuesto, la unión en un subconjunto limitado de dichos contextos puede ser una característica importante respecto de cualquier CD38BP.

65 Pueden hallarse métodos adicionales para determinar la especificidad de CD38BP mediante inhibición competitiva,

por ejemplo, en Harlow et al., *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1988), Colligan et al., eds., *Current Protocols in Immunology*, Greene Publishing Assoc. y Wiley InterScience N.Y., (1992, 1993), y Muller, *Meth. Enzymol.* 92, 589-601 (1983)).

- 5 CD38 humano comprende una serie de epítomos diferentes, que pueden incluir (1) determinantes antigénicos peptídicos que están comprendidos dentro de cadenas peptídicas individuales en CD38 humano; (2) determinantes antigénicos conformacionales que consisten en uno o más aminoácidos no contiguos en una cadena particular y/o aminoácidos presentes en cadenas peptídicas espacialmente contiguas pero separadas (típicamente donde las secuencias de aminoácidos respectivas están ubicadas de manera separada a lo largo de la secuencia polipeptídica de CD38 humano); (3) determinantes antigénicos postraduccionales que consisten, en su totalidad o en parte, en estructuras moleculares unidas covalentemente a CD38 humano, tales como grupos carbohidrato; o (4) combinaciones de (1)-(3).

15 Un epítomo en el contexto de la presente invención incluye cualquier determinante peptídico o derivado de péptido capaz de unirse específicamente a una inmunoglobulina. Un epítomo puede comprender cualquier número adecuado de aminoácidos, en cualquier posición adecuada (respecto de la secuencia lineal de CD38), orientación (respecto de CD38 plegado, o un fragmento del mismo), composición de aminoácidos (y, por consiguiente, al menos en parte, la carga). Por lo tanto, por ejemplo, un epítomo puede estar compuesto por aproximadamente 3-10 aminoácidos, típicamente 3-8 aminoácidos, en una o más ubicaciones contiguas o no contiguas respecto de la secuencia primaria de CD38 (por ejemplo, un epítomo puede consistir esencialmente en 2, 3, 4, 5, 6, 7, u 8 residuos de aminoácidos distribuidos en 1, 2, 3, 4, o 5 ubicaciones no contiguas en CD38). Como alternativa, por ejemplo, puede considerarse que un epítomo está definido por una región de aproximadamente 5-40 residuos de aminoácidos contiguos (por ejemplo, aproximadamente 7-30 residuos de aminoácidos, aproximadamente 5-20 residuos de aminoácidos, o aproximadamente 3-15 residuos de aminoácidos) en CD38 (solos o en combinación con una parte de un dominio de CD38 adyacente). En algunos epítomos puede darse el caso de que solo un residuo de aminoácidos o solo unos pocos residuos de aminoácidos sean críticos para el reconocimiento de la (o las) CDR (y por lo tanto, altamente importantes para la afinidad y avidez de CD38BP:antígeno de CD38). Como tal, un epítomo puede caracterizarse basándose en uno o más de dichos residuos críticos, reconociendo que otros residuos pueden aportar una contribución menor al epítomo. En el caso de un epítomo definido por una región de aminoácidos, puede darse el caso de que uno o más aminoácidos en la región proporcionan una contribución únicamente menor o incluso una contribución despreciable a la unión al anticuerpo, de tal forma que el residuo puede someterse a sustitución con un residuo diferente adecuado sin dar como resultado "una pérdida" del epítomo para al menos parte de los CD38BP específicos para el mismo.

35 En una realización, la presente invención proporciona un anticuerpo anti-CD38, que se une específicamente a un epítomo de CD38 al que también se une específicamente un anticuerpo que tiene una secuencia de  $V_L$  de SEQ ID NO: 2 y una secuencia de  $V_H$  de SEQ ID NO: 7 (tal como el anticuerpo -003). Es posible que los anticuerpos que tienen una o más CDR que difieren de las CDR de un anticuerpo que tiene una secuencia de  $V_L$  de SEQ ID NO: 2 y una secuencia de  $V_H$  de SEQ ID NO: 7, pueda seguir siendo específico para el mismo epítomo que un anticuerpo que tiene una secuencia de  $V_L$  de SEQ ID NO: 2 y una secuencia de  $V_H$  de SEQ ID NO: 7. En algunos de estos casos, el anticuerpo en cuestión puede reconocer o ser más específico/selectivo por estructuras o regiones particulares del epítomo que el anticuerpo que tiene una secuencia de  $V_L$  de SEQ ID NO: 2 y una secuencia de  $V_H$  de SEQ ID NO: 7.

45 Un epítomo de CD38 al que se une un anticuerpo que tiene una secuencia de  $V_L$  de SEQ ID NO: 2 y una secuencia de  $V_H$  de SEQ ID NO: 7 (tal como el anticuerpo -003), o un anticuerpo que tenga una secuencia de  $V_L$  de SEQ ID NO: 12 y una secuencia de  $V_H$  de SEQ ID NO: 17 (tal como el anticuerpo -005) o un anticuerpo que tiene una secuencia de  $V_L$  de SEQ ID NO: 22 y una secuencia de  $V_H$  de SEQ ID NO: 27 (tal como el anticuerpo -024), puede identificarse mediante técnicas de mapeo y caracterización convencionales, cuyo refinamiento adicional puede identificarse mediante cualquier técnica adecuada, encontrándose disponibles numerosos ejemplos de los mismos para los expertos en la materia. Estas técnicas también pueden usarse para identificar y/o caracterizar generalmente epítomos para CD38BP. A modo de ejemplo de dichos métodos de mapeo/caracterización, puede determinarse un epítomo para un anticuerpo anti-CD38 mediante "estampación de huellas" de epítomos usando modificación química de las aminas/carboxilos expuestos en la proteína CD38. Un ejemplo específico de dicha técnica de "estampación de huellas" es el uso de HXMS (intercambio de hidrógeno-deuterio detectado por espectrometría de masas) en donde se produce un intercambio de hidrógeno/deuterio de protones de amida de receptor y proteína de ligando, unión, y de nuevo un intercambio, en donde los grupos amida del armazón que participan en la unión a la proteína están protegidos frente al intercambio de vuelta y por lo tanto permanecerán deuterados. Las regiones relevantes pueden identificarse en este punto mediante proeólisis peptídica, separación por cromatografía líquida de alto rendimiento rápida de microcargas, y/o ionización por electropulverización-espectrometría de masas. Véase, por ejemplo, EhringH, *Analytical Biochemistry*, 267(2) 252-259 (1999) y/o Engen, J.R. y Smith, D.L. (2001) *Anal. Chem.* 73, 256A-265A. Otro ejemplo de una técnica de identificación de epítomos adecuada es el mapeo de epítomos por resonancia magnética nuclear (RMN), donde típicamente, la posición de las señales en los espectros de RMN bidimensionales sel antígeno libre y del antígeno complejo con el péptido de unión a antígeno, tal como un anticuerpo, se comparan. Típicamente, el antígeno se marca isotópicamente de manera selectiva con  $^{15}N$ , de tal forma que en el espectro de RMN, solo se ven las señales correspondientes al antígeno y no las señales del péptido de unión a antígeno. Las señales de antígeno que se originan a partir de aminoácidos implicados en la interacción

con el péptido de unión a antígeno cambiarán típicamente su posición en los espectros del complejo en comparación con los espectros del antígeno libre, y de este modo pueden identificarse los aminoácidos implicados en la unión. Véase, por ejemplo, Ernst Schering Res Found Workshop. (44), 149-67 (2004), Huang et al., *Journal of Molecular Biology* 281(1). 61-67 (1998) y Saito y Patterson, *Methods*. 9(3), 516-24 (1996).

5 El mapeo/caracterización de epítomos también puede efectuarse usando métodos de espectrometría de masas. Véase, por ejemplo, Downard, *J Mass Spectrom.* 35(4), 493-503 (2000) y Kiselar y Downard, *Anal Chem.* 71(9), 1792-801 (1999).

10 Las técnicas de digestión por proteasas también pueden ser útiles en el contexto del mapeo e identificación de epítomos. Las regiones/secuencias determinantes antigénicas pueden determinarse mediante digestión por proteasas, por ejemplo, usando digestión de tripsina a una relación 1:50 respecto de CD38 durante una noche (O/N) a 37°C y pH 7-8, seguido de análisis por espectrometría de masas (EM) para la identificación del péptido. Los péptidos protegidos frente a la escisión por tripsina mediante el CD38BP pueden identificarse posteriormente  
15 mediante comparación de muestras sometidas a digestión por tripsina y muestras incubadas con CD38BP y después sometidas a digestión por, por ejemplo, tripsina (revelando de este modo una huella para la molécula de unión). Otras enzimas, tales como quimotripsina, pepsina, etc. pueden usarse también o como alternativa en un método de caracterización de epítomos similar. Un CD38BP que proporciona de manera significativa el mismo resultado que un anticuerpo que tiene una secuencia de V<sub>L</sub> de SEQ ID NO: 2 y una secuencia de V<sub>H</sub> de SEQ ID NO: 7 (tal como el anticuerpo -003), o un anticuerpo que tenga una secuencia de V<sub>L</sub> de SEQ ID NO: 12 y una secuencia de V<sub>H</sub> de SEQ ID NO: 17 (tal como el anticuerpo -005) o un anticuerpo que tiene una secuencia de V<sub>L</sub> de SEQ ID NO: 22 y una secuencia de V<sub>H</sub> de SEQ ID NO: 27 (tal como el anticuerpo -024) en estas mediciones se considera un anticuerpo que se une al mismo epítomo que un anticuerpo que tiene una secuencia de V<sub>L</sub> de SEQ ID NO: 2 y una secuencia de V<sub>H</sub> de SEQ ID NO: 7 (tal como el anticuerpo -003), o un anticuerpo que tenga una secuencia de V<sub>L</sub> de SEQ ID NO:  
20 12 y una secuencia de V<sub>H</sub> de SEQ ID NO: 17 (tal como el anticuerpo -005) o un anticuerpo que tiene una secuencia de V<sub>L</sub> de SEQ ID NO: 22 y una secuencia de V<sub>H</sub> de SEQ ID NO: 27 (tal como el anticuerpo -024), respectivamente. Véase, por ejemplo, Manca, *Ann Ist Super Sanita.* 27(1), 15-9 (1991) para una discusión de técnicas similares.

El mapeo de epítomos mediante unión competitiva a CD38 con dos anticuerpos donde uno está biotinilado es otro método para identificar regiones determinantes antigénicas relevantes.  
30

La unión de anticuerpos a péptidos lineales y ciclados de CD38 mediante un inmunoensayo ligado a enzimas basado en PEPSCAN es otro método para identificar regiones determinantes antigénicas relevantes, véase, por ejemplo, Slootstra-JW et al. *Mol-Divers.* 1, 87-96 (1996).  
35

La mutagénesis de sitio dirigido es otro método para identificar regiones determinantes antigénicas relevantes, véase, por ejemplo, Polyak y Deans, *Blood* 99, 3956-3962 (2002).

También pueden usarse diversas técnicas de presentación en fagos para identificar epítomos. Véase, por ejemplo, Wang y Yu, *Curr Drug Targets.* 5(1), 1-15 (2004), Burton, *Immunotechnology.* 1(2), 87-94 (ago. de 1995), Cortese et al., *Immunotechnology.* 1(2), 87-94 (1995) e Irving et al., *Curr Opin Chem Biol.* 5(3), 314-24 (2001). También pueden identificarse epítomos consenso mediante técnicas relacionadas con la presentación en fagos modificadas (véase, <http://www.cs.montana.edu/~mumey/papers/jcb03.pdf>) para una descripción.  
40

Otros métodos potencialmente útiles para mapear epítomos incluyen técnicas cristalográficas, técnicas de difracción de rayos X (tales como las técnicas de estudio de difracción de rayos X/secuencia desarrolladas entre las décadas de 1970-1980 por Poljak y otros), y la aplicación de la tecnología de síntesis peptídica multipin. También pueden usarse métodos informáticos, tales como análisis de secuencia y análisis de estructura tridimensional y de acoplamiento para identificar determinantes antigénicos. Por ejemplo, también puede determinarse un epítomo mediante modelado molecular usando una estructura de CD38 con acoplamiento de la estructura del fragmento Fab del anticuerpo monoclonal individual. Estos y otros métodos de mapeo se describen en *Epitope Mapping A Practical Approach* (Westwood y Hay Eds.) 2001 Oxford University Press.  
45  
50

En el presente documento se describe un CD38BP que tiene sustancialmente las mismas características de unión a CD38 específicas de uno o más mAb seleccionados entre un anticuerpo que tiene una secuencia de V<sub>L</sub> de SEQ ID NO: 2 y una secuencia de V<sub>H</sub> de SEQ ID NO: 7 (tal como el anticuerpo -003), un anticuerpo que tenga una secuencia de V<sub>L</sub> de SEQ ID NO: 12 y una secuencia de V<sub>H</sub> de SEQ ID NO: 17 (tal como el anticuerpo -005), y un anticuerpo que tenga una secuencia de V<sub>L</sub> de SEQ ID NO: 22 y una secuencia de V<sub>H</sub> de SEQ ID NO: 27 (tal como el anticuerpo -024).  
55  
60

Los estudios de mapeo han indicado que varios anticuerpos monoclonales provocados contra CD38 humano se unen a epítomos en la región C-terminal de CD38 (220-296) (Hoshino et al. *J. Immunol.*, 1997, 158: 741-747, y Ferrero et al., *BMC Immunology*, 2004, 5: 21). Dentro de esta región, se han observado tres diferencias de aminoácidos entre la secuencia de CD38 de ser humano y de macaco: T237, Q272 y S274 en seres humanos se corresponden con A238, R273 y F275 en macacos. -005 no se une a tejido de macaco (mostrado en los ejemplos 10 y 11). Existe un número limitado de diferencias de aminoácidos entre la secuencia de CD38 de ser humano y de  
65

mono, por ejemplo, en la parte carboxilo terminal de la proteína, por ejemplo, las siguientes tres diferencias de aminoácidos entre la secuencia de CD38 de ser humano y de macaco: T237, Q272 y S274 en los CD38 humanos se corresponden con A238, R273 y F275 en CD38 de macaco (compárense la SEQ ID NO: 21 y la SEQ ID NO: 22). - 005 no se une a una proteína huCD38 mutante, donde el residuo de glutamina en la posición 272 de la SEQ ID NO: 31 se ha sustituido con un residuo de arginina (Q272R), o a una proteína mutante huCD38, donde el residuo de serina de la posición 274 de la SEQ ID NO: 31 se ha sustituido con un residuo de fenilalanina (S274F) (mostrado en el ejemplo 17) en el mismo grado que se une a CD38 humano de tipo silvestre. La unión de -005 se suprime particularmente por la sustitución de aminoácidos en la posición S274F.

10 Por consiguiente, en el presente documento se describen péptidos, que se unen a CD38 humano (SEQ ID NO: 31), y que no se une a CD38 humano mutante, en donde el residuo de glutamina en la posición 272 se ha sustituido con un residuo de arginina (SEQ ID NO: 33) en el mismo grado que se une a CD38 humano (SEQ ID NO: 31).

15 En el presente documento se describen péptidos, que se unen a CD38 humano (SEQ ID NO: 31), y que no se unen a CD38 humano mutante, en donde el residuo de serina en la posición 274 se ha sustituido con un residuo de fenilalanina (SEQ ID NO: 34) en el mismo grado que se une a CD38 humano (SEQ ID NO: 31).

20 La expresión "en el mismo grado" debe interpretarse de tal forma que la unión del péptido a CD38 humano mutante es significativamente menor que la unión del péptido a CD38 humano de tipo silvestre. La unión de un péptido a las moléculas de CD38 (de tipo silvestre y mutantes) puede determinarse de varias formas y se encuentra dentro del conocimiento general de un experto en la materia la determinación de si la unión al mutante es "significativamente menor" que la unión al tipo silvestre. El experto en la materia tiene a su disposición un gran número de técnicas diferentes para determinar la unión de un péptido a otro péptido, por ejemplo, ELISA, radioinmunoensayo, BIAcore o citometría de flujo.

25 Un método para determinar la unión es mediante la determinación de la  $CE_{50}$  de la unión del péptido a la proteína mutante y a la proteína de tipo silvestre y después comparando los valores obtenidos. Otro método para determinar la unión es mediante el examen de la magnitud de la unión a una concentración saturante (por ejemplo, el máximo de la señal de unión), o mediante la determinación de las constantes de velocidad cinética  $K_{on}$  y  $K_{off}$ , por ejemplo, mediante BIAcore.

30 En una realización, la unión del péptido en cuestión a las proteínas CD38 (mutantes o de tipo silvestre) es mediante el uso de un ELISA, tal como se describe en el ejemplo 17.

35 En una realización, la  $CE_{50}$  de la unión del péptido a un CD38 humano mutante, en donde el residuo de serina en la posición 274 se ha sustituido con un residuo de fenilalanina (SEQ ID NO: 34), es menor del 50% de la  $CE_{50}$  de la unión del péptido a CD38 humano (SEQ ID NO: 31). En una realización, la  $CE_{50}$  de la unión del péptido a un CD38 humano mutante, en donde el residuo de serina en la posición 274 se ha sustituido con un residuo de fenilalanina (SEQ ID NO: 34), es menor del 10% de la  $CE_{50}$  de la unión del péptido a CD38 humano (SEQ ID NO: 31). En una realización, la  $CE_{50}$  de la unión del péptido a un CD38 humano mutante, en donde el residuo de serina en la posición 274 se ha sustituido con un residuo de fenilalanina (SEQ ID NO: 34), es menor del 5% de la  $CE_{50}$  de la unión del péptido a CD38 humano (SEQ ID NO: 31). En una realización, la  $CE_{50}$  de la unión del péptido a un CD38 humano mutante, en donde el residuo de serina en la posición 274 se ha sustituido con un residuo de fenilalanina (SEQ ID NO: 34), es menor del 1% de la  $CE_{50}$  de la unión del péptido a CD38 humano (SEQ ID NO: 31).

45 En una realización, la  $CE_{50}$  de la unión del péptido a un CD38 humano mutante, en donde el residuo de glutamina en la posición 272 se ha sustituido con un residuo de arginina (SEQ ID NO: 33), es menor del 50% de la  $CE_{50}$  de la unión del péptido a CD38 humano (SEQ ID NO: 31). En una realización, la  $CE_{50}$  de la unión del péptido a un CD38 humano mutante, en donde el residuo de glutamina en la posición 272 se ha sustituido con un residuo de arginina (SEQ ID NO: 33), es menor del 10% de la  $CE_{50}$  de la unión del péptido a CD38 humano (SEQ ID NO: 31).

50 Un anticuerpo de la invención se puede unir a un CD38 humano mutante, en donde el residuo de treonina en la posición 237 se ha sustituido con un residuo de alanina (SEQ ID NO: 32) en el mismo grado que se une a CD38 humano (SEQ ID NO: 31). En una realización, la  $CE_{50}$  de la unión del anticuerpo a un CD38 humano mutante, en donde el residuo de treonina en la posición 237 se ha sustituido con un residuo de alanina (SEQ ID NO: 32) es mayor del 75% de la  $CE_{50}$  de la unión del anticuerpo a CD38 humano (SEQ ID NO: 31). En una realización, la  $CE_{50}$  de la unión del anticuerpo a un CD38 humano mutante, en donde el residuo de treonina en la posición 237 se ha sustituido con un residuo de alanina (SEQ ID NO: 32) es mayor del 85% de la  $CE_{50}$  de la unión del anticuerpo a CD38 humano (SEQ ID NO: 31). En una realización, la  $CE_{50}$  de la unión del anticuerpo a un CD38 humano mutante, en donde el residuo de treonina en la posición 237 se ha sustituido con un residuo de alanina (SEQ ID NO: 32) es mayor del 90% de la  $CE_{50}$  de la unión del anticuerpo a CD38 humano (SEQ ID NO: 31). En una realización, la  $CE_{50}$  de la unión del anticuerpo a un CD38 humano mutante, en donde el residuo de treonina en la posición 237 se ha sustituido con un residuo de alanina (SEQ ID NO: 32) es mayor del 95% de la  $CE_{50}$  de la unión del anticuerpo a CD38 humano (SEQ ID NO: 31).

65 Para determinar regiones específicas más probablemente antigénicas en CD38, pueden aplicarse diversos métodos

analíticos predictivos. En una primera estrategia analítica, Puede analizarse CD38 respecto de (1) regiones altamente hidropáticas (usando el método de Kyte-Doolittle); (2) antigenicidad medida mediante el método de índice de protrusión; (3) antigenicidad determinada mediante el método de Parker; (4) antigenicidad determinada mediante el método de Hopp/Woods; y (5) hidrofiliidad medida mediante los métodos de Goldman, Engleman, y Steitz. Pueden seleccionarse secuencias con una longitud en el intervalo de 10-40 aminoácidos basándose en que muestren una o más de estas propiedades. La base argumental para esta estrategia es el consenso general de que muchos epítomos ideales de células B son secuencias hidrófilas, orientadas hacia la superficie, y flexibles de aproximadamente 8-10 aminoácidos de longitud.

En el presente documento se proporcionan CD38BP específicos para regiones de CD38 identificadas de dicho modo. Además, pueden compararse los extremos de estas secuencias con regiones determinantes antigénicas predichas ubicadas mediante los otros análisis descritos en el presente documento para proporcionar regiones específicas adicionales con probabilidad de contener el determinante antigénico. Pueden efectuarse fácilmente otras comparaciones similares para proporcionar regiones probablemente determinantes antigénicas adicionales, donde la unión de los CD38BP a estas regiones determinantes antigénicas puede considerarse otra característica de la presente divulgación.

Los CD38BP de la presente invención son anticuerpos. Los ejemplos no limitantes de anticuerpos de unión a CD38 proporcionadas por la presente invención incluyen (a) una molécula de inmunoglobulina funcional completa que comprende: (i) dos cadenas pesadas quiméricas idénticas que comprenden una región variable con una especificidad de antígeno de superficie de células B humanas y una región constante humana y (ii) dos cadenas ligeras totalmente idénticas (es decir, no quiméricas); (b) una molécula de inmunoglobulina funcional completa que comprende: (i) dos cadenas pesadas quiméricas idénticas que comprenden una región variable tal como se ha indicado, y una región constante humana, y (ii) dos cadenas ligeras no humanas completamente idénticas (es decir, no quiméricas); (c) un anticuerpo monovalente, es decir, una molécula de inmunoglobulina funcional completa que comprende: (i) dos cadenas pesadas quiméricas idénticas que comprenden una región variable tal como se ha indicado, y una región constante humana, y (ii) dos cadenas ligeras diferentes, teniendo solo una de ellas la misma especificidad que la región variable de las cadenas pesadas. La molécula de anticuerpo resultante se une únicamente a un extremo de la misma y por lo tanto, es capaz de unirse de manera divalente. Como otra ilustración, puede decirse que los anticuerpos proporcionados por la presente invención incluyen lo siguiente: (a) una molécula de inmunoglobulina completa; (b) un scFv; (c) un anticuerpo monoclonal; (d) un anticuerpo humano; (e) un anticuerpo quimérico; (f) un anticuerpo humanizado; (g) un fragmento Fab; (h) un fragmento Fab'; (i) un fragmento F(ab')<sub>2</sub>; (j) una molécula Fv; y (k) una molécula Fv unida por disulfuro.

En una realización, el anticuerpo de la presente invención es un anticuerpo policlonal. En una realización, el anticuerpo de la presente invención es un anticuerpo monoclonal. En una realización adicional, el anticuerpo de la presente invención es un anticuerpo monoclonal humano. En otra realización adicional, el anticuerpo de la presente invención es un anticuerpo humanizado. En otra realización adicional, el anticuerpo de la presente invención es un anticuerpo quimérico. En otra realización adicional, el anticuerpo de la presente invención es un anticuerpo monoclonal que se origina completamente a partir de una especie de mamífero diferente a los seres humanos. En una realización adicional, el anticuerpo de la presente invención es un anticuerpo monoclonal completamente murino.

Un anticuerpo monoclonal se refiere a una composición que comprende una población homogénea de anticuerpos que tienen una estructura y especificidad uniformes. Típicamente, un anticuerpo monoclonal es un anticuerpo obtenido a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogénea, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos excepto por posibles mutaciones de origen natural que pueden estar presentes en cantidades menores. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos y cada anticuerpo monoclonal se dirige típicamente contra un solo epítomo, lo que las diferencias de las preparaciones de anticuerpo policlonal que típicamente incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes epítomos. No debe interpretarse que el hecho de que un anticuerpo sea monoclonal requiera la producción del anticuerpo mediante cualquier método concreto. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales de la presente invención pueden producirse por el método de hibridoma descrito por primera vez por Kohler et al., Nature 256, 495 (1975), o pueden producirse mediante métodos de ADN recombinante. Los anticuerpos monoclonales también pueden aislarse a partir de bibliotecas de fagos de anticuerpo usando las técnicas descritas en, por ejemplo, Clackson et al., Nature 352, 624-628 (1991) y Marks et al., J. Mol. Biol. 222, 581-597 (1991).

Los anticuerpos monoclonales pueden obtenerse de cualquier fuente adecuada. Por lo tanto, por ejemplo, los anticuerpos monoclonales pueden obtenerse a partir de hibridomas preparados a partir de células B esplénicas murinas obtenidas de ratones inmunizados con un antígeno de interés, por ejemplo, en forma de células que expresan el antígeno sobre su superficie, o un ácido nucleico que codifica el antígeno de interés. Los anticuerpos monoclonales también pueden obtenerse a partir de hibridomas derivados de células que expresan anticuerpos de seres humanos o mamíferos no humanos inmunizados, tales como ratas, perros, primates, etc.

Como alternativa, los genes de anticuerpo clonados pueden expresarse en otros sistemas de expresión, incluyendo células procariontas, tales como microorganismos, tales como *E. coli*, para la producción de anticuerpos Fv

monocatenarios, algas, así como células de insecto. Además, los anticuerpos pueden producirse en animales transgénicos no humanos, tal como en la leche de ovejas y conejos o en huevos de gallina, o en plantas transgénicas. Véase, por ejemplo, Verma, R., et al., *J. Immunol. Meth.* 216, 165-181 (1998); Pollock, et al., *J. Immunol. Meth.* 231, 147-157 (1999); y Fischer, R., et al., *Biol. Chem.* 380, 825-839 (1999).

5 En una realización, pueden generarse anticuerpos monoclonales humanos dirigidos contra CD38 usando ratones transgénicos o transcromosómicos que portan partes del sistema inmunitario humano en lugar del sistema de ratón. Dichos ratones transgénicos y transcromosómicos incluyen ratones citados en el presente documento como ratones HuMAb y ratones KM, respectivamente, y se citan colectivamente en el presente documento como "ratones transgénicos". Un anticuerpo monoclonal humano generado en dichos ratones puede abreviarse como HuMAb.

15 El ratón HuMAb contiene un minilocus de gen de inmunoglobulina humano que codifica las secuencias de inmunoglobulina de cadena pesada ( $\mu$  y  $\gamma$ ) y ligera  $\kappa$  humanas no reorganizadas, junto con mutaciones dirigidas que inactivan a los locus endógenos de cadena  $\mu$  y  $\kappa$  (Lonberg, N. et al., *Nature* 368, 856-859 (1994)). Por consiguiente, los ratones muestran expresión reducida de IgM o  $\kappa$  de ratón y en respuesta a la inmunización, los transgenes de cadena pesada y ligera humana introducidos, sufren un intercambio de clase y mutación somática para generar anticuerpos monoclonales IgG, $\kappa$  humanos de alta afinidad (Lonberg, N. et al. (1994), citado anteriormente; revisado en Lonberg, N. *Handbook of Experimental Pharmacology* 113, 49-101 (1994), Lonberg, N. y Huszar, D., *Intern. Rev. Immunol.* Vol. 13 65-93 (1995) y Harding, F. y Lonberg, N. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 764 536-546 (1995)). La preparación de los ratones HuMAb se describe en detalle en Taylor, L. et al., *Nucleic Acids Research* 20, 6287-6295 (1992), Chen, J. et al., *International Immunology* 5, 647-656 (1993), Tuailon et al., *J. Immunol.* 152, 2912-2920 (1994), Taylor, L. et al., *International Immunology* 6, 579-591 (1994), Fishwild, D. et al., *Nature Biotechnology* 14, 845-851 (1996). Véanse también los documentos US 5.545.806, US 5.569.825, US 5.625.126, US 5.633.425, US 5.789.650, US 5.877.397, US 5.661.016, US 5.814.318, US 5.874.299, US 5.770.429, US 5.545.807, WO 98/24884, WO 94/25585, WO 93/1227, WO 92/22645, WO 92/03918 y WO 01/09187.

30 Los ratones HCo7 tienen una ruptura JKD en sus genes de cadena ligera ( $\kappa$ ) endógenos (tal como se describe en Chen et al., *EMBO J.* 12, 821-830 (1993)), una ruptura CMD en sus genes endógenos de cadena pesada (tal como se describe en el ejemplo 1 del documento WO 01/14424), un transgén de cadena ligera  $\kappa$  humana KCo5 (tal como se describe en Fishwild et al., *Nature Biotechnology* 14, 845-851 (1996)), y un transgén de cadena pesada humana HCo7 (tal como se describe en el documento US 5.770.429).

35 Los ratones HCo12 tienen una ruptura JKD en sus genes de cadena ligera ( $\kappa$ ) endógenos (tal como se describe en Chen et al., *EMBO J.* 12, 821-830 (1993)), una ruptura CMD en sus genes endógenos de cadena pesada (tal como se describe en el ejemplo 1 del documento WO 01/14424), un transgén de cadena ligera  $\kappa$  humana KCo5 (tal como se describe en Fishwild et al., *Nature Biotechnology* 14, 845-851 (1996)), y un transgén de cadena pesada humana HCo12 (tal como se describe en el ejemplo 2 del documento WO 01/14424). En la cepa de ratón KM, el gen de cadena ligera  $\kappa$  de ratón endógeno se ha roto de manera homocigótica, tal como se describe en Chen et al., *EMBO J.* 12, 811-820 (1993) y el gen de cadena pesada de ratón endógeno se ha roto homocigóticamente tal como se describe en el ejemplo 1 del documento WO 01/09187. Esta cepa de ratón porta un transgén de cadena ligera  $\kappa$  humana, KCo5, tal como se describe en Fishwild et al., *Nature Biotechnology* 14, 845-851 (1996). Esta cepa de ratón también porta un transcromosoma de cadena pesada humana compuesto del fragmento hCF (SC20) del cromosoma 14, tal como se describe en el documento WO 02/43478.

45 El ratón KM contiene un transcromosoma de cadena pesada humana y un transgén de cadena ligera  $\kappa$  humana. Los genes de cadena pesada y ligera de ratón endógenos también se han roto en el ratón KM, de tal forma que la inmunización del ratón da lugar a la producción de inmunoglobulinas humanas en lugar de inmunoglobulinas de ratón. La construcción de ratones KM y su uso para obtener inmunoglobulinas humanas se describe en detalle en el documento WO 02/43478.

50 Pueden usarse esplenocitos de estos ratones transgénicos para generar hibridomas que secretan anticuerpos monoclonales humanos según técnicas bien conocidas. Dichos mamíferos transgénicos, mamíferos que comprenden una secuencia de ácido nucleico operable que codifica, por ejemplo, la expresión de un CD38BP, tal como un anticuerpo de la presente invención, mamíferos transfectados con una o más secuencias de ácido nucleico que codifican CD38, y similares, son características adicionales que implican anticuerpos de la presente invención.

60 Los anticuerpos monoclonales o policlonales de la presente invención, o los anticuerpos de la presente invención que se originan a partir de otra especie también pueden generarse de manera transgénica mediante la generación de otro mamífero no humano o planta que sea transgénica para las secuencias de cadena pesada y ligera de inmunoglobulina de interés y la producción del anticuerpo en una forma recuperable a partir de los mismos. En relación con la producción transgénica en mamíferos, los anticuerpos pueden producirse en, y recuperarse a partir de, la leche de cabras, vacas, u otros mamíferos. Véanse, por ejemplo, los documentos US 5.827.690, US 5.756.687, US 5.750.172 y US 5.741.957.

65 Además, los anticuerpos humanos de la presente invención o los anticuerpos de la presente invención de otras especies pueden generarse mediante tecnologías de tipo presentación, incluyendo, sin limitación, presentación en

fagos, presentación retroviral, presentación ribosómica, y otras técnicas, usando técnicas bien conocidas en la materia y las moléculas resultantes pueden someterse a maduración adicional, tal como maduración por afinidad, ya que dichas técnicas se conocen bien en la materia (véase, por ejemplo, Hoogenboom et al., *J. Mol. Biol.* 227, 381 (1991) (presentación en fagos), Vaughan et al., *Nature Biotech* 14, 309 (1996) (presentación en fagos), Hanes y Plutchau, *PNAS USA* 94, 4937-4942 (1997) (presentación ribosómica), Parmley y Smith, *Gene* 73, 305-318 (1988) (presentación en fagos), Scott *TIBS* 17, 241-245 (1992), Cwirla et al., *PNAS USA* 87, 6378-6382 (1990), Russel et al., *Nucl. Acids Research* 21, 1081-1085 (1993), Hoogenboom et al., *Immunol. Reviews* 130, 43-68 (1992), Chiswell and McCafferty *TIBTECH* 10, 80-84 (1992), y el documento US 5.733.743). En caso de utilizar tecnologías de presentación para producir anticuerpos que no son humanos, dichos anticuerpos pueden humanizarse, por ejemplo, tal como se describe en otras partes del presente documento.

Los anticuerpos monoclonales humanizados de la presente invención pueden generarse fusionando los dominios constantes de un anticuerpo humano a los dominios variables de una especie no humana. Los ejemplos de cómo producir anticuerpos humanizados pueden hallarse, por ejemplo, en los documentos US 6.054.297, US 5.886.152 y US 5.877.293. Un anticuerpo humanizado se diseña para que tenga una homología mayor por una inmunoglobulina humana que los anticuerpos monoclonales de origen animal. Los residuos de aminoácidos no humanos de un dominio variable "importado" (animal) se transfectan típicamente en un "armazón" humano. La humanización puede efectuarse esencialmente siguiendo el método de Winter y colaboradores (Jones et al., *Nature* 321, 522-525 (1986), Riechmann et al., *Nature* 332, 323-327 (1988), Verhoeven et al., *Science* 239, 1534-1536 (1988)), mediante la sustitución de las regiones determinantes de la complementariedad ("CDR") de roedor o secuencias de CDR por las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano. Por consiguiente, en dichos anticuerpos "humanizados", las partes de CDR del dominio variable se han sustituido por la secuencia correspondiente de una especie no humana. Por lo tanto, los anticuerpos humanizados son típicamente anticuerpos humanos en los que algunos residuos de CDR y posiblemente algunos residuos marco conservados están sustituidos por residuos de sitios análogos en anticuerpos de roedores. La selección de dominios variables humanos, tanto ligeros como pesados, para su uso en la preparación de anticuerpos humanizados es importante para reducir la antigenicidad. De acuerdo con el método llamado de "mejor ajuste", la secuencia del dominio variable de un anticuerpo de roedor se reconoce frente a la biblioteca completa de secuencias de dominio variable humanas conocidas. La secuencia humana que sea más próxima a la del roedor se acepta como el marco conservado (FR) humano para el anticuerpo humanizado (Sims et al., *J. Immunol.* 151, 2296 (1993), Chothia et al., *J. Mol. Biol.* 196, 901 (1987)). Otro método usa un marco conservado particular derivado de la secuencia consenso de todos los anticuerpos humanos de un subgrupo particular de cadenas ligeras o pesadas. Puede usarse el mismo marco conservado para diferentes anticuerpos humanizados (Carter et al., *PNAS USA* 89, 4285 (1992), Presta et al., *J. Immunol.* 151, 2623 (1993)).

Típicamente, también es importante que los anticuerpos humanizados mantengan alta afinidad por el antígeno y otras propiedades biológicas favorables. Para lograr esta meta, los anticuerpos humanizados pueden prepararse mediante un proceso de análisis de las secuencias parentales y varios productos humanizados conceptuales usando modelos tridimensionales de las secuencias parentales y humanizadas. Los modelos tridimensionales de inmunoglobulinas están disponibles de manera común y son familiares para los expertos en la materia. Hay disponibles programas informáticos que ilustran y muestran estructuras conformacionales tridimensionales probables de secuencias de inmunoglobulina candidatas seleccionadas. La inspección de estas visualizaciones permite el análisis del papel probable de determinados residuos en el funcionamiento de la secuencia de inmunoglobulina candidata, es decir, el análisis de los residuos que influyen en la capacidad de la inmunoglobulina candidata para unirse a su antígeno. De este modo, los residuos de FR pueden seleccionarse y combinarse a partir de las secuencias receptoras e importadas de tal forma que la característica deseada del anticuerpo, tal como una afinidad aumentada por el antígeno (o los antígenos) diana, se maximiza, aunque son los residuos de CDR los que de manera directa y más sustancial influyen en la unión al antígeno.

Los anticuerpos murinos o los anticuerpos de otras especies pueden humanizarse o primarizarse usando cualquier técnica adecuada, conociéndose de sobra en la técnica una serie de técnicas adecuadas (véase, por ejemplo, Winter y Harris *Immunol Today* 14, 43-46 (1993) y Wright et al., *Crit. Reviews in Immunol.* 125-168 (1992)). El anticuerpo de interés puede modificarse mediante técnicas de ADN recombinante para sustituir los dominios C<sub>H1</sub>, C<sub>H2</sub>, C<sub>H3</sub>, bisagra, y/o el dominio marco conservado con la secuencia humana correspondiente (véase el documento WO 92/02190 y los documentos US 5.530.101, US 5.585.089, US 5.693.761, US 5.693.792, US 5.714.350, y US 5.777.085).

La humanización de anticuerpos también puede efectuarse siguiendo el método de Winter y colaboradores (Jones et al., *Nature* 321, 522-525 (1986), Riechmann et al., *Nature* 332, 323-327 (1988), Verhoeven et al., *Science* 239, 1534-1536 (1988)), mediante la sustitución de CDR de roedor o secuencias de CDR por las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano. Por consiguiente, dichos anticuerpos "humanizados" son, hasta cierto punto, anticuerpos quiméricos (documento US 4.816.567), en los que sustancialmente menos de un dominio variable humano se ha sustituido por la secuencia correspondiente de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados son típicamente anticuerpos humanos en los que algunos residuos de CDR y posiblemente algunos residuos de FR están sustituidos por residuos de sitios análogos en anticuerpos de roedores. Asimismo, se conoce en la técnica el uso de ADNc de Ig para la construcción de genes de inmunoglobulina quiméricos (véase, por ejemplo, Liu et al., *PNAS USA* 84, 3439 (1987) y *J. Immunol.* 139, 3521 (1987)). El ARNm se

aísla de un hibridoma u otra célula que produzca el anticuerpo y se usa para producir ADNc. El ADNc de interés puede amplificarse mediante la reacción en cadena de la polimerasa usando cebadores específicos (documentos US 4.683.195 y US 4.683.202). Como alternativa, se prepara y explora una biblioteca para aislar la secuencia de interés. La secuencia de ADN que codifica la región variable del anticuerpo se fusiona después a secuencias de región constante humanas. Las secuencias de regiones constantes humanas (así como las regiones variables) pueden encontrarse en Kabat et al., (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Publicación N.I.H. n.º 91-3242 y puede accederse a datos más recientes y relacionados en <http://www.biochem.ucl.ac.uk/~martin/abs/GeneralInfo.html>. La selección del isotipo estará guiada típicamente por las funciones efectoras deseadas, tales como la fijación a complemento, o la actividad en la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo. Los isotipos ejemplares son IgG1, IgG2, IgG3, y IgG4. Cualquiera de las dos regiones constantes de cadena ligera humana, kappa o lambda, pueden usarse. El anticuerpo quimérico humanizado puede producirse después mediante métodos convencionales.

Los anticuerpos de la presente invención pueden encontrarse en cualquier forma adecuada con respecto a la multimerización. Los anticuerpos y fragmentos de anticuerpo anti-CD38 pueden encontrarse al menos en forma heterotrimérica si no en formas multiméricas superiores, tales como aquellas asociadas con anticuerpos IgM. En otras realizaciones, un anticuerpo puede presentarse en forma de un dímero o monómero. Los anticuerpos monoméricos de la presente invención pueden, por ejemplo, modificarse mediante cualquier técnica adecuada para formar composiciones multiméricas.

Si se desea, puede intercambiarse la clase de un anticuerpo anti-CD38 de la presente invención mediante métodos conocidos. Por ejemplo, un anticuerpo de la presente invención que inicialmente era de IgM puede intercambiarse de clase a un anticuerpo de IgG de la presente invención. Además, pueden usarse técnicas de intercambio de clase para convertir una subclase de IgG a otra, por ejemplo, de IgG1 a IgG2. Por lo tanto, la función efectora de los anticuerpos de la presente invención puede cambiarse mediante intercambio de isotipo a, por ejemplo, un anticuerpo IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgD, IgA, IgE, o IgM para diversos usos terapéuticos.

En una realización, un anticuerpo de la presente invención es un anticuerpo de IgG1, por ejemplo, un isotipo IgG1,k o IgG1,λ. En otra realización, un anticuerpo de la presente invención es un anticuerpo de IgG3, por ejemplo, un isotipo IgG3,k o IgG3,λ. En otra realización, un anticuerpo de la presente invención es un anticuerpo de IgG4, por ejemplo, un isotipo IgG4,k o IgG4,λ. En otra realización, un anticuerpo de la presente invención es un anticuerpo de IgA1 o IgA2. En otra realización, un anticuerpo de la presente invención es un anticuerpo de IgM.

Los anticuerpos anti-CD38 pueden recuperarse a partir de bibliotecas de anticuerpos combinatorias recombinantes, tal como una biblioteca de presentación en fago de scFv, que pueden prepararse a partir de ADNc humanos de V<sub>L</sub> y V<sub>H</sub> preparados a partir de ARNm derivado de linfocitos humanos. Los métodos para preparar y explorar dichas bibliotecas se conocen en la técnica. Existe una serie de kits comercialmente disponibles para generar bibliotecas de presentación en fagos. También existen otros métodos y reactivos que pueden usarse para generar y explorar bibliotecas de presentación en fagos (véase, por ejemplo, los documentos US 5.223.409, WO 92/18619, WO 91/17271, WO 92/20791, WO 92/15679, WO 93/01288, WO 92/01047, WO 92/09690, Fuchs et al., Bio/Technology 9,1370-1372 (1991), Hay et al., Hum. Antibod. Hybridomas 3, 81-85 (1992), Huse et al., Science 246, 1275-1281 (1989), McCafferty et al., Nature 348, 552-554 (1990), Griffiths et al., EMBO J 12, 725-734 (1993), Hawkins et al., J. Mol. Biol. 226, 889-896 (1992), Clackson et al., Nature 352, 624-628 (1991), Gram et al., PNAS USA 89, 3576-3580 (1992), Garrad et al., Bio/Technology 9, 1373-1377 (1991), Hoogenboom et al., Nuc Acid Res 19, 4133-4137 (1991) y Barbas et al., PNAS USA 88, 7978-7982 (1991)). Las secuencias de ácido nucleico de V<sub>L</sub> y V<sub>H</sub> adecuadas pueden seleccionarse usando cualquier método adecuado. Por ejemplo, los ácidos nucleicos de V<sub>L</sub> y V<sub>H</sub> pueden seleccionarse mediante los métodos de impronta epitópica descritos en el documento WO 93/06213. Las bibliotecas de anticuerpos, tales como bibliotecas de scFv, pueden prepararse y explorarse usando métodos conocidos y adecuados (con péptidos que contienen CD38 humano como antígeno (o antígenos)), tales como aquellos descritos en, por ejemplo, el documento WO92/01047, McCafferty et al., Nature 348, 552-554 (1990) y Griffiths et al., EMBO J 12, 725-734 (1993). Dichas bibliotecas de anticuerpos y otras combinaciones de CD38BP (bibliotecas, agrupaciones, etc.) son características que implican anticuerpos de la presente invención que pueden usarse terapéuticamente para proporcionar una respuesta inmunitaria más exhaustiva; como herramientas en métodos de exploración para péptidos inmunogénicos, moléculas pequeñas, otros anticuerpos anti-CD38 (por ejemplo, mediante ensayos de competición), y similares; y/o métodos y composiciones diagnósticas (por ejemplo, un chip de inmunoensayo que comprende un panel de dichos anticuerpos opcionalmente en combinación con otros anticuerpos que puede generarse mediante técnicas estándar). Una vez que se han seleccionado los segmentos V<sub>L</sub> y V<sub>H</sub> humanos, pueden efectuarse experimentos de "mezcla y emparejamiento", en los que diferentes pares de los segmentos V<sub>L</sub> y V<sub>H</sub> seleccionados inicialmente se exploran respecto de la unión a péptidos que contienen CD38, para seleccionar combinaciones de pares de V<sub>L</sub>/V<sub>H</sub> deseables. Por ejemplo, puede determinarse la reactividad de los péptidos mediante ELISA u otros métodos de análisis de epítomos adecuados (véase, por ejemplo, Scott, J. K. y Smith, G. P. Science 249, 386-390 (1990), Cwirla et al., PNAS USA 87, 6378-6382 (1990), Felici et al., J. Mol. Biol. 222, 301-310 (1991) y Kuwabara et al., Nature Biotechnology 15, 74-78 (1997) para una descripción de dichas técnicas y principios). Pueden seleccionarse anticuerpos según su afinidad por el antígeno y/o sus cinéticas de disociación (velocidad de disociación) del antígeno (véase, por ejemplo, Hawkins et al., J. Mol. Biol. 226, 889-896 (1992)).

Para mejorar adicionalmente la calidad y/o la diversidad de los anticuerpos anti-CD38, pueden mutarse aleatoriamente los segmentos  $V_L$  y  $V_H$  de el par o los pares  $V_L/V_H$ , por ejemplo, dentro de la región CDR3 de  $V_H$  y/o  $V_L$ , en un proceso análogo al de la mutación somática *in vivo* responsable de la maduración por afinidad de los anticuerpos durante una respuesta inmunitaria natural. Esta maduración por afinidad *in vitro* puede llevarse a cabo amplificando las regiones  $V_H$  y  $V_L$  usando cebadores para la PCR complementarios a la CDR3 de  $V_H$  o a la CDR3 de  $V_L$ , respectivamente, "añadiéndose" dichos cebadores típicamente con una mezcla aleatoria de las cuatro bases nucleotídicas en determinadas posiciones, de tal forma que los productos de la PCR resultantes codifican segmentos  $V_H$  y  $V_L$  en los que se han introducido mutaciones aleatorias en las regiones CDR3 de  $V_H$  y/o  $V_L$ . Estos segmentos de  $V_H$  y  $V_L$  mutados de manera aleatoria pueden volverse a explorar respecto de la unión a péptidos que contienen CD38.

Después de la exploración, puede recuperarse el ácido nucleico que codifica un anticuerpo seleccionado a partir del paquete de presentación (por ejemplo, a partir del genoma del fago) y subclonarse en un vector adecuado mediante técnicas de ADN recombinante convencionales. Si se desea, dicho ácido nucleico que codifica un anticuerpo puede manipularse adicionalmente para crear otras formas de anticuerpo o de CD38BP. Para expresar un anticuerpo recombinante aislado mediante exploración de una biblioteca combinatoria, se clona típicamente un ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica el anticuerpo en un vector de expresión recombinante y se introduce en células hospedadoras adecuadas (células de mamífero, células de levadura, etc.) en condiciones adecuadas para la expresión del ácido nucleico y la producción del anticuerpo.

Los péptidos de anticuerpo de alta afinidad, tales como los fragmentos Fv monocatenarios (scFv) y Fab humanos, pueden aislarse también a partir de dichas bibliotecas usando una técnica de paneo en la que el antígeno de interés se inmoviliza sobre una superficie sólida, tal como placas de microtitulación o perlas (véase, por ejemplo, Barbas y Burton, Trends. Biotechnol. 14, 230-234 (1996) y Aujame et al., Hum. Antibodies 8, 155-68 (1997). La presentación en fagos de grandes bibliotecas vírgenes también posibilita el aislamiento de anticuerpos humanos directamente sin inmunización (véase, por ejemplo, de Haard et al., J. Biol. Chem. 274(26), 18218-18230 (1999)).

Los anticuerpos de la presente invención pueden comprender o ser usados para proporcionar anticuerpos anti-CD38 variantes. Un anticuerpo anti-CD38 "variante" es un anticuerpo que difiere de un anticuerpo parental (generado típicamente mediante inmunización) por una o más alteraciones de residuos de aminoácidos adecuadas, es decir, sustituciones, eliminaciones, inserciones, o adiciones terminales de secuencia, en las CDR u otras secuencias de  $V_H$  y/o  $V_L$  (siempre que se retenga al menos una cantidad sustancial de las características de unión a epítipo del anticuerpo parental, si no se mejora tras, dichos cambios).

Pueden efectuarse variaciones en una variante de anticuerpo en cada una de las regiones marco conservadas, el dominio constante, y/o las regiones variables (o una cualquiera o más CDR de las mismas) en un solo anticuerpo variante. Como alternativa, pueden efectuarse variaciones solo en una de las regiones marco conservadas, las regiones variables (o CDR individuales de las mismas), o el dominio constante en un anticuerpo. Las técnicas de mutagénesis de barrido de alanina, tales como las descritas por Cunningham y Wells, Science 244, 1081-1085 (1989), pueden emplearse para identificar residuos adecuados para la sustitución o eliminación en la generación de CD38BP que comprenden variantes de  $V_L$ ,  $V_H$ , o secuencias CDR particulares, aunque también pueden aplicarse otras técnicas de mutagénesis adecuadas. También pueden efectuarse múltiples sustituciones de aminoácidos y ensayarse usando métodos de mutagénesis y exploración conocidos, tales como aquellos divulgados por Reidhaar-Olson y Sauer, Science 241, 53-57 (1988) o Bowie y Sauer, PNAS USA 86, 2152-2156 (1989).

Por lo tanto, por ejemplo, pueden introducirse o insertarse en una variante de anticuerpo uno o más residuos de aminoácidos en o adyacentes a una o más de las regiones hipervariables de un anticuerpo parental, tal como en una o más CDR. Una variante de anticuerpo anti-CD38 puede comprender cualquier número de residuos de aminoácidos insertados, siempre que, de nuevo, se retenga al menos una cantidad sustancial de las características de unión a epítipo del anticuerpo parental. Por ejemplo, una variante de anticuerpo anti-CD38 puede comprender aproximadamente 1-30 residuos de aminoácidos insertados, por ejemplo, aproximadamente 1-10, tal como por ejemplo aproximadamente 2-10, por ejemplo 2-5 o tal como aproximadamente 1-5 residuos de aminoácidos insertados. Del mismo modo, por ejemplo, una variante de anticuerpo anti-CD38 puede comprender aproximadamente 1-30 residuos de aminoácidos eliminados, por ejemplo, aproximadamente 1-10, tal como por ejemplo aproximadamente 2-10, por ejemplo 2-5 o tal como aproximadamente 1-5 residuos de aminoácidos eliminados. Del mismo modo, por ejemplo, una variante de anticuerpo anti-CD38 puede comprender aproximadamente 1-30 residuos de aminoácidos sustituidos, por ejemplo, aproximadamente 1-10, tal como por ejemplo aproximadamente 2-10, por ejemplo 2-5 o tal como aproximadamente 1-5 residuos de aminoácidos sustituidos. Del mismo modo, por ejemplo, una variante de anticuerpo anti-CD38 puede comprender aproximadamente 1-30 residuos de secuencia de aminoácidos terminal añadidos, por ejemplo, aproximadamente 1-10, tal como por ejemplo aproximadamente 2-10, por ejemplo, 2-5 o tal como aproximadamente 1-5 residuos de secuencia de aminoácidos terminal añadidos. Una variante de anticuerpo también puede comprender una combinación de dos o más de dichas inserciones, eliminaciones, sustituciones y residuos de secuencia de aminoácidos terminal añadidos, siempre que la variante posea al menos una proporción sustancial de la afinidad, especificidad y/o selectividad de los anticuerpos parentales, con respecto a uno o más epítopos de CD38.

Las consideraciones acerca de la selección de variantes de anticuerpo (por ejemplo, conservación de características funcionales de residuos de aminoácido, conservación de residuos de aminoácido basándose en las características hidropáticas, y/o conservación de residuos de aminoácidos basándose en el peso/tamaño), se describen en otras partes del presente documento. Normalmente, las alteraciones de secuencia de aminoácidos, tales como variaciones de sustitución conservativa, de manera deseable no cambian las características estructurales de la secuencia parental (por ejemplo, un reemplazo de aminoácidos no debe tender a alterar la estructura secundaria que caracteriza la función de la secuencia parental). Los ejemplos de estructuras polipeptídicas secundarias y terciarias reconocidos en la técnica se describen en, por ejemplo, *Proteins, Structures and Molecular Principles* (Creighton, Ed., W. H. Freeman and Company, Nueva York (1984)), *Introduction to Protein Structure* (C. Branden y J. Tooze, eds., Garland Publishing, Nueva York, N.Y. (1991)) y Thornton et al., *Nature* 354, 105 (1991). Los principios adicionales relevantes para el diseño y construcción de variantes peptídicas se discuten, por ejemplo, en Collinet et al., *J Biol Chem* 275(23), 17428-33 (2000).

Las variantes de secuencia de aminoácidos de un anticuerpo pueden obtenerse mediante la introducción de cambios de nucleótidos adecuados en el ácido nucleico que codifica el anticuerpo (por ejemplo, mediante mutagénesis de sitio dirigido) o mediante síntesis peptídica química. Dichas variantes incluyen, por ejemplo, eliminaciones de, y/o inserciones en y/o sustituciones de y/o adiciones terminales de secuencia de residuos dentro de las secuencias de aminoácidos de los anticuerpos de los ejemplos en el presente documento. Cualquier combinación de eliminaciones, inserciones y sustituciones puede efectuarse para lograr una variante deseada, siempre que la variante posea al menos una proporción sustancial de las características de unión a epítipo del anticuerpo parental. Los cambios de secuencia de aminoácidos, con respecto a un anticuerpo parental, también pueden alterar procesos postraduccionales del anticuerpo variante con respecto a un anticuerpo parental, tal como mediante el cambio del número o posición de los sitios de glucosilación.

Las variantes de anticuerpos de la presente invención pueden comprender alteraciones en la región hipervariable, tal como en las CDR. Los ejemplos de CD38BP que comprenden dichas variantes de CDR se describen en otras partes del presente documento, y, tal como se han descrito anteriormente, dichos CD38BP pueden ser anticuerpos.

Las variantes de anticuerpos de la presente invención pueden comprender alteraciones de las regiones marco conservadas (FR), que se encuentran fuera de la región hipervariable, por ejemplo, en la región Fc, pudiéndose asociar dichas alteraciones con propiedades ventajosas, tales como el cambio de propiedades funcionales o farmacocinéticas de los anticuerpos. Por ejemplo, una sustitución u otra modificación (inserción, eliminación, adición terminal de secuencia o una combinación de cualquiera de las mismas) en una región marco conservada o dominio constante puede asociarse con un aumento en la semivida de la variante de anticuerpo respecto del anticuerpo parental, o puede efectuarse para alterar la inmunogenicidad de la variante de anticuerpo respecto del anticuerpo parental, para proporcionar un sitio para la unión covalente o no covalente a otra molécula, o para alterar propiedades tales como la fijación a complemento, por ejemplo, dando como resultado una reducción o un aumento de la unión a C1q y la CDC o de la unión a FcγR y la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC). Por ejemplo, pueden efectuarse sustituciones en uno o más de los residuos de aminoácidos 234, 235, 236, 237, 297, 318, 320, y 322 de la región constante de cadena pesada, provocando de este modo una alteración en una función efectora a la vez que se retiene la unión al antígeno en comparación con el anticuerpo no modificado, véanse, por ejemplo, los documentos US 5.624.821 y US 5.648.260. Además, puede hacerse referencia al documento WO 00/42072 que divulga anticuerpos con regiones Fc alteradas que aumentan la ADCC, y el documento WO 94/29351 que divulga anticuerpos que tienen mutaciones en la región N-terminal del dominio C<sub>H</sub>2 que alteran la capacidad de los anticuerpos para unirse a FcRI y de este modo reducen la capacidad de los anticuerpos para unirse a C1q que a su vez reduce la capacidad de los anticuerpos para fijarse a complemento. Además, Shields et al., *J. Biol. Chem.* 276, 6591-6604 (2001) enseña variantes de combinación, que mejoran la unión a FcγRIII, por ejemplo, T256A/S298A, S298A/E333A, y S298A/E333A/K334A.

También puede mejorarse la semivida *in vivo* de los anticuerpos modificando el epítipo de receptor salvaje del dominio constante de Ig o un dominio constante similar a Ig de tal forma que la molécula no comprende un dominio C<sub>H</sub>2 intacto o una región Fc de Ig intacta, véanse, por ejemplo, los documentos US 6.121.022 y US 6.194.551. Además, puede aumentarse la semivida *in vivo* efectuando mutaciones en la región Fc, por ejemplo, sustituyendo leucina por treonina en la posición 252, serina por treonina en la posición 254, o fenilalanina por treonina en la posición 256, véase, por ejemplo, el documento US 6.277.375.

Los anticuerpos anti-CD38 de la invención pueden ser anticuerpos anti-CD38 variantes en donde los epítopos de células T potenciales en el anticuerpo se han reducido o eliminado mediante diseño racional. Por lo tanto, por ejemplo, en una realización, la presente invención proporciona un anticuerpo anti-CD38 "desinmunizado" en el que los epítopos de células T potenciales se han eliminado. El diseño y construcción de anticuerpos anti-CD38 desinmunizados puede lograrse mediante cualquier técnica conocida adecuada (véase, por ejemplo, el documento WO9852976 referente a métodos para preparar anticuerpos desinmunizados). Se espera que la inmunogenicidad en seres humanos se elimine o reduzca sustancialmente cuando dichos CD38BP (por ejemplo, anticuerpos variantes de anti-CD38) se administran.

Otras mutaciones de la región marco conservada pueden incluir cambios de secuencia que pueden reducir la

susceptibilidad a la proteólisis, reducir la susceptibilidad a la oxidación, y/o conferir o modificar otras propiedades fisicoquímicas o funcionales en el anticuerpo variante asociado.

- 5 Las variaciones de secuencia de aminoácidos en la región marco conservada pueden dar también como resultado patrones de glucosilación alterados en el anticuerpo variante respecto de un anticuerpo parental. Por alteración se entiende la eliminación de uno o más residuos de carbohidrato hallados en el anticuerpo parental, y/o la adición de uno o más sitios de glucosilación que no están presentes en el anticuerpo parental. La glucosilación de anticuerpos es generalmente unida a N o unida a O. Unida a N se refiere a la unión del residuo de carbohidrato en la cadena lateral de un residuo de asparagina. Las secuencias de tripéptido asparagina-X-serina y asparagina-X-treonina, donde X es un aminoácido excepto prolina, son secuencias de reconocimiento comunes para la unión enzimática del residuo de carbohidrato a la cadena lateral de asparagina. Por lo tanto, la presencia de una de estas secuencias de tripéptido en un polipéptido puede crear un sitio potencial de glucosilación. La glucosilación unida a O se refiere a la unión de azúcares, tales como N-acetilgalactosamina, galactosa, o xilosa a un hidroxiaminoácido, más comúnmente serina o treonina, aunque también pueden usarse 5-hidroxiprolina o 5-hidroxilisina. La adición de sitios de glucosilación al anticuerpo puede lograrse convenientemente alterando la secuencia de aminoácidos de tal forma que contiene una o más de las secuencias de tripéptido anteriormente descritas (por ejemplo, sitios de glucosilación unidos a N). La alteración también puede producirse mediante la adición de, o la sustitución con, uno o más residuos de serina o treonina en la secuencia del anticuerpo original (para sitios de glucosilación unidos a O).
- 10
- 15
- 20 Los anticuerpos también pueden expresarse en un transfectoma que no añade la unidad de fucosa unida normalmente al carbohidrato unido a Asn en la posición 297 de Fc para potenciar la afinidad de Fc por FcγRIII que a su vez dará como resultado una ADCC aumentada de los anticuerpos en presencia de células NK, véase, por ejemplo, Shield et al., *J. Biol. Chem.* 277, 26733 (2002). Otros métodos para modificar la glucosilación enfocándose en la fucosilación se describen en el documento WO 00/61739 de Kyowa. Además, puede efectuarse modificación de la galactosilación para modificar la CDC. Puede hacerse referencia adicional al documento WO 99/54342 y a Umana et al., *Nat. Biotechnol.* 17, 176 (1999) que divulga una línea celular de CHO modificada para expresar GntIII que da como resultado la expresión de anticuerpos monoclonales con glucoformas alteradas y actividad de ADCC mejorada.
- 25
- 30 Otras técnicas potencialmente adecuadas para preparar nuevos anticuerpos anti-CD38 incluyen mutagénesis andante de CDR, reordenamiento de cadenas de anticuerpo, "mutagénesis parsimoniosa" (Balint y Larrick, *Gene* 137, 109-118 (1993)), y otras técnicas de maduración por afinidad (véase, por ejemplo, Wu et al., *PNAS USA* 95, 6037-42 (1998)). Los procedimientos de clonación de repertorio también pueden ser útiles para la producción de anticuerpos variantes (véase, por ejemplo, el documento WO 96/33279).
- 35
- 40 Existen una serie de técnicas conocidas para generar variantes de CDR, pudiendo usarse cualquier técnica adecuada o combinación de las mismas en el contexto de la presente invención para generar variantes de las CDR de los anticuerpos de los ejemplos. Los ejemplos de dichas técnicas incluyen la eliminación de residuos no esenciales, tal como se describe en Studnicka et al., *Protein Engineering* 7, 805-814 (1994) (véase también Soderlind et al., *Immunotechnology* 4(3-4), 279-85 (1999), mutagénesis andante de CDR y otras técnicas de maduración por afinidad artificiales (véase, por ejemplo, Yang et al., *Journal of Molecular Biology* 254(3), 392-403 (1995), técnicas de reordenamiento de CDR en donde típicamente, las CDR se amplifican a partir de un conjunto diverso de moldes génicos que comprenden opcionalmente oligonucleótidos sintéticos, las regiones constantes de las V<sub>L</sub>, V<sub>H</sub>, y/o CDR se amplifican, y se mezclan los diversos fragmentos (en formato monocatenario o bicatenario) y se ensamblan mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para producir un conjunto de productos génicos codificantes de fragmentos de anticuerpo que portan CDR reordenadas introducidas en la región marco conservada maestra, que se amplifica usando cebadores externos que se hibridan en sitios más allá de los sitios de restricción insertados para asegurar la producción de productos de longitud completa, que se insertan en un vector seleccionado y se usan para expresar proteínas que contienen CDR variantes. Puede determinarse la estructura adecuada mediante la superposición de las estructuras variantes/miméticas y aquellas de las secuencias parentales, por ejemplo, mediante la comparación de las estructuras de solución de RMN. Los métodos útiles para el diseño racional de variantes de secuencia de CDR se describen, por ejemplo, en los documentos WO 91/09967 y WO 93/16184. Se proporcionan ejemplos adicionales de dichos métodos en otras partes del presente documento.
- 45
- 50
- 55 Los anticuerpos de la presente invención incluyen fragmentos de anticuerpos (incluyendo anticuerpos variantes) de la presente invención, teniendo dichos fragmentos la capacidad de unirse a CD38 (fragmentos de unión a CD38). Por lo tanto, los anticuerpos de la invención incluyen moléculas similares a anticuerpo que comprenden menos de la estructura tetramérica completa asociada con los anticuerpos de origen natural. Un fragmento de anticuerpo puede ser cualquier péptido que comprende una parte de un anticuerpo de longitud completa, generalmente la región de unión a antígeno o la variable del mismo (esto incluye, por ejemplo, fragmentos de anticuerpos humanizados que comprenden CDR de un anticuerpo de la presente invención). En una realización, un fragmento de anticuerpo se refiere a un péptido que consiste esencialmente o que consiste únicamente en una parte de una molécula de anticuerpo. En una realización, la presente invención proporciona un fragmento de anticuerpo que comprende al menos una parte de un dominio variable de cadena pesada que contiene las tres CDR de V<sub>H</sub> de un anticuerpo de la presente invención y también comprende las tres CDR de V<sub>L</sub> de un anticuerpo de la presente invención, en donde el dominio variable de cadena pesada, y opcionalmente el dominio variable de cadena ligera, se fusiona(n)
- 60
- 65

opcionalmente a un residuo adicional, tal como un dominio constante de inmunoglobulina. Pueden añadirse secuencias de dominio constante a las secuencias de cadena ligera y/o de cadena pesada para formar especies con cadenas ligeras y/o pesadas de longitud parcial. Las regiones constantes, o las partes de las mismas, de un isotipo de anticuerpo pueden usarse para este fin, incluyendo regiones constantes de IgG, IgM, IgA, IgD, e IgE.

5 Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo de unión a CD38 incluyen fragmentos Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, y Fv. Un fragmento de anticuerpo en el contexto de la presente invención también puede incluir un péptido que comprende las CDR de un anticuerpo de la invención, y similares. En una realización, la presente invención proporciona un fragmento de anticuerpo que comprende una primera cadena de polipéptido que comprende las CDR de cadena pesada de un anticuerpo de la invención y una segunda cadena de polipéptido que comprende las CDR de cadena ligera de un anticuerpo de la invención, en donde las dos cadenas de polipéptido se unen covalentemente mediante uno o más enlaces disulfuro intercadena. En una realización, la presente invención proporciona un fragmento de anticuerpo bicatenario que tiene dichas características en donde el fragmento de anticuerpo se selecciona entre fragmentos Fab, Fab', Fab'-SH, Fv, y/o F(ab')<sub>2</sub>.

15 Los anticuerpos pueden fragmentarse usando técnicas convencionales, y puede explorarse la utilidad de los fragmentos del mismo modo al descrito anteriormente para los anticuerpos completos. Por ejemplo, pueden generarse fragmentos F(ab')<sub>2</sub> tratando al anticuerpo con pepsina. El fragmento F(ab')<sub>2</sub> resultante puede tratarse para reducir los puentes disulfuro para producir fragmentos Fab'. Los fragmentos Fab pueden obtenerse mediante el tratamiento de un anticuerpo IgG con papaína; Los fragmentos Fab' pueden obtenerse mediante digestión con pepsina de un anticuerpo IgG. También puede producirse un fragmento Fab' uniendo el Fab' descrito más adelante a través de un enlace tioéter o un enlace disulfuro. Un fragmento Fab' es un fragmento de anticuerpo obtenido mediante el corte de un enlace disulfuro de la región bisagra del F(ab')<sub>2</sub>. Puede obtenerse un fragmento Fab' tratando un fragmento F(ab')<sub>2</sub> con un agente reductor, tal como ditiotreitól. También pueden generarse péptidos de fragmentos de anticuerpo mediante la expresión de ácidos nucleicos que expresan dichos péptidos en células recombinantes (véase, por ejemplo, Evans et al., J. Immunol. Meth. 184, 123-38 (1995)). Por ejemplo, un gen quimérico que codifica una porción de un fragmento F(ab')<sub>2</sub> podría incluir secuencias de ADN que codifican el dominio C<sub>H</sub>1 y la región bisagra de la cadena H, seguido de un codón de parada traduccional para producir dicha molécula de fragmento de anticuerpo truncada.

30 Los anticuerpos de la invención también incluyen anticuerpos univalentes y anticuerpos monocatenarios. Los anticuerpos monocatenarios son péptidos en los que están conectadas las regiones Fc de cadena pesada y ligera. En una realización, la presente invención proporciona un Fc monocatenario (scFv) en donde las cadenas ligera y pesada en el Fv de un anticuerpo anti-CD38 de la presente invención se unen con un enlazador peptídico flexible (típicamente de aproximadamente 10, 12, 15 o más residuos de aminoácidos) en una sola cadena peptídica. Los métodos para producir dichos anticuerpos se describen en, por ejemplo, el documento US 4.946.778, Pluckthun en The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg y Moore eds. Springer-Verlag, Nueva York, págs. 269-315 (1994), Bird et al., Science 242, 423-426 (1988), Huston et al., PNAS USA 85, 5879-5883 (1988) y McCafferty et al., Nature 348, 552-554 (1990). El anticuerpo monocatenario puede ser monovalente, si solo se emplean una V<sub>H</sub> y una V<sub>L</sub>, bivalente, si se emplean dos V<sub>H</sub> y dos V<sub>L</sub>, o polivalente, si se emplean más de dos V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub>.

45 En una realización de la presente invención, puede derivatizarse o unirse el anticuerpo a otra molécula funcional, por ejemplo, otro péptido o proteína (tal como un fragmento Fab') para generar una molécula biespecífica o multiespecífica que se une a múltiples sitios de unión o epítopos diana. Por ejemplo, un anticuerpo de la presente invención puede unirse funcionalmente (por ejemplo, mediante acoplamiento peptídico, fusión genética, asociación no covalente u de otra manera) con una o más moléculas de unión, tales como otro anticuerpo, péptido o mimético de unión.

50 Por consiguiente, la presente invención incluye moléculas biespecíficas y multiespecíficas que comprenden al menos una primera especificidad de unión por CD38 y una segunda especificidad de unión por un segundo epítipo diana. En una realización de la presente invención, el segundo epítipo diana es un receptor Fc, por ejemplo, FcγRI humano (CD64) o un receptor Fcα humano (CD89), o un receptor de célula T, por ejemplo, CD3. En una realización, la presente invención proporciona moléculas biespecíficas y multiespecíficas capaces de unirse tanto a FcγR, FcαR como a células efectoras que expresan FcεR (por ejemplo, monocitos, macrófagos o células polimorfonucleares (PMN)), y a células diana que expresan CD38. Estas moléculas biespecíficas y multiespecíficas se dirigen las células que expresan CD38 a células efectoras y desencadenan las actividades celulares efectoras mediadas por receptor Fc, tales como la fagocitosis de las células que expresan CD38, citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC), liberación de citocinas, o generación del anión superóxido.

60 Las moléculas biespecíficas y multiespecíficas de la presente invención pueden incluir además una tercera especificidad de unión, además de una especificidad de unión anti-Fc y una especificidad de unión anti-CD38. En una realización, la tercera especificidad de unión es una parte anti-factor de potenciación (EF), por ejemplo, una molécula que se une a una proteína de superficie implicada en la actividad citotóxica y por lo tanto aumenta la respuesta inmunitaria contra la célula diana. La "parte anti-factor de potenciación" puede ser un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo funcional o un ligando que se une a una molécula dada, por ejemplo, un antígeno o un receptor, y por lo tanto da como resultado una potenciación del efecto de los determinantes de unión por el receptor

Fc o el antígeno de célula diana. La "parte anti-factor de potenciación" puede unirse a un receptor Fc o a un antígeno de célula diana. Como alternativa, la parte anti-factor de potenciación puede unirse a una entidad que es diferente de la entidad a la que se unen las especificidades de unión primera y segunda. Por ejemplo, la parte anti-factor de potenciación puede unirse a una célula T citotóxica (por ejemplo, a través de CD2, CD3, CD8, CD28, CD4, CD40, ICAM-1 u otra célula inmunitaria que de como resultado una respuesta inmunitaria aumentada contra la célula diana).

En una realización, las moléculas biespecíficas y multiespecíficas de la presente invención comprenden como especificidad de unión al menos un anticuerpo adicional, incluyendo, por ejemplo, un Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fv, o un scFv. El anticuerpo adicional también puede ser un dímero de cadena ligera o de cadena pesada, o cualquier fragmento mínimo del mismo, tal como un Fv o una construcción monocatenaria tal como se describe en Ladner et al., en el documento US 4.946.778. El anticuerpo también puede ser una proteína de fusión de dominio de unión de inmunoglobulina, tal como se divulga en los documentos US 2003/0118592 y US 2003/0133939.

En una realización, la especificidad de unión por un receptor Fc se proporciona por un anticuerpo monoclonal humano, cuya unión no se bloquea por la inmunoglobulina G humana (IgG). Tal como se usa en el presente documento, la expresión "receptor de IgG" se refiere a cualquiera de los ocho genes de cadena  $\gamma$  y ubicados en el cromosoma 1. Estos genes codifican un total de doce isoformas de receptor transmembrana o solubles que se agrupan en tres clases de receptor Fc\*: Fc $\gamma$ RI (CD64), Fc $\gamma$ RII (CD32), y Fc $\gamma$ RIII (CD16). En una realización, el receptor Fc $\gamma$  es un Fc $\gamma$ RI humano de alta afinidad. La producción y caracterización de estos anticuerpos monoclonales se describen por Fanger et al., el documento WO 88/00052 y en el documento US 4.954.617. Estos anticuerpos se unen a un epítipo de Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RII o Fc $\gamma$ RIII en un sitio que es distinto al sitio de unión de Fc $\gamma$  del receptor y, por lo tanto, su unión no se bloquea sustancialmente por los niveles fisiológicos de IgG. Los anticuerpos anti-Fc $\gamma$ RI específicos útiles en la presente invención son mAb 22, mAb 32, mAb 44, mAb 62 y mAb 197. En otras realizaciones, el anticuerpo anti-receptor Fc $\gamma$  es una forma humanizada de mAb 22 (H22). La producción y caracterización del anticuerpo H22 se describe en Graziano, R.F. et al., *J. Immunol.* 155(10), 4996-5002 (1995) y en el documento WO 94/10332. La línea celular que produce el anticuerpo H22 se depositó en la Colección Americana de Cultivos Tipo el 4 de noviembre de 1992 con el número de registro HA022CL1 y tiene el número de referencia CRL 11177.

En una realización, la especificidad de unión por un receptor Fc se proporciona por un anticuerpo que se une a un receptor de IgA humano, por ejemplo, un receptor Fc $\alpha$  (Fc $\alpha$ I (CD89)), cuya unión, en una realización, no se bloquea por inmunoglobulina A humana (IgA). La expresión "receptor de IgA" pretende incluir el producto génico de un gen  $\alpha$  (Fc $\alpha$ RI) ubicado en el cromosoma 19. Se sabe que este gen codifica varias isoformas transmembranas cortadas y empalmadas de manera alternativa de 55 a 110 kDa. Fc $\alpha$ RI (CD89) se expresa de manera constitutiva en monocitos/macrófagos, granulocitos eosinofílicos y neutrofilicos, pero no en poblaciones de células efectoras. Fc $\alpha$ RI tiene una afinidad media tanto para IgA1 como para IgA2, que aumenta tras su exposición a citocinas, tales como G-CSF o GM-CSF (Morton, H.C. et al., *Critical Reviews in Immunology* 16, 423-440(1996)). Cuatro anticuerpos monoclonales específicos para Fc $\alpha$ RI, identificados como A3, A59, A62 y A77, que se unen a Fc $\alpha$ RI fuera del dominio de unión a ligando de IgA, se han descrito (Monteiro, R.C. et al., *J. Immunol.* 148, 1764 (1992)).

Fc $\alpha$ RI, Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RII and Fc $\gamma$ RIII, especialmente Fc $\gamma$ RII y Fc $\gamma$ RIII, son ejemplos de receptores desencadenantes para su uso en la presente invención debido a que (1) se expresan principalmente en células efectoras inmunitarias, por ejemplo, monocitos, PMN, macrófagos y células dendríticas; (2) se expresan a altos niveles (por ejemplo, 5.000-100.000 por célula); (3) son mediadores de actividades citotóxicas (por ejemplo, ADCC, fagocitosis); y (4) median la presentación de antígenos potenciada de los antígenos, incluyendo autoantígenos, dirigidos a los mismos.

En una realización, un anticuerpo de la presente invención es un anticuerpo o una molécula similar a anticuerpo multiespecífica anti-CD38, siendo un ejemplo particular del mismo un anticuerpo biespecífico que comprende al menos un par de cadenas de secuencia de V<sub>H</sub> y secuencia de V<sub>L</sub> específicas para un epítipo comprendido al menos en parte en CD38 y un segundo al menos un par de cadenas de secuencia V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> específicas para un segundo epítipo. Las secuencias de V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> en un anticuerpo biespecífico pueden completar las secuencias de V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> correspondientes a las regiones V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub>, las secuencias variantes de V<sub>H</sub> y/o V<sub>L</sub>, o las partes adecuadas de las regiones V<sub>H</sub> y/o V<sub>L</sub> de anti-CD38, tal como una combinación adecuada de secuencias de CDR y otras secuencias suficientes para proporcionar unión a los epítopos de interés.

Las moléculas de anticuerpo biespecífico ejemplares comprenden (i) dos anticuerpos, uno con una especificidad para CD38 y otro para una segunda diana que se conjugan entre sí, (ii) un anticuerpo individual que tiene una cadena específica para CD38 y una segunda cadena específica para una segunda molécula, y (iii) un anticuerpo monocatenario que tiene especificidad para CD38 y una segunda molécula. Normalmente, la segunda diana/segunda molécula es una molécula distinta de CD38. En una realización, la segunda molécula es antígeno de cáncer/antígeno asociado a tumores, tal como antígeno carcinoembrionario (CEA), antígeno específico de próstata (PSA), RAGE (antígeno renal),  $\alpha$  fetoproteína, CAMEL (antígeno reconocido por CTL en melanoma), antígenos CT (tales como MAGE-B5, -B6, -C2, -C3, y D; Mage-12; CT10; NY-ESO-1, SSX-2, GAGE, BAGE, MAGE, y SAGE), antígenos de mucina (por ejemplo, MUC1, mucina-CA125, etc.), antígenos de gangliosidos, tirosinasa, gp75, C-myc, Mart1, MelanA, MUM-1, MUM-2, MUM-3, HLA-B7, y Ep-CAM. En una realización, la segunda molécula es una

integrina asociada con el cáncer, tal como integrina  $\alpha 5\beta 3$ . En una realización, la segunda molécula es un factor angiogénico u otro factor de crecimiento asociado con el cáncer, tal como un factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), un factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), factor de crecimiento epidérmico (EGF), receptor de factor de crecimiento epidérmico (EGFR), angiogenina, y receptores de los mismos, en particular, receptores asociados con la progresión del cáncer (por ejemplo, uno de los receptores HER1-HER4). Otras proteínas asociadas con la progresión del cáncer descritas en el presente documento también pueden ser segundas moléculas adecuadas. En una realización, la segunda molécula es una molécula expresada en la superficie de células de mieloma múltiple, tales como CD138.

10 En una realización, un anticuerpo biespecífico de la presente invención es un diacuerpo.

Los anticuerpos biespecíficos también incluyen anticuerpos reticulados o "heteroconjugados". Por ejemplo, uno de los anticuerpos en un heteroconjugado puede acoplarse a avidina y el otro a biotina. Se han propuesto dichos anticuerpos para, por ejemplo, dirigir células del sistema inmune a células no deseadas (véase, por ejemplo, el documento US 4.676.980). Los anticuerpos heteroconjugados pueden prepararse usando cualquier método de reticulación conveniente. Se conocen bien en técnica agentes reticulantes peptídicos y técnicas, y los ejemplos de dichos agentes y técnicas se divulgan, por ejemplo, en el documento US 4.676.980.

20 Por lo tanto, aunque la descripción en el presente documento puede centrarse en los anticuerpos, debe entenderse que las realizaciones y características de los anticuerpos pueden aplicarse igualmente a fragmentos de anticuerpo, tales como fragmentos Fab, fragmentos Fab', y péptidos scFv, péptidos similares a anticuerpos (péptidos que comprenden una CDR), anticuerpo bi y multiespecíficos y otros CD38BP, según sea adecuado, siempre que el anticuerpo de la presente invención retenga al menos una proporción sustancial de las propiedades de unión a antígeno del anticuerpo completo correspondiente. En algunos casos, los fragmentos de anticuerpo pueden asociarse con una menor afinidad de unión a antígeno, pero pueden ofrecer otras características ventajosas que puedan superar cualquier pérdida de afinidad similar.

Los anticuerpos anti-CD38 de acuerdo con la presente invención puede seleccionarse basándose en su capacidad para proporcionar la capacidad de fijación a complemento, o no. Existe un número de isotipos de anticuerpos que son capaces de fijarse a complemento y de CDC, incluyendo, sin limitación, los siguientes: IgM murina, IgG2a murina, IgG2b murina, IgG3 murina, IgM humana, IgG1 humana, e IgG3 humana. Aquellos isotipos que no incluyen, sin limitación, IgG2 humana e IgG4 humana. Se conocen en la técnica la determinación de isotipo y otros métodos para modificar la fijación a complemento y las características funcionales de CDC de los anticuerpos.

35 Los CD38BP, tal como se describen en el presente documento, también incluyen inmunoadhesinas, que son moléculas en donde una o más CDR de un anticuerpo anti-CD38 se asocian covalente o no covalentemente con la molécula. Una inmunoadhesina puede incorporar las CDR como parte de una cadena polipeptídica más larga, puede unirse covalentemente las CDR a otra cadena polipeptídica, o pueden incorporar de manera no covalente las CDR. Las CDR permiten que la inmunoadhesina se una específicamente a un CD38.

40 Los anticuerpos de la presente invención también pueden proporcionarse en forma de proteínas de fusión de CD38BP. Las proteínas de fusión de CD38BP pueden comprender cualquier secuencia o combinación de secuencias de aminoácidos adecuada que sean específicas y/o selectivas para al menos un dominio que está comprendido al menos parcialmente dentro de CD38 (por ejemplo, un dominio  $V_H$ , un dominio  $V_L$  o las CDR particulares del mismo de un anticuerpo anti-CD38) y al menos una secuencia de aminoácidos no homóloga y sustancialmente no similar (por ejemplo, menor de aproximadamente un 40%, menor de aproximadamente un 35%, menor de aproximadamente un 30%, menor de aproximadamente un 25%, o menor de aproximadamente un 20% de identidad de secuencia de aminoácidos respecto de la secuencia específica/selectiva para CD38) que confiere una función y/o característica biológica detectable a la proteína de fusión que no puede atribuirse únicamente a la secuencia específica/selectiva de CD38 (por ejemplo, semivida *in vivo* aumentada, fluorescencia, direccionamiento aumentado a un tipo de célula particular, etc.). Las secuencias funcionales de dicha proteína de fusión pueden separarse mediante enlazadores flexibles. Las secuencias secundarias también pueden derivarse de péptidos citotóxicos o apoptóticos. Las secuencias secundarias también pueden conferir propiedades diagnósticas. Los ejemplos de dichas secuencias incluyen aquellas derivadas de enzimas fácilmente visualizadas, tales como peroxidasa de rábano picante.

60 Las proteínas de fusión CD38BP también pueden caracterizarse por que comprenden un marcador epitópico. Una secuencia de marcador epitópico es una secuencia de aminoácidos que tiene suficientes residuos para proporcionar un epítipo contra los que puede producirse un anticuerpo, en el contexto del CD38BP, aunque es lo suficientemente corto como para no interferir sustancialmente con la actividad (selectividad, especificidad, afinidad, y/o actividad biológica) del CD38BP (en comparación con un CD38BP parental que carece del marcador epitópico). Un marcador epitópico es de manera deseable lo suficientemente único como para que el anticuerpo anti-marcador epitópico no reaccione sustancialmente de manera cruzada con otros epítipos. Los polipéptidos marcadores adecuados tienen generalmente al menos aproximadamente 6 residuos de aminoácidos y normalmente entre aproximadamente 8-50 residuos de aminoácidos (por ejemplo, aproximadamente 9-30 residuos). Los ejemplos de marcadores epitópicos incluyen el polipéptido marcador HA de la gripe y su anticuerpo 12CA5 (Field et al., Mol. Cell. Biol. 8, 2159-2165

(1988)); el marcador c-myc y los anticuerpos 8F9, 3C7, 6E10, G4, B7 y 9E10 para los mismos (Evan et al., Mol. Cell. Biol. 5(12), 3610-3616 (1985)) y el marcador de glucoproteína D (gD) del virus *Herpes simplex* y su anticuerpo (Paborsky et al., Protein Engineering 3(6), 547-553 (1990)). En determinadas realizaciones, el marcador epitópico es un "epítipo de unión a receptor salvaje". Tal como se usa en el presente documento, la expresión "epítipo de unión a receptor salvaje" se refiere a un epítipo de la región Fc de una molécula de IgG (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, o IgG4) que es responsable de aumentar la semivida en suero *in vivo* de la molécula de IgG.

Los anticuerpos anti-CD38 de la presente invención se pueden usar para producir derivados de anticuerpo anti-CD38. Un derivado de anticuerpo comprende un anticuerpo en el que uno o más de los residuos de aminoácido del anticuerpo se han modificado químicamente (por ejemplo, mediante alquilación, acilación, formación de éster, o formación de amida) o asociarse covalentemente con uno o más sustituyentes heterólogos (por ejemplo, un sustituyente lipófilo, un residuo de PEG, una cadena lateral de péptido unida mediante un residuo enlazador orgánico adecuado, etc.). El anticuerpo también puede conjugarse a un residuo terapéutico, tal como una citotoxina, un fármaco quimioterapéutico, un inmunosupresor, o un radioisótopo (lo que se denomina un inmunoconjugado). En general, los CD38BP descritos en el presente documento, tal como los anticuerpos anti-CD38 de la invención, pueden modificarse mediante la inclusión de cualquier número adecuado de dichos aminoácidos modificados y/o asociaciones con dichos sustituyentes conjugados. La adecuación en este contexto general se determina mediante la capacidad para retener al menos sustancialmente la selectividad y/o especificidad por CD38 asociada con el CD38BP parental no derivatizado. La inclusión de uno o más aminoácidos modificados puede ser ventajosa en, por ejemplo, el aumento de la semivida en suero del polipéptido, (b) la reducción de la antigenicidad del polipéptido, o (c) aumentar la estabilidad de almacenamiento del polipéptido. Los aminoácidos se modifican, por ejemplo, de manera co-traducciona l o pos-traducciona l durante la producción recombinante (por ejemplo, glucosilación unida a N en motivos N-X-S/T durante la expresión en células de mamífero) o modificados por medios sintéticos. Los ejemplos no limitantes de un aminoácido modificado incluyen un aminoácido glucosilado, un aminoácido sulfatado, un aminoácido prenilado (por ejemplo, farnesilado, geranilado), un aminoácido acetilado, un aminoácido acilado, un aminoácido PEGilado, un aminoácido biotinilado, un aminoácido carboxilado, un aminoácido fosforilado, y similares. Las referencias adecuadas para guiar a un experto en la materia en la modificación de aminoácidos son extensas a lo largo de la bibliografía. Se encuentran protocolos ejemplares en Walker (1998) Protein Protocols On Cd-Rom, Humana Press, Towata, NJ. El aminoácido modificado puede seleccionarse entre un aminoácido glucosilado, un aminoácido PEGilado, un aminoácido farnesilado, un aminoácido acetilado, un aminoácido biotinilado, un aminoácido / conjugado a un residuo lipídico, y un aminoácido conjugado a un agente derivatizante orgánico.

Además, los anticuerpos pueden modificarse químicamente mediante conjugación covalente a un polímero para, por ejemplo, aumentar su semivida circulante. Los polímeros ejemplares, y los métodos para unirlos a péptidos, se ilustran en, por ejemplo, los documentos US 4.766.106, US 4.179.337, US 4.495.285 y US 4.609.546. Los polímeros ilustrativos adicionales incluyen polioles polioxietilados y polietilenglicol (PEG) (por ejemplo, un PEG con un peso molecular de entre aproximadamente 1.000 y aproximadamente 40.000, tal como entre aproximadamente 2000 y aproximadamente 20.000, por ejemplo, aproximadamente 3.000-12.000).

Los anticuerpos de la presente invención se pueden conjugar a una segunda molécula que se selecciona entre un radionúclido, una enzima, un sustrato enzimático, un cofactor, un marcador fluorescente, un marcador quimioluminiscente, un marcador peptídico, o una partícula magnética. En una realización, puede conjugarse un anticuerpo a uno o más fragmentos de anticuerpo, ácidos nucleicos (oligonucleótidos), nucleasas, hormonas, inmunomoduladores, quelantes, compuestos de boro, agentes fotoactivos, tintes, y similares. Estos y otros agentes adecuados pueden acoplarse directa o indirectamente a anticuerpos de la presente invención. Un ejemplo de acoplamiento indirecto de un segundo agente es acoplamiento mediante un residuo espaciador. Estos espaciadores, a su vez, pueden ser solubles o insolubles (véase, por ejemplo, Diener et al., Science 231, 148 (1986)) y pueden seleccionarse para permitir la liberación del fármaco del anticuerpo en un sitio diana y/o en condiciones particulares. Los ejemplos adicionales de agentes terapéuticos que pueden acoplarse a los anticuerpos incluyen lectinas y péptidos fluorescentes.

En una realización, se proporcionan derivados de anticuerpo que comprenden uno o más aminoácidos radiomarcados. Un anticuerpo radiomarcado puede usarse con fines tanto diagnósticos como terapéuticos (la conjugación a moléculas radiomarcadas es otra característica posible). Los ejemplos no limitantes de etiquetas para polipéptidos incluyen, pero sin limitación <sup>3</sup>H, <sup>14</sup>C, <sup>15</sup>N, <sup>35</sup>S, <sup>90</sup>Y, <sup>99</sup>Tc, <sup>125</sup>I, <sup>131</sup>I, y <sup>186</sup>Re. Los métodos para preparar aminoácidos radiomarcados y derivados peptídicos relacionados se conocen en la técnica (véase, por ejemplo, Junghans et al., en Cancer Chemotherapy and Biotherapy 655-686 (2ª edición, Chafner y Longo, eds., Lippincott Raven (1996)) y los documentos US 4.681.581, US 4.735.210, US 5.101.827, US 5.102.990 (USRE 35.500), US 5.648.471 y US 5.697.902. Por ejemplo, puede conjugarse un radioisótopo mediante un método de cloramina T.

Los radionúclidos ventajosos en contextos diagnósticos son isótopos de indio y en el contexto de aplicaciones terapéuticas, isótopos de itrio, que son citotóxicos. Los radioisótopos emisores de fotones, por lo general, son ventajosos en métodos diagnósticos (radioinmunoescintigrafía (RIS)). Los electrones penetrantes tienen una longitud de paso muy corta (5-10 nm) y necesitan internalizarse para que sean citotóxicos (véase, por ejemplo, Adelstein et al., Nucl. Med. Biol. 14, 165-169 (1987)). Por consiguiente, los anticuerpos conjugados a dichos isótopos pueden ser útiles en métodos diagnósticos, pero solo los anticuerpos que se internalizan deben considerarse para

radioisótopos que emiten electrones penetrantes en contextos terapéuticos. Las partículas alfa necesitan estar próximas a una célula (en 3-4 diámetros de célula) para que sean eficaces como agentes terapéuticos (Vriesendorp et al., "Radioimmunoglobulin therapy," en High Dose Cancer Therapy Armitage et al., (eds). (Williams & Wilkins, Baltimore, Md. 1992)). Puede considerarse que tanto los electrones penetrantes como los emisores alfa pueden

5 tienen alta selectividad debido a que su emisión de corto alcance no irradiará típicamente a las células normales vecinas.

Los radiometales  $^{111}\text{In}$  y  $^{90}\text{Y}$  son, respectivamente, un emisor  $\gamma$  puro y un emisor  $\beta$  puro. El yodo-125, el emisor de electrones penetrantes usado más comúnmente, tiene una semivida de aproximadamente 60 días y se libera

10 frecuentemente por inmunconjugados *in vivo* (debido a la deshalogenación). Los alfa emisores más comúnmente tomados en consideración para uso clínico, astato-211 y bismuto-212, tienen semividas relativamente cortas (7,2 h y 1,0 h, respectivamente) y se descomponen en isótopos radiactivos que pueden no retenerse por el inmunconjugado después de la primera emisión alfa (Wilbur, Antibiot. Immunoconj. Radiopharm. 4, 5-97 (1991)). Para aplicaciones

15 diagnósticas, pueden usarse los CD38BP, tales como anticuerpos anti-CD38 de la invención, marcados con indio-111 o tecnecio-99m. Estos dos isótopos emiten rayos gamma dentro del intervalo de energía adecuado para la obtención de imágenes, (100-250 keV). Las energías por debajo de este intervalo no son típicamente lo suficientemente penetrantes como para alcanzar un dispositivo de obtención de imágenes externo. Es difícil colimar mayores niveles de energía y proporcionar imágenes diagnósticas con baja resolución. La corta semivida del  $^{99}\text{Tc}$  restringe típicamente su uso a inmunconjugados con una rápida captación en tumores.

20

En una realización, se proporcionan los primeros y los segundos anticuerpos de CD38 conjugados con los radioisótopos primero y segundo. En otra realización, se proporciona un solo anticuerpo de CD38 conjugado con dos radioisótopos. Una ventaja de usar dos radioisótopos separados, por ejemplo, uno para obtener imágenes y uno para terapia, es aquel que facilita el tratamiento ambulatorio. La baja cantidad de radiactividad usada de manera

25 diagnóstica no representa un peligro de radiación, mientras que el emisor de radiación por un isótopo terapéutico, tal como un emisor  $\beta$  puro, se absorberá típicamente en gran medida en la vecindad de las células diana.

Los radioisótopos pueden unirse directa o indirectamente a un CD38BP, tal como un anticuerpo anti-CD38 de la invención. Los radioisótopos  $^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{99}\text{Tc}$ ,  $^{186}\text{Re}$ , y  $^{188}\text{Re}$  pueden, por ejemplo, unirse covalentemente a proteínas

30 (incluyendo anticuerpos) mediante grupos funcionales de aminoácidos. Para el yodo radiactivo, es normalmente a través del grupo fenólico hallado en la tirosina. Existen numerosos métodos para lograr esto: cloramina T (véase, por ejemplo, Greenwood et al., Biochem J. 89, 114-123 (1963) y Iodogen (Salacinskiet al., Anal. Biochem. 117, 136-146 (1981)). Los isótopos de Tc y Re pueden unirse covalentemente a través del grupo sulfhidrilo de cisteína (véase, por ejemplo, Griffiths et al., Cancer Res. 51, 4594-4602 (1991)). Sin embargo, dichas composiciones pueden ser

35 relativamente más adecuadas con fines diagnósticos ya que a menudo el organismo puede romper estos enlaces covalentes, liberando los radioisótopos al sistema circulatorio.

Un CD38BP, tal como un anticuerpo anti-CD38 de la invención, también puede marcarse con enzimas que son útiles para la detección, tales como peroxidasa de rábano picante,  $\beta$ -galactosidasa, luciferasa, fosfatasa alcalina, glucosa oxidasa, y similares. Un CD38BP, tal como un anticuerpo anti-CD38 de la invención, también puede marcarse con

40 biotina, y por consiguiente se detectan mediante la medición indirecta de la unión de avidina o estreptavidina. También puede marcarse un CD38BP, tal como un anticuerpo anti-CD38 de la invención, con epítopos polipeptídicos predeterminados reconocidos por un indicador secundario (por ejemplo, pares de secuencias de cremallera de leucina, sitios de unión para anticuerpos secundarios, dominios de unión a metales, marcadores epitópicos, etc.). Los ejemplos adicionales de candidatos a conjugados enzimáticos incluyen malato deshidrogenasa, nucleasa estafilocócica, isomerasa delta-V-esteroide, alcohol deshidrogenasa de levadura,  $\alpha$ -glicerofosfato deshidrogenasa, triosa fosfato isomerasa, asparaginasa, glucosa oxidasa, ribonucleasa, ureasa, catalasa, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, glucoamilasa, y acetilcolinesterasa.

45

Los residuos de marcaje ejemplares adicionales incluyen generalmente, pero sin limitación, moléculas marcadas de espín y otros residuos de marcaje con valor diagnóstico.

50

En una realización, la presente invención proporciona derivados de anticuerpos de CD38 sobrecruzados. Por ejemplo, dicho derivado de anticuerpo de CD38 puede producirse sobrecruzando dos o más anticuerpos, al menos uno de los cuales es un anticuerpo de la invención (del mismo tipo o de tipos diferentes, por ejemplo, para crear anticuerpos biespecíficos). Los reticulantes adecuados incluyen aquellos que son heterobifuncionales, que tienen dos grupos con reactividad distinta separados por un espaciador adecuado (por ejemplo, éster de m-maleimidobenzoil-N-hidroxisuccinimida) u homobifuncionales (por ejemplo, suberato de disuccinimidilo). Dichos enlazadores están disponibles a través de Pierce Chemical Company, Rockford, Ill.

55

Los anticuerpos de CD38 también pueden conjugarse con cualquier tipo adecuado de grupo químico, tales como polietilenglicol (PEG), un grupo metilo o etilo, o un grupo carbohidrato. Estos y otros grupos conjugados adecuados pueden usarse para mejorar las características biológicas del anticuerpo, por ejemplo, para aumentar la semivida en suero, solubilidad, y/o la unión a tejido.

60

Los derivados de anticuerpos de CD38 pueden producirse conjugando químicamente un radioisótopo, proteína, u

65

otro agente/residuo/compuesto a (a) el lado N-terminal o el lado C-terminal del anticuerpo o una subunidad del mismo (por ejemplo, una cadena H de anticuerpo anti-CD38, una cadena L, o un fragmento específico/selectivo anti-CD38 del mismo) un grupo sustituyente adecuado o cadena lateral adecuado o (b) una cadena de azúcar en el CD38BP (véase, por ejemplo, *Antibody Engineering Handbook*, editado por Osamu Kanemitsu, publicado por Chijin Shokan (1994)). Los derivados pueden generarse también mediante conjugación en residuos internos o azúcares, según sea adecuado.

Los anticuerpos de CD38 también pueden derivatizarse con un agente de detección, por ejemplo, compuestos fluorescentes, incluyendo fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, cloruro de 5-dimetilamino-1-naftalenosulfonilo, fósforos de lantánidos, y similares. Los ejemplos adicionales de marcadores fluorescentes adecuados incluyen un marcador de  $^{125}\text{Eu}$ , un marcador de isotiocianato, un marcador de ficoeritrina, un marcador de ficocianina, un marcador de aloficocianina, un marcador de o-falaldehído, un marcador de fluorescamida, etc. Los ejemplos de marcadores quimioluminiscentes incluyen marcadores luminales, marcadores isoluminales, marcadores de éster de acridinio aromáticos, marcadores de imidazol, marcadores de sal de acridinio, marcadores de éster de oxalato, un marcador de luciferina, marcadores de luciferasa, marcadores de aequorina, etc.

En una realización, un derivado de anticuerpo de CD38 comprende un ácido nucleico conjugado o una molécula asociada a ácidos nucleicos. En una de dichas facetas de la presente invención, el ácido nucleico conjugado es una ribonucleasa citotóxica. En una realización, el ácido nucleico conjugado es un ácido nucleico antisentido (por ejemplo, una molécula antisentido dirigida a S100A10, que también puede ser un componente independiente en una composición combinada o un método de administración combinado, tal como se describe en el presente documento - véase, por ejemplo, Zhang et al., *J Biol Chem.* 279(3), 2053-62 (2004)). En una realización, el ácido nucleico conjugado es una molécula de ARN inhibidora (por ejemplo, una molécula de ARNpi). En una realización, el ácido nucleico conjugado es un ácido nucleico inmunoestimulador (por ejemplo, una molécula de ADN que contiene un motivo de CpG inmunoestimulador). En una realización, el ácido nucleico conjugado es un casete de expresión que codifica la expresión de un gen supresor tumoral, una vacuna anticáncer, una citocina anticáncer, o un agente apoptótico. Dichos derivados pueden comprender la conjugación de un ácido nucleico que codifica para la expresión de una o más proteínas citotóxicas, tales como toxinas vegetales y bacterianas.

En una realización, se conjuga el anticuerpo a una molécula de ácido nucleico funcional. Los ácidos nucleicos funcionales incluyen moléculas antisentido, moléculas de ácido nucleico de interferencia (por ejemplo, moléculas de ARNpi), aptámeros, ribozimas, moléculas formadoras de tripletes, y secuencia de guía externas. Las moléculas de ácido nucleico funcionales pueden actuar como efectores, inhibidores, moduladores, y estimuladores de una actividad específica poseída por una molécula diana, o las moléculas de ácido nucleico funcionales pueden poseer una actividad *de novo* independiente de cualquier otra molécula. Una muestra representativa de métodos y técnicas que ayudan en el diseño y uso de moléculas antisentido puede encontrarse en la siguiente lista no limitante de Patentes de los Estados Unidos: US 5.135.917, US 5.294.533, US 5.627.158, US 5.641.754, US 5.691.317, US 5.780.607, US 5.786.138, US 5.849.903, US 5.856.103, US 5.919.772, US 5.955.590, US 5.990.088, US 5.994.320, US 5.998.602, US 6.005.095, US 6.007.995, US 6.013.522, US 6.017.898, US 6.018.042, US 6.025.198, US 6.033.910, US 6.040.296, US 6.046.004, US 6.046.319 y US 6.057.437.

En una realización, el anticuerpo se conjuga a un aptámero. Los aptámeros son moléculas que interactúan con una molécula diana, por ejemplo, de un modo específico. Típicamente, los aptámeros son ácidos nucleicos pequeños que varían entre 15-50 bases de longitud que se pliegan en estructuras secundarias y terciarias definidas, tales como tallos-bucles o cuartetos G. Los aptámeros pueden unirse a moléculas pequeñas, tales como ATP (documento US 5.631.146) y teofilina (documento US 5.580.737), así como moléculas grandes, tales como transcriptasa inversa (documento US 5.786.462) y trombina (documento US 5.543.293). Los ejemplos representativos de cómo producir y usar aptámeros para unirse a una diversidad de moléculas diana diferentes pueden encontrarse en la siguiente lista no limitante de Patentes de los Estados Unidos: US 5.476.766, US 5.503.978, US 5.631.146, US 5.731.424, US 5.780.228, US 5.792.613, US 5.795.721, US 5.846.713, US 5.858.660, US 5.861.254, US 5.864.026, US 5.869.641, US 5.958.691, US 6.001.988, US 6.011.020, US 6.013.443, US 6.020.130, US 6.028.186, US 6.030.776 y US 6.051.698.

En una realización, un anticuerpo de la presente invención se conjuga a una ribozima. Las ribozimas son moléculas de ácido nucleico que son capaces de catalizar una reacción química, ya sea intramolecular o intermolecularmente. Por lo tanto, las ribozimas son ácidos nucleicos catalíticos. Existe una serie de diferentes tipos de ribozimas que catalizan reacciones de nucleasa o de polimerasa de ácidos nucleicos que se basan en ribozimas halladas en los sistemas naturales, tales como (a) ribozimas hammerhead, (descritas, por ejemplo, en los documentos US 5.334.711, US 5.436.330, US 5.616.466, US 5.633.133, US 5.646.020, US 5.652.094, US 5.712.384, US 5.770.715, US 5.856.463, US 5.861.288, US 5.891.683, US 5.891.684, US 5.985.621, US 5.989.908, US 5.998.193, US 5.998.203, WO 9858058, WO 9858057 y WO 9718312), (b) ribozimas hairpin (descritas, por ejemplo, en los documentos US 5.631.115, US 5.646.031, US 5.683.902, US 5.712.384, US 5.856.188, US 5.866.701, US 5.869.339 y US 6.022.962), y (c) ribozimas de *tetrahymena* (descritas en, por ejemplo, los documentos US 5.595.873 y US 5.652.107). También existe un número de ribozimas que no se encuentran en sistemas naturales, pero que se han modificado para catalizar reacciones específicas *de novo* (ejemplos de los cuales se describen en, por ejemplo, los documentos US 5.580.967, US 5.688.670, US 5.807.718 y US 5.910.408). Las ribozimas escinden típicamente

sustratos de ARN o ADN, y más comúnmente, escinden sustratos de ARN. Las ribozimas escinden típicamente sustratos de ácido nucleico a través del reconocimiento y la unión del sustrato diana con la consecuente escisión. A menudo, este reconocimiento se basa principalmente en interacciones de pares de base canónicas o no canónicas. Esta propiedad hace que las ribozimas sean candidatos particularmente buenos para la escisión específica de diana de ácidos nucleicos debido a que el reconocimiento del sustrato diana se basa en la secuencia de los sustratos diana. Los ejemplos representativos de cómo producir y usar ribozimas para catalizar una serie de diferentes reacciones pueden hallarse en la siguiente lista no limitante de Patentes de los Estados Unidos: US 5.646.042, US 5.693.535, US 5.731.295, US 5.811.300, US 5.837.855, US 5.869.253, US 5.877.021, US 5.877.022, US 5.972.699, US 5.972.704, US 5.989.906 y US 6.017.756.

En una realización, la presente invención proporciona un anticuerpo de CD38 que se conjuga a un ácido nucleico con función formadora de tripletes. Dichas moléculas de ácido nucleico pueden interactuar con un ácido nucleico ya sea bicatenario o monocatenario. Cuando las moléculas de triplete interactúan con una región diana, se forma una estructura denominada triplete, en la que tres hebras de ADN forman un complejo dependiente de emparejamiento de bases tanto de Watson-Crick como de Hoogsteen. Las moléculas de triplete pueden unirse a regiones diana con alta afinidad y especificidad. Los ejemplos representativos de cómo preparar y usar moléculas formadoras de tripletes pueden unirse a una diversidad de diferentes moléculas diana en la siguiente lista no limitante de Patentes de los Estados Unidos: US 5.176.996, US 5.645.985, US 5.650.316, US 5.683.874, US 5.693.773, US 5.834.185, US 5.869.246, US 5.874.566 y US 5.962.426.

En una realización, se conjuga un anticuerpo de CD38 a una secuencia guía externa. Las secuencias guía externas (EGS) son moléculas que se unen a una molécula de ácido nucleico diana que forma un complejo que se reconoce por RNasa P, que escinde la molécula diana. Las EGS pueden diseñarse para que se dirijan específicamente a una molécula de ARN de elección. La RNasa P ayuda en el procesamiento del ARN transferente (ARNt) dentro de una célula. La RNasa P bacteriana puede reclutarse para escindir virtualmente cualquier secuencia de ARN mediante el uso de una EGS que hace que el complejo de ARN diana:EGS imite al sustrato de ARNt natural. (véanse, por ejemplo, el documento WO 92/03566 y Forster y Altman, *Science* 238, 407-409 (1990) para una descripción). Los ejemplos representativos de cómo producir y usar moléculas de EGS para facilitar la escisión de una diversidad de diferentes moléculas diana se proporcionan en la siguiente lista no limitante de Patentes de los Estados Unidos: US 5.168.053, US 5.624.824, US 5.683.873, US 5.728.521, US 5.869.248 y US 5.877.162.

En una realización, se conjuga un anticuerpo de CD38 a una molécula de ácido nucleico interferente, tal como una molécula de ARNpi u otra molécula de ARNi (por ejemplo, una molécula de ARN bicatenario (bc) de aproximadamente 20-25 nucleótidos), que se dirige para interferir con la acción de un producto de expresión génica diana, tal como un producto de expresión génica implicada en una enfermedad o afección mediada por CD38. Los métodos para la producción y uso de moléculas de ácido nucleico interferente se proporcionan en, por ejemplo, Nishikura, *Cell* 107(4), 415-8 (2001), Fjose et al., *Biotechnol Annu Rev.* 7, 31-57 (2001), Hanon, *Nature* 418, 244-51 (2002), Brantl, *Biochim Biophys Acta.* 1575(1-3), 15-25 (2002), Tuschl, *ChemBiochem.* 2(4), 239-45 (2001), Caplen, *Expert Opin Biol Ther.* 3(4), 575-86 (2003), Lu et al., *Curr Opin Mol Ther.* 5(3), 225-34 (2003), Shuey et al., *Drug Discov Today.* 7(20), 1040-6 (2002), Shi, *Trends Genet.* 19(1), 9-12 (2003), Kovar et al., *Semin Cancer Biol.* 13(4), 275-81 (2003), Lavrey et al., *Curr Opin Drug Discov Devel.* 6(4), 561-9 (2003), Clewey, *Commun Dis Public Health.* 6(2), 162-3 (2003), Duxbury et al., *J Surg Res.* 117(2), 339-44 (2004), Caplen et al., *Ann N Y Acad Sci.* 1002, 56-62 (2003), WO 01/75164, US 6.506.559, US 20040086884, US 20040077574, US 20040063654, US 20040033602, US 20030167490, US 20030157030, US 20030114409, US 20030108923, US 20040014113 y US 20020132788.

En una realización, se conjuga un anticuerpo de CD38 a un péptido o molécula de dominio de direccionamiento a tumores. En una realización, se conjuga un anticuerpo de CD38 a una secuencia de factor VII que se dirige a tumores.

Puede emplearse cualquier método conocido en la técnica para conjugar el anticuerpo de CD38 a las moléculas conjugadas, tales como aquellas descritas anteriormente, incluyendo aquellos métodos descritos por Hunter et al., *Nature* 144, 945 (1962), David et al., *Biochemistry* 13, 1014 (1974), Pain et al., *J. Immunol. Meth.* 40, 219 (1981) y Nygren, *J. Histochem. and Cytochem.* 30, 407 (1982). El enlace/conjugación puede lograrse de cualquier modo adecuado. Por ejemplo, un enlace covalente puede adoptar la forma de un enlace disulfuro (en caso de que sea necesario y adecuado, podría diseñarse un CD38BP, tal como un anticuerpo anti-CD38 de la invención, para que contenga un codón de cisteína adicional, que deseablemente no interfiere con la actividad de unión a CD38 de la molécula. Una molécula de toxina, derivatizada con un grupo sulfhidrilo reactivo con la cisteína del CD38BP modificado, tal como un anticuerpo anti-CD38 de la invención, puede formar un inmunoconjugado con el CD38. Como alternativa, puede introducirse un grupo sulfhidrilo directamente en un CD38 usando técnicas de polipéptidos de fase sólida. Por ejemplo, la introducción de grupos sulfhidrilo en péptidos se describe por Hiskey, *Peptides* 3, 137(1981). La introducción de grupos sulfhidrilo en proteínas se describe en Maasen et al., *Eur. J. Biochem.* 134, 32 (1983). Una vez que están presentes los grupos sulfhidrilo correctos, pueden purificarse la citotoxina y el CD38BP, reducirse ambos grupos azufre; mezclarse la citotoxina y el ligando (por ejemplo, a una proporción de aproximadamente 1:5 a 1:20); y la formación de enlace disulfuro permitió avanzar hasta completar (generalmente aproximadamente 20 a 30 minutos) a temperatura ambiente. Entonces puede dializarse la mezcla frente a suero salino tamponado con fosfato o cromatografiarse en una resina, tal como Sephadex para eliminar las moléculas de

ligando y toxina no reaccionadas.

Pueden unirse numerosos tipos de compuestos citotóxicos a proteínas mediante el uso de un grupo reactivo en el compuesto citotóxico o mediante el uso de un agente reticulante. Un grupo reactivo común que formará un enlace covalente estable *in vivo* con una amina es isotiocianato (Means et al., Chemical modifications of proteins (Holden-Day, San Francisco 1971) págs. 105-110). Este grupo reacciona preferencialmente con el grupo  $\alpha$ -amina de lisina. La maleimida es un grupo reactivo usado comúnmente para formar un enlace covalente *in vivo* con el grupo sulfhidrilo en la cisteína (Ji., Methods Enzymol 91, 580-609 (1983)). Los anticuerpos monoclonales son típicamente incapaces de formar enlaces covalentes con iones de radiometales, pero pueden unirse al anticuerpo indirectamente mediante el uso de agentes quelantes que están unidos covalentemente a los anticuerpos. Los agentes quelantes pueden unirse mediante aminas (Meares et al., Anal. Biochem. 142, 68-78 (1984)) y grupos sulfhidrilo (Koyama, Chem. Abstr. 120, 217262t (1994)) de residuos de aminoácidos y también a través de grupos carbohidrato (Rodwell et al., PNAS USA 83, 2632-2636 (1986), Quadri et al., Nucl. Med. Biol. 20, 559-570 (1993)). Ya que estos agentes quelantes contienen dos tipos de grupos funcionales, uno para unir iones de metales y el otro para unir el quelato al anticuerpo, se citan comúnmente como agentes quelantes bifuncionales (Sundberg et al., Nature 250, 587-588 (1974)).

Los agentes reticulantes que tienen dos grupos funcionales reactivos se clasifican como homo o heterobifuncionales. Los ejemplos de agentes reticulantes homobifuncionales incluyen bismaleimidohexano (BMH) que es reactivo con grupos sulfhidrilo (Chen et al., J Biol Chem 266, 18237-18243 (1991)) y glicolbis[succinimidilsuccinato] de etileno (EGS) que es reactivo con grupos amino (Browning et al., J. Immunol. 143, 1859-1867 (1989)). Un ejemplo de un reticulante heterobifuncional es el éster de m-maleimidobenzoil-N-hidroxisuccinimida (MBS) (Myers et al., J. Immunol. Meth. 121, 129-142 (1989)). Estas metodologías son simples y se emplean de manera común.

Un agente terapéutico o diagnóstico puede, unirse también o como alternativa en la región bisagra de un componente de anticuerpo reducido mediante la formación de enlace disulfuro. Como alternativa, dichos péptidos pueden unirse al componente de anticuerpo usando un reticulante heterobifuncional, tal como 3-(2-piridiltio)propionato de N-succinilo (SPDP). Yu et al., Int. J. Cancer 56, 244 (1994). Las técnicas generales para dicha conjugación se conocen bien en la técnica. Véase, por ejemplo, Wong, Chemistry Of Protein Conjugation And Cross-Linking (CRC Press 1991), Upešlacis et al., "Modification of Antibodies by Chemical Methods," In Monoclonal Antibodies: Principles And Applications, Birch et al., (eds.) (Wiley-Liss, Inc. 1995), Price, "Production and Characterization of Synthetic Peptide-Derived Antibodies" en Monoclonal Antibodies: Production, Engineering And Clinical Application, Ritter et al., (eds.) (Cambridge University Press 1995).

En algunas realizaciones, se acoplan marcadores u otros sustituyentes conjugados a la secuencia de aminoácidos del anticuerpo anti-CD38 mediante brazos espaciadores de diversas longitudes para reducir la impedancia estérica potencial.

Pueden usarse CD38BP no marcados, tales como anticuerpos de la invención, en combinación con otros anticuerpos marcados (segundos anticuerpos) que son reactivos con los CD38BP, tales como anticuerpos específicos para regiones constantes de inmunoglobulina humana que se unen a mAb anti-CD38. Como alternativa, un CD38BP, tal como un anticuerpo de la invención, puede marcarse directamente. Pueden emplearse una gran variedad de marcadores para el marcado directo o indirecto de los CD38BP, tal como marcado con radionúclidos, flúors, enzimas, sustratos enzimáticos, cofactores enzimáticos, inhibidores enzimáticos, ligandos (en particular haptenos), etc.

Las inserciones de secuencia de aminoácidos incluyen fusiones amino- y/o carboxilo-terminal en el intervalo de longitud de un residuo a polipéptidos que contienen cien o más residuos, así como inserciones intrasecuencia de uno o varios residuos de aminoácidos. Los ejemplos de inserciones terminales incluyen un anticuerpo con un residuo de metionilo N-terminal o el anticuerpo fusionado a un marcador epitópico. Otras variantes de inserción de la molécula de anticuerpo incluyen la fusión al extremo N- o C-terminal del anticuerpo a una enzima o un polipéptido o PEG que aumenta la semivida en suero del anticuerpo. Dichas proteínas de fusión de anticuerpo anti-CD38 que comprenden un anticuerpo de la invención son otra característica de la presente invención.

En una realización, la presente invención proporciona moléculas que comprenden un anticuerpo de CD38, tal como un anticuerpo anti-CD38 humano, de la presente invención conjugado a un residuo terapéutico, tal como una citotoxina, un fármaco quimioterapéutico, un inmunosupresor, o un radioisótopo. Dichos conjugados se citan en el presente documento como "inmunconjugados". Los inmunconjugados que incluyen una o más citotoxinas se citan como "inmunotoxinas".

Una citotoxina o agente citotóxico incluye cualquier agente que sea perjudicial para (por ejemplo, eliminar) las células. Para una descripción de estas clases de fármacos que se conocen bien en la técnica, y sus mecanismos de acción, véase Goodman et al., Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis Of Therapeutics, 8ª Ed., Macmillan Publishing Co., 1990. Se proporcionan técnicas adicionales relevantes para la preparación de inmunotoxinas de anticuerpo en, por ejemplo, Vitetta, Immunol. Today 14, 252 (1993) y el documento US 5.194.594.

Los agentes terapéuticos adecuados para formar inmunoconjugados de la presente invención incluyen taxol, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etopósido, tenipósido, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorrubicina, dihidroxi antracina, mitoxantrona, actinomicina D, 1-deshidrotestosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol, y puromicina, antimetabolitos (tales como metotrexato, 6-mercaptapurina, 6-tioguanina, citarabina, fludarabina, 5-fluorouracilo, dacarbazina, hidroxiurea, asparaginasa, gemcitabina, cladribina), agentes alquilantes (tales como mecloretamina, tiotepa, clorambucilo, melfalano, carmustina (BCNU), lomustina (CCNU), ciclofosfamida, busulfán, dibromomanitol, estreptozotocina, dacarbazina (DTIC), procarbazona, mitomicina C, cisplatino y otros derivados de platino, tales como carboplatino), antibióticos (tales como dactinomicina (anteriormente actinomicina), bleomicina, daunorrubicina (anteriormente daunomicina), doxorubicina, idarrubicina, mitramicina, caliceamicina, mitomicina, mitoxantrona, plicamicina, antramicina (AMC)), toxoide diftérico y moléculas relacionadas (tales como cadena A de difteria y fragmentos activos de la misma y moléculas híbridas), toxina ricínica (tal como ricina A o una toxina de cadena A de ricinina desglucosilada), toxina colérica, una toxina similar a Shiga (SLT-I, SLT-II, SLT-III), toxina LT, toxina C3, toxina Shiga, toxina tsofarínica, toxoide tetánico, inhibidor de proteasa de Bowman-Birk de soja, exotoxina de *Pseudomonas*, alorina, saporina, modicina, gelanina, cadena A de abrina, cadena A de modicina, apsaricina, proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas de diantina, proteínas de *Phytolacca americana* (PAPI, PAPII, y PAP-S), inhibidor de *Momordica charantia*, curcina, crotina, inhibidor de *Saponaria officinalis*, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, y toxinas de enomicina. Los agentes terapéuticos, que pueden administrarse en combinación con un anticuerpo anti-CD38 de la presente invención como se describe en otras partes del presente documento, también pueden ser candidatos a residuos terapéuticos útiles para la conjugación a un anticuerpo anti-CD38 de la presente invención. Por ejemplo, el residuo de fármaco puede ser una proteína o polipéptido que posee una actividad biológica deseada. Dichas proteínas pueden incluir, por ejemplo, una toxina enzimáticamente activa, o un fragmento activo de las mismas, tal como abrina, ricina A, exotoxina de *Pseudomonas*, o toxina diftérica; una proteína, tal como factor de necrosis tumoral o interferón- $\gamma$ ; o, modificadores de la respuesta biológica, tales como, por ejemplo, linfocinas, interleucina-1 (IL-1), interleucina-2 (IL-2), interleucina-6 (IL-6), factor estimulador de las colonias de macrófagos y granulocitos (GM-CSF), factor estimulador de las colonias de granulocitos (G-CSF), u otros factores de crecimiento y apoptóticos, incluyendo proteínas aisladas de mitocondrias.

En una realización, el agente citotóxico es caliceamicina,  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{125}\text{I}$  y  $^{131}\text{I}$ .

Otros ejemplos de citotoxinas terapéuticas que pueden conjugarse a un anticuerpo de CD38 de la presente invención incluyen caliceamicinas y duocarmicinas. Como se ha indicado anteriormente, el residuo de fármaco no debe interpretarse como limitado a agentes terapéuticos químicos clásicos. Por ejemplo, el residuo de fármaco puede ser una proteína o polipéptido que posee una actividad biológica deseada. Dichas proteínas pueden incluir, por ejemplo, un agente activo en la superficie celular, tal como enzimas fosfolipasas, por ejemplo, fosfolipasa C.

La porción listante de una toxina típicamente puede unirse fácilmente al fragmento Fab de un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la presente invención. Otras moléculas conjugadas adecuadas incluyen ribonucleasa (RNasa), DNasa I, enterotoxina A estafilocócica, proteína antiviral de la hierba carmín, toxina diftérica, y endotoxina de *Pseudomonas*. Véase, por ejemplo, Pastan et al., Cell 47, 641 (1986) y Goldenberg, Calif. A Cancer Journal for Clinicians 44, 43 (1994). Las toxinas adecuadas para su uso en la presente invención son conocidas para los expertos en la materia (véase, por ejemplo, el documento US 6.077.499).

Los conjugados de CD38BP, tales como anticuerpos de la invención, y residuos citotóxicos similares pueden producirse usando una diversidad de agentes acoplantes de proteínas bifuncionales. Los ejemplos de dichos reactivos incluyen SPDP, IT, derivados bifuncionales de imidoésteres, tales como adipimidato de dimetil HCl, ésteres activos, tales como suberato de disuccinimidilo, aldehídos, tales como glutaraldehído, compuestos bis azido, tales como (p-azidobenzoil) hexanodiamina, derivados de bis-diazonio, tales como bis-(p-diazoniobenzoilo)-etilendiamina, diisocianatos, tales como 2,6-diisocianato de tolieno, y compuestos de flúor bi-activo, tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzoceno y agentes antimetabólicos (por ejemplo, vincristina, vinblastina, docetaxel, paclitaxel y vinorelbina).

Las técnicas para conjugar dichos residuos terapéuticos a CD38BP, tales como anticuerpos, se conocen bien, véase, por ejemplo, Arnon et al., "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", en Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy, Reisfeld et al., (eds.), págs. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985), Hellstrom et al., "Antibodies For Drug Delivery", en Controlled Drug Delivery (2ª Ed.), Robinson et al., (eds.), págs. 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987), Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", en Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications, Pinchera et al., (eds.), págs. 475-506 (1985), "Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy", en Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy, Baldwin et al., (eds.), págs. 303-16 (Academic Press 1985) y Thorpe et al., "The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates", Immunol. Rev. 62, 119-58 (1982).

En una realización, la presente invención proporciona un anticuerpo de CD38 que se conjuga a una toxina mixta. Una molécula de toxina mixta es una molécula derivada de dos toxinas diferentes (típicamente polipéptidos). En general, las toxinas peptídicas comprenden uno o más dominios responsables de la unión generalizada a células

eucariotas, al menos un dominio enzimáticamente activo, y al menos un dominio de traslocación. Los dominios de unión y traslocación son necesarios para el reconocimiento celular y la entrada de la toxina, respectivamente. Las proteínas de origen natural que se sabe que tienen un dominio de traslocación incluyen la toxina diftérica, la exotoxina A de *Pseudomonas*, y posiblemente otras toxinas peptídicas. Los dominios de traslocación de la toxina diftérica y de la exotoxina A de *Pseudomonas* están bien caracterizados (véase, por ejemplo, Hoch et al., PNAS USA 82, 1692 (1985), Colombatti et al., J. Biol. Chem. 261, 3030 (1986) y Deleers et al., FEBS Lett. 160, 82 (1983)), y puede determinarse la existencia y ubicación de dicho dominio en otras moléculas mediante métodos, tales como aquellos empleados por Hwang et al., Cell 48, 129 (1987) y Gray et al., PNAS USA 81 2645 (1984). A la vista de estas técnicas, puede formarse una molécula híbrida de toxina mixta útil, por ejemplo, mediante el uso de la subunidad A enzimáticamente activa de la toxina similar a Shiga de *E. coli* (Calderwood et al., PNAS USA 84, 4364 (1987)) al dominio de traslocación (residuos de aminoácido 202 a 460) de la toxina diftérica, y a una molécula que se dirige a un tipo celular particular, tal como se describe en el documento US 5.906.820. La porción de direccionamiento del híbrido en tres partes puede hacer que la molécula se una específicamente a las células diana, y la porción de traslocación de la toxina diftérica puede actuar para insertar la subunidad A enzimáticamente activa de la toxina similar a Shiga en una célula diana. La parte enzimáticamente activa de la toxina similar a Shiga, como la toxina diftérica, actúa en la maquinaria de síntesis de proteínas de la célula para prevenir la síntesis de proteínas, eliminando de este modo a la célula diana.

Los inmunocombinados de acuerdo con la presente invención también pueden comprender un radioisótopo, por ejemplo, yodo-131, itrio-90 o indio-111, para generar radiofarmacéuticos citotóxicos para tratar un trastorno relacionado con CD38, tales como el mieloma múltiple.

En una realización, los anticuerpos de CD38, tales como los anticuerpos humanos de la presente invención, se unen a un enlazador-quelante, por ejemplo, tiuxetano, que permite conjugar el anticuerpo a un radioisótopo.

Los sustituyentes conjugados útiles adicionales incluyen retinoides anti-cáncer. Los conjugados de taxano (véase, por ejemplo, Jaime et al., Anticancer Res. 21 (2A), 1119-28 (2001), conjugados de cisplatino, conjugados de taspigargina, conjugados de ácido linoleico, conjugados de caliceamicina (véase, por ejemplo, Damle et al., Curr Opin Pharmacol. 3(4), 386-90 (2003), conjugados de doxorubicina, conjugados de geldanamicina, y similares, también pueden ser útiles para promover el tratamiento del cáncer (véase, en general, Trail et al., Cancer Immunol Immunother. 52(5), 328-37 (2003)).

En el presente documento se describen anticuerpos secundarios y anti-idiotípicos provocados contra anticuerpos anti-CD38 de la presente invención. Un anticuerpo secundario se refiere a un anticuerpo específico para, y típicamente provocado contra, un anticuerpo anti-CD38. Un anticuerpo anti-idiotípico (Id) es un anticuerpo que reconoce determinantes únicos asociados generalmente con el sitio de unión a antígeno de un anticuerpo. Un anticuerpo Id puede prepararse inmunizando a un animal de la misma especie y tipo genético que el de origen de un mAb anti-CD38 con el mAb para el que se está preparando el anticuerpo anti-Id. El animal inmunizado puede reconocer típicamente y responder a los determinantes idiotípicos del anticuerpo inmunizante mediante la producción de un anticuerpo para estos determinantes idiotípicos (el anticuerpo anti-Id). Dichos anticuerpos se describen en, por ejemplo, el documento US 4.699.880.

Un anticuerpo anti-Id también puede usarse como "inmunógeno" para inducir una respuesta inmunitaria en otro animal, produciendo lo que se denomina un anticuerpo anti-anti-Id. Un anticuerpo anti-anti-Id puede ser epitópicamente idéntico al mAb original, que indujo el anti-Id. Por lo tanto, mediante el uso de anticuerpos para los determinantes idiotípicos de un mAb, es posible identificar otros clones que expresan anticuerpos de idéntica especificidad. Los anticuerpos anti-Id pueden variarse (de este modo produciendo variantes de anticuerpo anti-Id) y/o derivatizarse mediante cualquier técnica adecuada, tales como aquellas descritas en otras partes del presente documento respecto de los anticuerpos anti-CD38 y otros CD38BP de la presente divulgación. Por ejemplo, los mAb anti-Id pueden acoplarse a un vehículo, tal como hemocianina de lapa californiana (KLH) y usarse para inmunizar ratones BALB/c. Los sueros de estos ratones contendrán típicamente anticuerpos anti-anti-Id que tienen propiedades de unión similares si no idénticas a un anticuerpo anti-CD38 original/parental.

En una realización, la presente invención proporciona un ácido nucleico que codifica un anticuerpo de CD38 de la invención. Un ácido nucleico que codifica un anticuerpo de CD38 de la invención puede tener cualquier característica adecuada y comprender cualquier rasto adecuado o combinaciones de los mismos. Por lo tanto, por ejemplo, un ácido nucleico que codifica un anticuerpo de CD38 puede estar en forma de ADN, ARN, o un híbrido de los mismos, y puede incluir bases de origen no natural, un armazón modificado (por ejemplo, un armazón de fosfotioato que promueve la estabilidad del ácido nucleico), o ambos. El ácido nucleico comprende ventajosamente características que promueven la expresión, replicación, y/o selección deseadas en células hospedadoras diana. Los ejemplos de dichas características incluyen un componente de origen de replicación, un componente de gen de selección, un componente de promotor, un componente de elemento potenciador, un componente de secuencia de poliadenilación, un componente de terminación, y similares.

En una realización, la presente invención proporciona un vector que comprende un ácido nucleico que codifica un CD38BP de la invención. Un vector se refiere a un vehículo de suministro que promueve la expresión de un ácido

nucleico que codifica un anticuerpo de CD38, la producción de un anticuerpo de CD38, la transfección/transformación de células diana, la replicación del ácido nucleico que codifica el CD38BP, promueve la estabilidad del ácido nucleico, promueve la detección del ácido nucleico y/o de las células transformadas/transfectadas, o de otro modo confiere una función biológica ventajosa al ácido nucleico que codifica el anticuerpo de CD38. Un vector en el contexto de la presente invención puede ser cualquier vector adecuado, incluyendo vectores cromosómicos, no cromosómicos y sintéticos de ácido nucleico (una secuencia de ácido nucleico que comprende un conjunto adecuado de elementos de control de la expresión). Los ejemplos de dichos vectores incluyen derivados de SV40, plásmidos bacterianos, ADN de fago, baculovirus, plásmidos de levadura, vectores derivados de combinaciones de plásmidos y ADN de fagos, y vectores de ácido nucleico vírico (ARN o ADN). En una realización, un ácido nucleico codificante de CD38BP está comprendido en un vector de ADN o ARN desnudo, incluyendo, por ejemplo, un elemento de expresión lineal (tal como se describe en, por ejemplo, Sykes y Johnston, *Nat Biotech* 17, 355-59 (1997)), un vector de ácido nucleico compactado (tal como se describe en, por ejemplo, los documentos US 6.077.835 y/o WO 00/70087), un vector plasmídico, tal como pBR322, pUC 19/18, o pUC 118/119, un vector de ácido nucleico de tamaño mínimo "enano" (tal como se describe en, por ejemplo, Schakowski et al., *Mol Ther* 3, 793-800 (2001)), o en forma de una construcción de vector de ácido nucleico precipitado, tal como una construcción precipitada de CaP04 (tal como se describe en, por ejemplo, el documento WO 00/46147, Benvenisty y Reshef, *PNAS USA* 83, 9551-55 (1986), Wigler et al., *Cell* 14, 725 (1978), y Coraro y Pearson, *Somatic Cell Genetics* 7, 603 (1981)). Dichos vectores de ácido nucleico y el uso de los mismos se conocen en la técnica (véanse, por ejemplo, los documentos US 5.589.466 y US 5.973.972).

En una realización, el vector es adecuado para la expresión del anticuerpo de CD38 en una célula bacteriana. Los ejemplos de dichos vectores incluyen, por ejemplo, vectores que dirigen un alto nivel de expresión de proteínas de fusión que se purifican fácilmente (por ejemplo, vectores de clonación y expresión en *E. coli* multifuncionales, tales como BlueScript (Stratagene), vectores pIN (Van Heeke y Schister, *J Biol Chem* 264, 5503-5509 (1989), vectores pET (Novagen, Madison WI) y similares).

Un vector de expresión puede también o como alternativa ser un vector adecuado para su expresión en un sistema de levadura. Puede emplearse cualquier vector adecuado para la expresión en un sistema de levadura. Los vectores adecuados para su uso en, por ejemplo, *Saccharomyces cerevisiae* incluyen, por ejemplo, vectores que comprenden promotores constitutivos o inducibles, tales como factor alfa, alcohol oxidasa y PGH (revisado en: F. Ausubel et al., ed. *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing y Wiley InterScience, Nueva York (1987), y Grant et al., *Methods in Enzymol* 153, 516-544 (1987)).

Un ácido nucleico y/o vector también puede comprender una secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de secreción/localización, que puede dirigirse a un polipéptido, tal como una cadena polipeptídica naciente, a un compartimento celular, membrana, u orgánulo, o que dirige la secreción del polipéptido al espacio periplásmico o al medio de cultivo. Dichas secuencias se conocen en la técnica, e incluyen péptidos líderes de secreción o de señal, secuencias de direccionamiento a orgánulos (por ejemplo, secuencias de localización nuclear, señales de retención en el ER, secuencias de tránsito mitocondrial, secuencias de tránsito en cloroplastos), secuencias de localización/anclaje a membrana (por ejemplo, secuencias de parada de la transferencia, secuencias de ancla de GPI), y similares.

Los ácidos nucleicos que codifican el anticuerpo de CD38 pueden comprender o asociarse con cualquier promotor o potenciador adecuado, y otros elementos que facilitan la expresión. Los ejemplos de dichos elementos incluyen promotores fuertes de la expresión (por ejemplo, el promotor/potenciador IE de CMV humano, así como los promotores RSV, SV40, SL3-3, MMTV, y LTR de VIH), secuencias de terminación de poli (A) efectivas, un origen de replicación para producto plasmídico en *E. coli*, un gen de resistencia a antibióticos como marcador de selección, y/o un sitio de clonación conveniente (por ejemplo, un polienlazador). Los ácidos nucleicos también pueden comprender un promotor inducible en contraposición a un promotor constitutivo, tal como IE de CMV (el experto en la materia reconocerá que dichos términos en realidad describen un grado de expresión génica en determinadas condiciones).

En una realización, el ácido nucleico puede posicionarse en y/o suministrarse a la célula hospedadora o el animal hospedador mediante un vector vírico. Puede usarse cualquier vector vírico adecuado a este respecto, y se conocen varios en la técnica. Un vector vírico puede comprender cualquier número de polinucleótidos víricos, solos o en combinación con una o más proteínas víricas, que facilitan el suministro, replicación, y/o expresión del ácido nucleico de la presente invención en una célula hospedadora deseada. El vector vírico puede ser un polinucleótido que comprende la totalidad o parte de un genoma vírico, un conjugado de proteína vírica/ácido nucleico, una partícula similar a un virus (VLP), un vector similar a aquellos descritos en los documentos US 5.849.586 y WO 97/04748, o una partícula vírica intacta que comprende ácidos nucleicos víricos y el ácido nucleico de la presente invención. Un vector vírico de partícula vírica puede comprender una partícula vírica de tipo silvestre o una partícula vírica modificada. El vector vírico puede ser un vector que requiere la presencia de otro vector o virus de tipo silvestre para su replicación y/o expresión (es decir, puede ser un virus dependiente de colaborador), tal como un amplicón de vector adenovírico. Normalmente, dichos vectores víricos consisten esencialmente en una partícula vírica de tipo silvestre, o una partícula vírica modificada en su contenido de proteínas y/o ácidos nucleicos para aumentar la capacidad del transgén o ayudar en la transfección y/o expresión del ácido nucleico (los ejemplos de dichos vectores incluyen los amplicones de herpes virus/AAV). Normalmente, un vector vírico es similar a y/o se deriva de un virus

que normalmente infecta a seres humanos. Las partículas de vector vírico adecuadas a este respecto incluyen, por ejemplo, partículas de vector adenovírico (incluyendo cualquier virus de o derivado a partir de un virus de los adenoviridae), partículas de vector vírico adeno-asociado (partículas de vector AAV) u otros parvovirus o partículas de vector parvovírico, partículas de vector papilomavírico, vectores flavivíricos, vectores alfavíricos, vectores herpes víricos, vectores del virus de la viruela, vectores retrovíricos, incluyendo vectores lentivíricos. Los ejemplos de dichos virus y vectores víricos se encuentran en, por ejemplo, Fields et al., eds., *Virology* Raven Press, Ltd., Nueva York (3ª ed., 1996 y 4ª ed., 2001), *Encyclopedia of Virology*, R. G. Webster et al., eds., Academic Press (2ª ed., 1999), *Fundamental Virology*, Fields et al., eds., Lippincott-Raven (3ª ed., 1995), Levine, "Viruses," *Scientific American Library* n.º 37 (1992), *Medical Virology*, D. O. White et al., eds., Acad. Press (2ª ed. 1994), e *Introduction to Modern Virology*, Dimock, N. J. et al., eds., Blackwell Scientific Publications, Ltd. (1994).

Los vectores víricos que pueden emplearse con polinucleótidos de la presente invención y los métodos descritos en el presente documento incluyen vectores adenovíricos y adeno-asociados, como en, por ejemplo, Carter, *Curr Opin Biotech* 3, 533-539(1992) y Muzyczka, *Curr Top Microbiol Immunol* 158, 97-129 (1992). Se describen tipos y aspectos adicionales de vectores AAV en, por ejemplo, Carter, *Contrib. Microbiol.* 4, 85-86 (2000), Smith-Arica, *Curr. Cardiol. Rep.* 3(1), 41-49 (2001), Taj, *J. Biomed. Sci.* 7(4), 279-91 (2000), Vigna et al., *J. Gene Med.* 2(5), 308-16 (2000), Klimatcheva et al., *Front. Biosci.* 4, D481-96 (1999), Lever et al., *Biochem. Soc. Trans.* 27(6), 841-47 (1999), Snyder, *J Gene Med.* 1(3), 166-75 (1999), Gerich et al., *Knee Surg. Sports Traumatol. Arthrosc.* 5(2), 118-23 (1998), y During, *Adv. Drug Deliv. Review* 27(1), 83-94 (1997) y los documentos US 4.797.368, US 5.139.941, US 5.173.414, US 5.614.404, US 5.658.785, US 5.858.775 y US 5.994.136). Los vectores víricos adeno-asociados pueden construirse y/o purificarse usando los métodos expuestos, por ejemplo, en el documento US 4.797.368 y Laughlin et al., *Gene* 23, 65-73 (1983).

Otro tipo de vector vírico que puede emplearse con polinucleótidos y métodos de la presente invención es un vector papilomavírico. Los vectores papilomavíricos adecuados se conocen en la técnica y se describe en, por ejemplo, Hewson, *Mol Med Today* 5(1), 8 (1999), Stephens, *Biochem J.* 248(1), 1-11 (1987) y el documento US 5.719.054. Los ejemplos de vectores papilomavíricos se proporcionan en, por ejemplo, el documento WO 99/21979. Los vectores alfavíricos pueden ser vectores de suministro génico en otros contextos. Los vectores alfavíricos se conocen en la técnica y se describen en, por ejemplo, Carter, *Curr Opin Biotech* 3, 533-539 (1992), Muzyczka, *Curr Top Microbiol Immunol.* 158, 97-129 (1992), Schlesinger, *Expert Opin Biol Ther.* 1(2), 177-91 (2001), Polo et al., *Dev Biol (Basilea).* 104, 181-5 (2000), Wahlfors et al., *Gene Ther.* 7(6), 472-80 (2000), Colombage et al., *Virology.* 250(1), 151-63 (1998) y los documentos WO 01/81609, WO 00/39318, WO 01/81553, WO 95/07994 y WO 92/10578.

Otro grupo de vectores víricos son los vectores herpesvíricos. Los ejemplos de vectores herpesvíricos se describen en, por ejemplo, Lachmann et al., *Curr Opin Mol Ther* 1(5), 622-32 (1999), Fraefel et al., *Adv Virus Res.* 55, 425-51 (2000), Huard et al., *Neuromuscul* 7(5), 299-313 (1997), Glorioso et al., *Annu Rev Microbiol.* 49, 675-710 (1995), Latchman, *Mol Biotechnol.* 2(2), 179-95 (1994), y Frenkel et al., *Gene Ther.* 1 (Supl. 1), S40-6 (1994), así como en los documentos US 6.261.552 y US 5.599.691.

Los vectores retrovíricos, incluyendo vectores lentivíricos, pueden ser también vehículos de suministro génico ventajosos en contextos particulares. Existen numerosos vectores retrovíricos conocidos en la técnica. Los ejemplos de vectores retrovíricos se describen en, por ejemplo, Miller, *Curr Top Microbiol Immunol* 158, 1-24 (1992), Salmons y Gunzburg, *Human Gene Therapy* 4, 129-141 (1993), Miller et al., *Methods in Enzymology* 217, 581-599 (1994), Weber et al., *Curr Opin Mol Ther.* 3(5), 439-53 (2001), Hu et al., *Pharmacol Rev.* 52(4), 493-511 (2000), Kim et al., *Adv Virus Res.* 55, 545-63 (2000), Palu et al., *Rev Med Virol.* 10(3), 185-202 (2000) y Takeuchi et al., *Adv Exp Med Biol.* 465, 23-35 (2000), así como en los documentos US 6.326.195, US 5.888.502, US 5.580.766, y US 5.672.510.

Los vectores adenovíricos también pueden ser vectores víricos adecuados para transferencia génica. Los vectores adenovíricos se conocen bien en la técnica y se describen en, por ejemplo, Graham et al, *Mol Biotechnol* 33(3), 207-220 (1995), Stephenson, *Clin Diagn Virol* 10(2-3), 187-94 (1998), Jacobs, *Clin Sci (Lond).* 85(2), 117-22 (1993), los documentos US 5.922.576, US 5.965.358 y US 6.168.941 y los documentos WO98/22588, WO98/56937, WO99/15686, WO99/54441, y WO00/32754. Los vectores adenovíricos, los vectores herpesvíricos y los vectores Sindbisvíricos, útiles en la práctica de la presente invención, se describen en, por ejemplo, Jolly *Cancer Gene Therapy* 1, 51-64 (1994), Latchman *Molec Biotechnol* 2, 179-195 (1994) y Johanning et al., *Nucl Acids Res* 23, 1495-1501 (1995).

Otros vectores víricos adecuados incluyen vectores del virus de la viruela. Los ejemplos de dichos vectores se discuten en, por ejemplo, Berencsi et al., *J Infect Dis* 183(8), 1171-9 (2001), Rosenwirth et al., *Vaccine* 19(13-14), 1661-70 (2001), Kittlesen et al., *J Immunol* 164(8), 4204-11 (2000), Brown et al., *Gene Ther* 7(19), 1680-9 (2000), Kanesa-thasan et al., *Vaccine* 19(4-5), 483-91 (2000), Sten, *Drua* 60(2), 249-71 (2000). Los vectores de virus vaccinia pueden ser vectores del virus de la viruela. Los ejemplos de dichos vectores y los usos de los mismos se proporcionan en, por ejemplo, Venugopal et al., *Res Vet Sci* 57(2), 188-193 (1994), Moss *Dev Biol Stand* 82, 55-63 (1994), Weisz et al., *Mol Cell Biol* 43, 137-159 (1994), Mahr y Payne, *Immunobiologev* 184(2-3), 126-146 (1992), Hruby, *Clin Microbiol Rev* 3(2), 153-170 (1990) y los documentos WO92/07944, WO98/13500, y WO89/08716.

Otras características de la presente invención incluyen células recombinantes, tales como células de levadura, bacterianas, y de mamífero (por ejemplo, células de mamífero inmortalizadas) que comprenden un ácido nucleico de

la invención, un vector de la invención, o combinaciones de uno cualquiera o ambos de los mismos. Por ejemplo, una realización es una célula que comprende un ácido nucleico integrado de manera estable en el genoma celular que comprende una secuencia que codifica para la expresión de un anticuerpo de CD38 de la presente invención. En una realización, la presente invención proporciona una célula que comprende un ácido nucleico no integrado, tal como un plásmido, cósmido, fagémido, o elemento de expresión lineal, que comprende una secuencia que codifica para la expresión de un CD38BP.

También se describen en el presente documento péptidos inmunogénicos que comprenden cualquiera de las partes determinantes antigénicas anteriormente descritas de CD38 específicas para los CD38BP tal como se describen en el presente documento, tales como las partes determinantes antigénicas de CD38 específicas para -003 y -005 y -024. Dichos inmunógenos pueden usarse para desencadenar una respuesta inmunitaria directa en un método que comprende un régimen de inmunoterapia activa. La presente divulgación proporciona además una proteína de fusión que comprende dicho inmunógeno de CD38 y una secuencia compañera de fusión que mejora la semivida de la proteína de fusión (por ejemplo, mediante la inclusión de una secuencia de dominio de inmunoglobulina); facilita la detección y/o purificación de la proteína de fusión (comprendiendo, por ejemplo, una secuencia peptídica fluorescente, una secuencia enzimática indicadora, un marcador epitópico, una secuencia de hexa-histidina, o similares); promueve el direccionamiento de la proteína de fusión (por ejemplo, comprendiendo un ligando o parte de un ligando específica para un receptor sobre una célula diana); promueve la inducción de una respuesta inmune distinta (por ejemplo, corresponde a un antígeno de cáncer o un fragmento inmunogénico del mismo); es un agente citotóxico; o logra cualquier combinación de los mismos (por ejemplo, un compañero de proteína de fusión de choque térmico puede aumentar una respuesta inmune generada contra una porción antigénica no similar, heteróloga de una proteína de fusión, a la vez que también aumenta la semivida *in vivo* de una proteína de fusión). Las proteínas de fusión también pueden comprender uno o más sitios de escisión, en particular entre dominios.

Las variantes de dichos péptidos, y los derivados de dichos péptidos inmunogénicos o variantes de péptidos inmunogénicos son características adicionales tal como se describen en el presente documento (por ejemplo, dichos derivados peptídicos inmunogénicos de CD38 pueden modificarse mediante acoplamiento químico, fusión genética, asociación no covalente, y similares, a otras entidades moleculares, tales como anticuerpos, toxinas, radioisótopos, agentes citotóxicos, o agentes citostáticos). Los mimótipos peptídicos, que comprenden secuencias de epítipo de CD38 también pueden, por ejemplo, ser útiles como candidatos a vacunas. Dichos péptidos también pueden ser útiles en la purificación de anticuerpos anti-CD38. Además de las secuencias epitópicas de células B descritas en el presente documento, dichos péptidos pueden modificarse o seleccionarse para que también o como alternativa comprendan uno o más epítopos de célula T anti-CD38. Dichos epítopos pueden identificarse mediante cualquier técnica adecuada conocida en la técnica (por ejemplo, mediante herramientas informáticas de predicción de epítopos de células T).

En el presente documento se describe un ácido nucleico que codifica dicho péptido inmunogénico. Dicho ácido nucleico puede suministrarse a un hospedador en un vector adecuado, tal como un vector dirigido deficiente para replicación (por ejemplo, un vector de ácido nucleico dirigido o un vector adenovírico dirigido, deficiente para replicación). La presente divulgación también proporciona composiciones de uno o más péptidos inmunogénicos similares y/o ácidos nucleicos que codifican péptidos inmunogénicos.

Los anticuerpos CD38BP de la presente invención incluyen anticuerpos "neutralizantes". La expresión "anticuerpo neutralizante" se refiere a un anticuerpo CD38BP que es capaz de inhibir sustancialmente o eliminar una actividad biológica de un péptido asociado a CD38. Normalmente, un anticuerpo neutralizante anti-CD38, puede inhibir, directa o indirectamente, la función de CD38, tal como la actividad enzimática, la transducción de señales, la inducción de expresión de citocinas, la inducción de la proliferación o diferenciación, o la inducción de la lisis, en un grado que es aproximadamente igual o mayor que la inhibición de dichas células debido a la administración de una cantidad aproximadamente igual de -003 o -005 o -024.

Un anticuerpo de CD38 de la presente invención puede tener cualquier afinidad y/o actividad adecuada para uno o más epítopos contenidos, al menos parcialmente, en CD38. Afinidad se refiere a la fuerza de unión del anticuerpo de CD38 a dicho epítipo. Normalmente, la afinidad se mide mediante la constante de disociación  $K_d$ , definida como  $[Ab] \times [Ag] / [Ab-Ag]$  donde  $[Ab-Ag]$  es la concentración molar del complejo anticuerpo-antígeno (o el complejo CD38BP-antígeno),  $[Ab]$  es la concentración molar del anticuerpo no unido (o CD38BP) y  $[Ag]$  es la concentración molar del antígeno no unido. La constante de afinidad  $K_a$  se define por  $1/K_d$ . Los métodos adecuados para determinar la especificidad y afinidad mediante inhibición competitiva pueden hallarse en, por ejemplo, Harlow et al., *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1988), Colligan et al., eds., *Current Protocols in Immunology*, Greene Publishing Assoc. y Wiley InterScience N.Y., (1992, 1993) y Muller, *Meth. Enzymol.* 92, 589-601 (1983).

Un CD38BP, y en particular los anticuerpos anti-CD38 de la presente invención pueden tener una afinidad por al menos un epítipo comprendido al menos parcialmente en CD38 en el intervalo de aproximadamente  $10^4$  a aproximadamente  $10^{10} M^{-1}$ . El término inmunorreaccionar se refiere típicamente en el presente documento a la unión de un CD38BP a un epítipo de CD38 con una constante de disociación  $K_d$  menor de aproximadamente  $10^{-4} M$ .

Un CD38BP puede tener una afinidad que es al menos igual de grande para CD38 que la de -003 y -005 y -024, y en algunas realizaciones, tiene una afinidad que es al menos aproximadamente igual de grande que la de -003 y -005 y -024. En particular, los anticuerpos anti-CD38 de la presente invención pueden tener una afinidad que es al menos tan grande por CD38 que -003, y en algunas realizaciones tiene una afinidad que es al menos aproximadamente tan grande como -003. La afinidad puede determinarse mediante cualquiera de los métodos descritos en otras partes del presente documento o sus equivalentes conocidos en la técnica. Un ejemplo de un método que puede usarse para determinar la afinidad se proporciona en el análisis de Scatchard de Munson y Pollard, Anal. Biochem. 107, 220 (1980). La afinidad de unión también puede determinarse mediante métodos de equilibrio (por ejemplo, ensayo inmunosorbente ligado a enzimas (ELISA) o radioinmunoensayo (RIA)) o análisis cinéticos (por ejemplo, análisis BIACORE™).

Normalmente, la constante de disociación para los CD38BP, tales como anticuerpos anti-CD38, de la presente invención es menor de aproximadamente 100 nM, menos de aproximadamente 50 nM, menos de aproximadamente 10 nM, aproximadamente 5 nM o menor, aproximadamente 1 nM o menor, aproximadamente 0,5 nM o menor, aproximadamente 0,1 nM o menor, aproximadamente 0,01 nM o menor, o incluso aproximadamente 0,001 nM o menor.

Los CD38BP, tales como los anticuerpos anti-CD38 de la presente invención, pueden mostrar características funcionales similares a -003 y -005 y -024, tales como las que pueden determinarse mediante ensayos de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC) y de citotoxicidad mediada por complemento (CDC) (véase, por ejemplo, el documento US 5500362).

En una realización, un anticuerpo anti-CD38 de acuerdo con la presente invención no actúa como agonista de CD38, sino como un antagonista de CD38. Un agonista de CD38 es una molécula, que activa una o más de las funciones adscritas a CD38. Dichas funciones pueden incluir la mediación de receptor en los acontecimientos de adhesión y señalización y en la actividad (ecto-)enzimática. Además, como ectoenzima, CD38 usa NAD<sup>+</sup> como sustrato para la formación de ADP-ribosa cíclica(cADPR) y ADPR, y también de nicotinamida y ácido nicotínico-adenina dinucleótido fosfato (NAADP). Se ha demostrado que el cADPR actúa como segundo mensajero para la movilización de Ca<sup>2+</sup> desde el retículo endoplasmático. Además de la señalización a través de Ca<sup>2+</sup>, la señalización de CD38 se produce mediante un diálogo cruzado con complejos de antígeno-receptor en las células T y B u otros tipos de complejos de receptor, por ejemplo, moléculas del CMH, y de este modo está implicado en varias respuestas celulares, pero también en el cambio y la secreción de IgG1.

En una realización, un anticuerpo anti-CD38 de acuerdo con la presente invención no induce una proliferación significativa de los las PBMC. En una realización, un anticuerpo anti-CD38 de acuerdo con la presente invención no induce la liberación de niveles significativos de IL-6. En una realización, un anticuerpo anti-CD38 de acuerdo con la presente invención no induce la liberación de niveles detectables de IFN- $\gamma$ . Dichos ensayos pueden medirse tal como se describe en Ausiello et al., Tissue antigens 56, 538-547 (2000).

Los anticuerpos anti-CD38 de la presente invención, así como otros CD38BP descritos en el presente documento pueden prepararse mediante expresión recombinante en cualquier tipo adecuado de células o animales.

Los CD39BP recombinantes, tales como anticuerpos recombinantes, tales como anticuerpos humanos recombinantes, incluyen CD38BP, tales como anticuerpos, tales como anticuerpos humanos que se preparan, expresan, crean o aíslan por medios recombinantes, tales como CD38BPs, tales como anticuerpos, tales como anticuerpos humanos expresados usando un vector de expresión recombinante transfectado a una célula hospedadora.

Los anticuerpos recombinantes, tales como anticuerpos humanos recombinantes incluyen también anticuerpos aislados a partir de una biblioteca recombinante, combinatoria de anticuerpos humanos, anticuerpos aislados de un animal, tal como un animal transgénico, o anticuerpos que se preparan, expresan, crean o aíslan mediante cualquier otro medio que implique el corte y empalme de secuencias de ácido nucleico que codifican inmunoglobulinas para otras secuencias de ácido nucleico exógenas para los ácidos nucleicos que codifican inmunoglobulina humana y genes que codifican inmunoglobulina humana. Los anticuerpos humanos recombinantes tienen típicamente regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana. En determinadas realizaciones, sin embargo, dichos anticuerpos humanos recombinantes se someten a mutagénesis *in vitro* (o, cuando se utiliza un animal transgénico para secuencias de Ig humanas, mutagénesis somática *in vivo*) y, por lo tanto, las secuencias de aminoácidos de las regiones V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> de los anticuerpos recombinantes pueden ser secuencias que, aunque se derivan de y están relacionadas con secuencias de V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> de línea germinal humana, pueden no existir de manera natural en el repertorio de línea germinal de anticuerpo humano *in vivo*. Ambos tipos de anticuerpos humanos se proporcionan de acuerdo con la presente invención.

Los métodos adecuados para la producción de proteínas recombinantes se conocen en la técnica, véase, por ejemplo (Sambrook y Russel (eds.), Molecular cloning, Tercera edición, 2001, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, EE.UU.

Del mismo modo, se conocen en la técnica métodos adecuados para la producción de anticuerpos e incluyen aquellos descritos en, por ejemplo, Harlow et al., *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., (1988), Harlow y Lane: *Using Antibodies: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press (1999)), el documento US 4.376.110 y Ausubel et al., eds., *Current Protocols In Molecular Biology*, Greene Publishing Assoc. y Wiley InterScience N.Y., (1987, 1992). Los anticuerpos monoclonales pueden producirse usando el método de hibridoma descrito por primera vez por Kohler et al., *Nature* 256, 495 (1975), o por otros métodos desarrollados posteriormente bien conocidos (véase, por ejemplo, Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, págs. 59-103 (Academic Press, 1986)). Los hibridomas útiles en la producción de anticuerpos anti-CD38 de la presente invención también se proporcionan por la presente invención. Dichos hibridomas pueden formarse mediante fusión química, fusión eléctrica, o cualquier otra técnica adecuada, con cualquier tipo adecuado de mieloma, heteromieloma, célula foblastoide, plasmacitoma u otro equivalente de las mismas y cualquier tipo adecuado de célula que exprese anticuerpo. También pueden usarse células B inmortalizadas transformadas para producir de manera eficiente anticuerpos de la presente invención y también se proporcionan de acuerdo con la presente invención. Dichas células pueden producirse mediante técnicas convencionales, tales como transformación con un virus de Epstein Barr, o un gen transformante. (Véase, por ejemplo, "Continuously Proliferating Human Cell Lines Synthesizing Antibody of Predetermined Specificity," Zurawaki, V. R. et al., en *Monoclonal Antibodies*, ed. de Kennett R. H. et al., Plenum Press, N.Y. 1980, págs. 19-33.). Por lo tanto, las células y líneas celulares estables y continuas y/o inmortalizadas que expresan anticuerpo anti-CD38 son una característica de acuerdo con la presente invención. Las células eucariotas y procariotas (por ejemplo, células de levadura, líneas celulares de mamífero continuas y/o inmortalizadas (por ejemplo, líneas celulares derivadas de células linfoides productoras de anticuerpos), células vegetales, células de insecto, y células bacterianas, tales como células de *E. coli*, etc.) que comprenden ácidos nucleicos que codifican CD38BP o que codifican fragmentos de CD38BP se proporcionan de acuerdo con la presente invención. Los animales transgénicos, tales como primates no humanos, roedores (por ejemplo, hámsteres, cobayas, y ratas - incluyendo cepas modificadas de los mismos, tales como ratones con inmunodeficiencia combinada grave (SCID) y otras cepas de animales inmunocomprometidos), perros, etc., que expresan anticuerpos anti-CD38 humano de la presente invención también se proporcionan de acuerdo con la presente invención.

Las células recombinantes que comprenden ácidos nucleicos exógenos que codifican CD38BP pueden prepararse mediante cualquier técnica adecuada (por ejemplo, transfección/transformación con un vector de plásmido de ADN desnudo, vector vírico, vector de célula bacteriana invasora u otro vector de célula completa, etc., que comprende una secuencia (o secuencias) que codifica un CD38BP en la célula mediante transfección facilitada por precipitación con fosfato de calcio, direccionamiento y transfección mediada por receptor, suministro biolístico, electroporación, transfección mediada por dextrano, transformación mediada por liposomas, fusión de protoplastos, microinyección directa, etc.). Los métodos para transformar/transfectar células se conocen bien en la técnica (véase, por ejemplo, Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press (2ª edición, 1989 y 3ª edición, 2001) y F. Ausubel et al., ed. *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing y Wiley InterScience, Nueva York (1987). Dichas células recombinantes que expresan un anticuerpo de la invención son una característica de la presente invención.

Las líneas celulares disponibles como hospedadores para la expresión de proteínas recombinantes se conocen bien en la técnica e incluyen muchas líneas celulares inmortalizadas disponibles a través de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC). Estos incluyen, entre otras cosas, células de ovario de hámster chino (CHO), NSO, células SP2, células HeLa, células de riñón de cría de hámster (BHK), células de riñón de mono (COS), células de carcinoma hepatocelular humano (por ejemplo, Hep G2), células A549, y una serie de líneas celulares distintas. Otras líneas celulares que pueden usarse son líneas celulares de insecto, tales como células Sf9. Cuando los ácidos nucleicos (o vectores que contienen ácidos nucleicos) que codifican proteínas, tales como CD38BP (incluyendo anticuerpos anti-CD38), se introducen en células hospedadoras de mamífero, las proteínas, tales como CD38BPs, pueden producirse cultivando las células hospedadoras durante un periodo de tiempo suficiente para permitir la expresión de la proteína, tal como CD38BP, en las células hospedadoras o mediante la secreción de la proteína, tal como CD38BP, en el medio de cultivo en el que se cultivan las células hospedadoras. Los CD38BP pueden recuperarse del medio de cultivo usando métodos de purificación de proteínas convencionales. Los CD38BP también pueden recuperarse de lisados de células hospedadoras cuando se expresan directamente sin una señal secretoria.

Los CD38BP, tales como anticuerpos anti-CD38, también pueden producirse en células bacterianas y microorganismos unicelulares eucariotas, tales como levaduras. Los CD38BP producidos en células bacterianas, tales como anticuerpos anti-CD38, carecen típicamente de glucosilación normal y los anticuerpos anti-CD38 producidos por células bacterianas pueden ser, por lo tanto, más o menos deficientes en términos de funciones de ADCC y otros aspectos de la respuesta inmunitaria asociada con anticuerpos anti-CD38 producidos en células de mamífero y/o animales (por ejemplo, el reclutamiento de células NK). Los CD38BP producidos por levaduras, tales como anticuerpos anti-CD38, muestran normalmente diferentes tipos de patrones de glucosilación que los anticuerpos producidos en células de mamífero. Sin embargo, los métodos para producir anticuerpos con glucosilación eficaz en levaduras se encuentran actualmente en desarrollo por compañías, tales como Glycofi, Inc. (Lebanon, NH, EE.UU.). Véase también Wildt S et al., *Nat Rev Microbiol.* 3(2), 119-28 (2005).

Cuando se introducen vectores de expresión recombinante que codifican genes de CD38BP (incluyendo genes de anticuerpo anti-CD38) en células hospedadoras de mamífero, los CD38BP se producen cultivando las células hospedadoras durante un periodo de tiempo suficiente para permitir la expresión del CD38BP en las células hospedadoras o para la secreción del anticuerpo en el medio de cultivo en el que se cultivan las células hospedadoras. La purificación de los anticuerpos y otros CD38BP de cultivos celulares, lisados celulares, y animales (por ejemplo, del fluido de ascitis de un animal transgénico que produce anticuerpos anti-CD38) puede lograrse mediante la aplicación de cualquier número de técnicas adecuadas conocidas en la técnica, incluyendo, por ejemplo, purificación en columna de inmunoafinidad; precipitación de sulfato; cromatografía; SDS-PAGE preparativa, y similares.

Los anticuerpos monoclonales humanos de la presente invención también pueden producirse mediante una serie de técnicas diferentes, incluyendo metodologías de anticuerpos monoclonales convencionales, por ejemplo, la técnica de hibridación de células somáticas convencional de Kohler y Milstein, Nature 256, 495 (1975). También pueden emplearse otras técnicas para producir anticuerpos monoclonales, por ejemplo, técnicas de presentación en fagos usando bibliotecas de genes de anticuerpo humanos. En una realización, los anticuerpos anti-CD38 de la presente invención se producen mediante el uso de hibridomas generados en un sistema murino. La producción de hibridoma en ratón es un procedimiento bien establecido. Se conocen en la técnica protocolos y técnicas de inmunización para el aislamiento de esplenocitos inmunizados para su fusión. Los compañeros de fusión (por ejemplo, células de mieloma murinos) y los procedimientos de fusión también son conocidos.

Para generar anticuerpos monoclonales completamente humanos para CD38, los ratones transgénicos o transcrómicos que contienen genes de inmunoglobulina humana (por ejemplo, ratones HCo12, HCo7 o KM) pueden inmunizarse con una preparación enriquecida de antígeno CD38 y/o células que expresan CD38, como se describe, por ejemplo, por Lonberg et al., (1994), anteriormente citado, Fishwild et al., (1996), anteriormente citado, y el documento WO 98/24884. Como alternativa, puede inmunizarse a los ratones con ADN que codifica CD38 humano. Los ratones pueden tener 6-16 semanas de edad tras la primera infusión. Por ejemplo, una preparación enriquecida (5-50 µg) del antígeno CD38 puede usarse para inmunizar al ratón HuMAb por vía intraperitoneal. En caso de que las inmunizaciones usando una preparación purificada o enriquecida del antígeno CD38 no de como resultado anticuerpos, también puede inmunizarse a los ratones con células que expresan CD38, por ejemplo, una línea celular, para promover las respuestas inmunitarias.

La experiencia acumulada con diversos antígenos ha demostrado que los ratones transgénicos HuMAb responden mejor cuando se inmunizan inicialmente por vía intraperitoneal (i.p.) o por vía subcutánea (s.c.) con células que expresan CD38 en adyuvante completo de Freund, seguido de inmunizaciones i.p. cada dos semanas (hasta un total de 10) con células que expresan CD38 en PBS. La respuesta inmunitaria puede controlarse a lo largo del transcurso del protocolo de inmunización con muestras de plasma que se obtienen mediante extracciones de sangre retroorbitales. El plasma puede explorarse mediante análisis FACS, y pueden usarse para las infusiones ratones con títulos suficientes de inmunoglobulina humana anti-CD38. Puede reforzarse a los ratones por vía intravenosa con células que expresan CD38 por ejemplo, 4 y 3 días antes de sacrificarlos y extirpación del bazo.

Para generar hibridomas que producen anticuerpos monoclonales humanos para CD38 humano, los esplenocitos y las células de los nódulos linfáticos de los ratones inmunizados pueden aislarse y fusionarse a una línea celular inmortalizada adecuada, tal como una línea celular de mieloma de ratón. Los hibridomas resultantes pueden explorarse después respecto de la producción de anticuerpos específicos de antígeno. Por ejemplo, pueden fusionarse suspensiones de células individuales de linfocitos esplénicos de ratones inmunizados a células de mieloma de ratón no secretoras SP2/0 (ATCC, CRL 1581) con PEG al 50% (p/v). Las células pueden emplacarse a aproximadamente  $1 \times 10^5$  por pocillo en placas de microtitulación de fondo plano, seguido de una incubación de dos semanas en medio selectivo que contiene aparte de los reactivos habituales, un 10% de suero clonal fetal, un 5-10% de factor de clonación de origen de hibridoma (IGEN) y HAT 1X (Sigma). Después de aproximadamente dos semanas, pueden cultivarse las células en medio en el que HAT se reemplaza por HT. Entonces pueden explorarse los pocillos individuales mediante ELISA para anticuerpos que contienen cadena ligera kappa humana y mediante análisis FACS usando células que expresan CD38 respecto de su especificidad para CD38. Una vez que se produce el crecimiento extenso del hibridoma, el medio puede observarse normalmente tras 10-14 días. Los hibridomas que secretan anticuerpo pueden volver a emplacarse, explorarse de nuevo, y si siguen siendo positivos para IgG humana, pueden subclonarse los anticuerpos monoclonales anti-CD38 al menos dos veces mediante dilución limitante. Entonces pueden cultivarse los subclones estables *in vitro* para generar anticuerpos en medio de cultivo tisular para su caracterización.

Los anticuerpos humanos de la presente invención también pueden producirse en una célula hospedadora de transfectoma usando, por ejemplo, una combinación de técnicas de ADN recombinante y métodos de transfección génica tal como se conoce en la técnica, véase, por ejemplo, Morrison, S., Science 229, 1202 (1985).

Por ejemplo, para expresar los anticuerpos, o los fragmentos de anticuerpo de los mismos, los ADN que codifican las cadenas ligeras y pesadas de longitud parcial o completa, pueden obtenerse mediante técnicas de biología molecular convencionales (por ejemplo, amplificación por la PCR, mutagénesis de sitio dirigido) y pueden insertarse en vectores de expresión de tal forma que los genes se unen operablemente a secuencias de control transcripcional

y traduccional. En este contexto, la expresión "unido operablemente" pretende hacer referencia a que un gen de anticuerpo se liga en un vector de tal forma que las secuencias de control transcripcional y traduccional en el vector cumplen su función prevista para regular la transcripción y traducción del gen de anticuerpo. El vector de expresión y las secuencias de control de la expresión se seleccionan para que sean compatibles con la célula hospedadora de expresión empleada. El gen de cadena ligera de anticuerpo y el gen de cadena pesada de anticuerpo puede insertarse en vectores separados o, más típicamente, ambos genes se insertan en el mismo vector de expresión. Los genes de anticuerpo pueden insertarse en el vector de expresión mediante métodos convencionales (por ejemplo, ligando de sitios de restricción complementarios en el fragmento y vector génico del anticuerpo, o ligadura de extremos romos en caso de que no estén presentes sitios de restricción). Las regiones variables de cadena ligera y pesada de los anticuerpos descritos en el presente documento pueden usarse para crear genes de anticuerpo de longitud completa de cualquier isotipo de anticuerpo insertándolos en vectores de expresión que ya codifican regiones constantes de cadena pesada y constantes de cadena ligera del isotipo deseado, de tal forma que el segmento V<sub>H</sub> está unido operablemente a los segmentos CH dentro del vector y el segmento V<sub>L</sub> está unido operablemente al segmento CL dentro del vector. Además, o como alternativa, el vector de expresión recombinante puede codificar un péptido de señal que facilita la secreción de la cadena de anticuerpo por parte de una célula hospedadora. El gen de cadena de anticuerpo puede clonarse en el vector de tal forma que el péptido de señal se liga en fase al extremo amino del gen de cadena de anticuerpo. El péptido de señal puede ser un péptido de señal de inmunoglobulina o un péptido de señal heterólogo (es decir, un péptido de señal de una proteína no de inmunoglobulina).

Además de los genes de cadena de anticuerpo, los vectores de expresión recombinante de la presente invención portan secuencias reguladoras que permiten y controlan la expresión de los genes de cadena de anticuerpo en una célula hospedadora.

Además de los genes de cadena de anticuerpo y las secuencias reguladoras, los vectores de expresión recombinante de la presente invención pueden portar secuencias adicionales, tales como secuencias que regulan la replicación del vector en células hospedadoras (por ejemplo, orígenes de replicación) y genes de marcador de selección. El gen marcador de selección facilita la selección de células hospedadoras en las que se ha introducido el vector (véanse, por ejemplo, los documentos US 4.399.216, US 4.634.665 y US 5.179.017). Por ejemplo, el gen marcador de selección confiere típicamente resistencia a fármacos, tales como G418, higromicina o metotrexato, en una célula hospedadora en la que se ha introducido el vector. Los ejemplos de genes marcadores de selección incluyen el gen de dihidrofolato reductasa (DHFR) (para su uso en células hospedadoras dhfr- con selección/amplificación de metotrexato) y el gen neo (para la selección de G418).

Para la expresión de las cadenas ligera y pesada, los vectores de expresión que codifican las cadenas pesada y ligera se transfectan en una célula hospedadora mediante técnicas convencionales. Las células hospedadoras pueden ser procariontes o eucariotas, tales como células hospedadoras de mamífero. Por ejemplo, pueden expresarse fragmentos de unión a antígeno en células hospedadoras eucariotas y pueden expresarse anticuerpos de longitud completa en células hospedadoras eucariotas.

En una realización, los anticuerpos se expresan en células eucariotas, tales como células hospedadoras de mamífero. Los ejemplos de células hospedadoras de mamífero para expresar los anticuerpos recombinantes de la presente invención incluyen células CHO (incluyendo células dhfr-CHO, descritas en Urlaub y Chasin, PNAS USA 77, 4216-4220 (1980), usadas con un marcador de selección de DHFR, por ejemplo, tal como se describe en R. J. Kaufman y P. A. Sharp, Mol. Biol. 159, 601-621 (1982)), células de mieloma NS/0, células COS, células HEK293 y células SP2.0. En particular para su uso con células de mieloma NS/0, otro ejemplo de un sistema de expresión es el sistema de expresión génica GS (glutamina sintetasa) divulgado en los documentos WO87/04462, WO89/01036 y EP338 841.

Los genes de CD38BP pueden expresarse en otros sistemas de expresión, incluyendo células procariontes, tales como microorganismos, por ejemplo, *E. coli* para la producción de anticuerpos scFv, algas, así como células de insecto. Además, los CD38BP pueden producirse en animales transgénicos no humanos, tal como en la leche de ovejas y conejos o en huevos de gallina, o en plantas transgénicas. Véase, por ejemplo, Verma, R. et al., J. Immunol. Meth. 216, 165-181 (1998), Pollock et al., J. Immunol. Meth. 231, 147-157 (1999) y Fischer, R. et al., Biol. Chem. 380, 825-839 (1999).

Los CD38BP biespecíficos y multiespecíficos, tales como los anticuerpos de la presente invención pueden producirse usando técnicas químicas (véase, por ejemplo, D. M. Kranz et al., PNAS USA 78, 5807 (1981)), técnicas de "polidoma" (véase el documento US 4.474.893) o técnicas de ADN recombinante.

Los anticuerpos biespecíficos de la presente invención pueden producirse mediante una variedad de métodos conocidos, incluyendo la fusión de hibridomas o la unión de fragmentos Fab' (véase, por ejemplo, Songsivilai y Lachmann, Clin. Exp. Immunol. 79, 315-321 (1990) y Kostelny et al., J. Immunol. 148, 1547-1553 (1992)). Tradicionalmente, la producción recombinante de anticuerpos biespecíficos está basada en la expresión conjunta de dos pares de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina, donde las dos cadenas pesadas tienen especificidades diferentes (véase, por ejemplo, Milstein y Cuello, Nature 305, 537 (1983)). Debido a la distribución al

azar de las cadenas ligeras y pesadas de inmunoglobulina, estos hibridomas (cuadromas) reproducen una mezcla potencial de 10 moléculas de anticuerpo diferentes, de las cuales solo una tiene la estructura biespecífica correcta. Se divulgan procedimientos similares en el documento WO 93/08829 y en Traunecker et al., EMBO J. 10, 3655 (1991).

5 De acuerdo con un enfoque diferente, los dominios variables de anticuerpo con las especificidades deseadas (sitios de combinación de anticuerpo-antígeno) se fusionan con secuencias de dominio constante de inmunoglobulina mediante métodos recombinantes o sintéticos. La secuencia de dominio variable se fusiona típicamente a un dominio constante de cadena pesada de inmunoglobulina, que comprende al menos parte de las regiones bisagra,  $C_{H2}$ , y  $C_{H3}$ . También típicamente, una primera región constante de cadena pesada ( $C_{H1}$ ), que contiene el sitio necesario para la unión a la cadena ligera, se encuentra también presente en al menos uno de los péptidos de fusión. En un ejemplo más específico de este tipo de estrategia, se produce un anticuerpo biespecífico que comprende una cadena pesada de inmunoglobulina híbrida con una primera especificidad de unión en un brazo, y un par de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina (proporcionando una segunda especificidad de unión) en el otro brazo. Dicha estructura asimétrica puede facilitar la separación del compuesto biespecífico deseado de combinaciones de cadena de inmunoglobulina no deseadas (dicha estrategia se describe en el documento WO 94/04690). Para detalles adicionales acerca de la generación de anticuerpos biespecíficos véase, por ejemplo, Suresh et al., *Methods in Enzymology* 121, 210 (1986).

20 En otro enfoque, puede modificarse la interfaz entre un par de moléculas de anticuerpo para maximizar el porcentaje de heterodímeros que se recuperan del cultivo de células recombinantes para formar una población de moléculas de anticuerpo biespecíficas. Normalmente, dicha interfaz comprende al menos una parte del dominio  $C_{H3}$  de una región constante de anticuerpo. Normalmente en dicho método, se reemplazan uno o más residuos de aminoácidos con cadenas laterales más pequeñas de la interfaz de la primera molécula de anticuerpo con residuos de aminoácido con cadenas laterales mayores (tales como tirosina o triptófano). En la interfaz del segundo anticuerpo se crean "cavidades" compensatorias de un tamaño idéntico o similar a los residuos de aminoácido de cadena lateral grande mediante el reemplazo de residuos de aminoácidos de cadena lateral grande con otros más pequeños (tales como alanina o treonina). Esto puede proporcionar un mecanismo para aumentar el rendimiento del heterodímero frente a otros productos finales no deseados, tales como homodímeros.

30 Las moléculas biespecíficas y multiespecíficas de la presente invención pueden prepararse conjugado las especificidades de unión constitutivas, por ejemplo, las especificidades de unión anti-FcR y anti-CD38, usando métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, cada especificidad de unión de la molécula biespecífica y multiespecífica puede generarse por separado y después conjugarse a la otra. Cuando las especificidades de unión son proteínas o péptidos, puede emplearse una serie de agentes de acoplamiento o de sobrecruzamiento para la conjugación covalente. Los ejemplos de agentes reticulantes incluyen proteína A, carbodiimida, N-succinimidil-S-acetil-tioacetato (SATA), 5,5'-ditiobis(ácido 2-nitrobenzoico) (DTNB), o-fenilendimaleimida (oPDM), N-succinimidil-3-(2-piridiltio)propionato (SPDP) y 4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato de sulfosuccinimidilo (sulfo-SMCC), véase, por ejemplo, Karpovsky et al., *J. Exp. Med.* 160, 1686 (1984), Liu, M. A. et al., *PNAS USA* 82, 8648 (1985).  
 40 En otro ejemplo, Brennan et al., *Science* 229, 81 (1985) describen un procedimiento en el que se escinden proteolíticamente anticuerpos intactos para generar fragmentos  $F(ab)_2$ . Estos fragmentos se reducen en presencia del agente formador de complejos de ditiol, arsenito de sodio, para estabilizar ditiolos vecinales y evitar la formación de disulfuros intermoleculares. Los fragmentos  $Fab'$  generados pueden convertirse a derivados de tionitrobenzoato (TNB). Uno de los derivados  $Fab'$ -TNB puede reconvertirse al  $Fab'$ -tiol mediante reducción con mercaptoetilamina y se mezcla con una cantidad equimolar del otro derivado  $Fab'$ -TNB para formar un anticuerpo biespecífico. Shalaby et al., *J. Exp. Med.* 175, 217-225 (1992) describen la producción de una molécula de anticuerpo biespecífica  $F(ab)_2$  totalmente humanizada, según una técnica relacionada. Otros métodos incluyen aquellos descritos por Paulus (Behring Ins. Mitt. n.º 78, 118-132 (1985)) y Glennie et al., *J. Immunol.* 139, 2367-2375 (1987). Los ejemplos de agentes conjugantes son SATA y sulfo-SMCC, pudiéndose adquirir ambos a través de Pierce Chemical Co. (Rockford, IL).

55 Cuando las especificidades de unión son anticuerpos, pueden conjugarse mediante enlace de sulfhidrilo de las regiones bisagra del extremo C-terminal de las dos cadenas pesadas. En una realización, la región bisagra se modifica para que contenga un número impar de residuos de sulfhidrilo, por ejemplo, uno, antes de la conjugación.

60 Como alternativa, ambas especificidades de unión pueden estar codificadas en el mismo vector y expresarse y ensamblarse en la misma célula hospedadora. Este método es particularmente útil en los casos donde la molécula biespecífica y multiespecífica es una proteína de fusión  $mAb \times mAb$ ,  $mAb \times Fab$ ,  $Fab \times F(ab)_2$  o ligando  $\times Fab$ . Una molécula biespecífica y multiespecífica de la presente invención, por ejemplo, una molécula biespecífica, puede ser una molécula monocatenaria, tal como un anticuerpo biespecífico monocatenario, una molécula biespecífica monocatenaria que comprende un anticuerpo monocatenario y un determinante de unión, o una molécula biespecífica monocatenaria que comprende dos determinantes de unión. Las moléculas biespecíficas y multiespecíficas también pueden ser moléculas monocatenarias o pueden comprender al menos dos moléculas monocatenarias. Los métodos para preparar moléculas bi y multiespecíficas se describen en, por ejemplo, los documentos US 5.260.203, US 5.455.030, US 4.881.175, US 5.132.405, US 5.091.513, US 5.476.786, US 5.013.653, US 5.258.498 y US 5.482.858.

También se han descrito varias técnicas para preparar y aislar fragmentos de anticuerpo biespecíficos directamente a partir de cultivo de células recombinantes. Por ejemplo, se han producido anticuerpos biespecíficos usando cremalleras de leucina (véase, por ejemplo, Kostelny et al., *J. Immunol.* 148(5), 1547-1553 (1992)). Pueden unirse péptidos de cremallera de leucina de las proteínas Fos y Jun a las porciones Fab' de dos anticuerpos diferentes mediante fusión génica y reducirse los homodímeros de anticuerpo resultante en la región bisagra para formar monómeros que pueden volver a oxidarse para formar los heterodímeros de anticuerpo. La tecnología de "diacuerpos" se describe por Hollinger et al., *PNAS USA* 90, 6444-6448 (1993) también ha proporcionado un mecanismo alternativo para preparar fragmentos de anticuerpo biespecíficos. También se ha comunicado otra estrategia para preparar fragmentos de anticuerpo biespecíficos mediante el uso de dímeros monocatenarios de Fv (sFv). Véase, por ejemplo, Gruber et al., *J. Immunol.* 152, 5368 (1994).

Además, pueden formarse anticuerpos biespecíficos en forma de "diacuerpos" (Hollinger et al., *PNAS USA*, 90, 6444-6448 (1993)) o "Janusinas" (Traunecker et al., *EMBO J* 10, 3655-3659 (1991) y Traunecker et al., *Int J Cancer Suppl* 7, 51-52 (1992)). Los anticuerpos biespecíficos, por definición, no existen en forma de fragmentos que tengan un solo sitio de unión (por ejemplo, fragmentos Fab, Fab', y Fv, que también se proporcionan por la presente invención).

La unión de las moléculas biespecíficas y multiespecíficas a sus dianas específicas puede confirmarse mediante ensayo inmunosorbente ligado a enzimas (ELISA), un radioinmunoensayo (RIA), análisis FACS, un bioensayo (por ejemplo, inhibición del crecimiento), o un ensayo de Western blot. Cada uno de estos ensayos detecta generalmente la presencia de complejos de proteína-anticuerpo de interés particular empleando un reactivo marcado (por ejemplo, un anticuerpo) específico para el complejo de interés. Por ejemplo, los complejos de FcR-anticuerpo pueden detectarse usando, por ejemplo, un anticuerpo ligado a una enzima o un fragmento de anticuerpo que reconoce y se une específicamente a los complejos anticuerpo-FcR. Como alternativa, los complejos pueden detectarse usando cualquiera de una serie de inmunoensayos diferentes. Por ejemplo, el anticuerpo puede marcarse radiactivamente y usarse en un radioinmunoensayo (RIA) (véase, por ejemplo, Weintraub, B., *Principles of Radioimmunoassays, Seventh Training Course on Radioligand Assay Techniques, The Endocrine Society, Marzo, 1986*). El isótopo radiactivo puede detectarse por medios tales como el uso de un contador y o un contador de centelleo o mediante autorradiografía.

Tal como se ha afirmado anteriormente, los anticuerpos interactúan con antígenos diana principalmente a través de residuos de aminoácidos que se ubican en las seis regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de cadena pesada y ligera. En el presente documento se describen anticuerpos que tienen regiones CDR idénticas a o de otro modo derivadas de las regiones CDR de -005 o -024. Dichos anticuerpos pueden generarse construyendo vectores de expresión que incluyen secuencias CDR de -005 o -024 injertadas en secuencias marco conservadas de un anticuerpo diferente con propiedades diferentes.

Los anticuerpos de la invención pueden tener regiones CDR idénticas a o de otro modo derivadas de las regiones CDR de -003. Dichos anticuerpos pueden generarse construyendo vectores de expresión que incluyen secuencias CDR de -003 injertadas en secuencias marco conservadas de un anticuerpo diferente con propiedades diferentes.

Dichas secuencias marco conservadas pueden obtenerse de bases de datos de ADN públicas que incluyen secuencias génicas de anticuerpo de línea germinal. Estas secuencias de línea germinal diferirán de las secuencias génicas de anticuerpo maduras debido a que no incluirán genes variables completamente ensamblados, que se forman mediante unión de V(D)J durante la maduración de células B. Las secuencias de gen de línea germinal también difieren de las secuencias de un anticuerpo de repertorio secundario de alta afinidad que contiene mutaciones a lo largo del gen variable pero que se agrupan típicamente en las CDR. Por ejemplo, las mutaciones somáticas son relativamente infrecuentes en la parte amino-terminal de la región marco conservada 1 y en la parte carboxi-terminal de la región marco conservada 4. Por este motivo, no es necesario obtener la secuencia de ADN completa de un anticuerpo particular para recrear un anticuerpo recombinante intacto que tenga propiedades de unión similares a aquellas del anticuerpo original (véase el documento WO 99/45962). La secuencia de cadena pesada y ligera parcial que abarca las regiones CDR es típicamente suficiente para este fin. La secuencia parcial se usa para determinar qué segmentos génicos variables y de unión de línea germinal contribuyen a los genes variables de anticuerpo recombinados. Entonces se usa la secuencia de línea germinal para rellenar las partes ausentes de las regiones variables. Las secuencias líder de cadena pesada y ligera se escinden durante la maduración de proteínas y no contribuyen a las propiedades del anticuerpo final. Para añadir las secuencias faltantes, pueden combinarse secuencias de ADNc clonadas con oligonucleótidos sintéticos mediante ligación o amplificación PCR. Como alternativa, la región variable completa puede sintetizarse como un conjunto de oligonucleótidos cortos, solapantes, y combinarse mediante amplificación PCR para crear un clon de región variable completamente sintético. Este proceso tiene determinadas ventajas, tales como la eliminación o inclusión de sitios de restricción particulares, o la optimización de codones particulares.

Las secuencias de nucleótidos de transcritos de cadena pesada y ligera de hibridomas se usan para diseñar un conjunto solapante de oligonucleótidos sintéticos para crear secuencias V sintéticas con capacidades de codificación de aminoácidos idénticas a las de las secuencias naturales. Las secuencias sintéticas de cadena pesada y kappa pueden diferir respecto de las secuencias naturales de tres maneras: las series de bases de nucleótidos repetidas se

interrumpen para facilitar la síntesis de oligonucleótidos y la amplificación PCR; los sitios de inicio de la traducción óptimos se incorporan de acuerdo con las reglas de Kozak (Kozak, J. Biol. Chem. 266, 19867-19870 (1991)); y se diseñan sitios de *HindIII* cadena arriba de los sitios de inicio de la traducción.

- 5 Para las regiones variables tanto de cadena pesada como ligera, se rompen las secuencias de hebra codificante y no codificante correspondientes optimizadas en 30-50 nucleótidos aproximadamente hacia la mitad del oligonucleótido no codificante correspondiente. Por lo tanto, para cada cadena, los oligonucleótidos pueden ensamblarse en conjuntos bicatenarios solapantes que abarcan segmentos de 150-400 nucleótidos. Entonces se usan los agrupamientos como moldes para producir productos de amplificación de la PCR de 150-400 nucleótidos.
- 10 Normalmente, se romperá un solo conjunto de oligonucleótidos de región variable en dos grupos que se amplifican por separado para generar dos productos de PCR solapantes. Entonces se combinan estos productos solapantes mediante amplificación PCR para formar la región variable completa. También puede ser deseable incluir un fragmento solapante de la región constante de cadena pesada o ligera (incluyendo el sitio *BbsI* de la cadena ligera kappa, o el sitio *AgeI* de la cadena pesada gamma) en la amplificación PCR para generar fragmentos que pueden clonarse fácilmente en las construcciones de vector de expresión.
- 15

Las regiones variables de cadena pesada y ligera reconstruidas se combinan entonces con secuencias clonadas de promotor, líder, iniciador de la traducción, región constante, 3' no traducida, poliadenilación, y terminación de la transcripción, para formar construcciones de vector de expresión. Las construcciones de expresión de cadena pesada y ligera pueden combinarse en un solo vector, cotransfectarse, transfectarse en serie, o transfectarse por separado en células hospedadoras que se fusionan a continuación para formar una célula hospedadora que expresa ambas cadenas.

20

Puede emplearse un procedimiento similar para injertar nueva especificidad de antígeno en un anticuerpo maduro existente. Normalmente, se selecciona un anticuerpo aceptor que se origina del mismo gen variable de línea germinal que el anticuerpo donante de la CDR, pero también pueden seleccionarse otros anticuerpos aceptores. Entonces se transfieren una o más CDR del anticuerpo donante usando las técnicas descritas anteriormente.

25

Se pueden usar las características estructurales de -003 y -005 y -024 para crear anticuerpos anti-CD38 estructuralmente relacionados, por ejemplo, anticuerpos humanos anti-CD38, que retienen al menos una propiedad funcional de -003 y -005 y -024, a saber, unión a CD38. Más específicamente, pueden combinarse de manera recombinante una o más regiones CDR de -003 o -005 o -024 con regiones marco conservadas y CDR humanas conocidas para crear anticuerpos adicionales, modificados de manera recombinante, humanos anti-CD38.

30

Los plásmidos ejemplares para su uso en la construcción de vectores de expresión para IgGk humana se describen más adelante. Los plásmidos se construyeron de tal forma que las secuencias de ADNc de cadena V kappa pesada y V kappa ligera amplificadas por la PCR pudieron usarse para reconstruir minigenes de cadena pesada y ligera completos. Estos plásmidos pueden usarse para expresar anticuerpos IgG1,k o IgG4,k completamente humanos. Pueden construirse plásmidos similares para la expresión de otros isotipos de cadena pesada, o para la expresión de anticuerpos que comprenden cadenas ligeras lambda.

35

40

Los anticuerpos CD38BP de la presente invención, tales como anticuerpos humanos anti-CD38 de la presente invención, pueden aislarse y caracterizarse mediante una serie de formas diferentes. Por ejemplo, pueden cultivarse hibridomas seleccionados en matraces adecuados para la purificación de anticuerpos monoclonales. Entonces pueden filtrarse los sobrenadantes y concentrarse antes de la cromatografía de afinidad con proteína A-sefarosa (para anticuerpos de isotipo IgG1) (Pharmacia, Piscataway, NJ) o sefarosa o proteína G-sefarosa recubierta con IgG anti-humana en el caso de anticuerpos de isotipo IgG3. Pueden comprobarse las IgG eluidas mediante electroforesis en gel y cromatografía líquida de alto rendimiento para asegurar la pureza. La solución tamponadora puede cambiarse por PBS, puede determinarse la concentración mediante la  $DO_{280}$  usando un coeficiente de extinción de 1,43. Los anticuerpos monoclonales pueden separarse en alícuotas y almacenarse a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

45

50

Para determinar si los CD38BP seleccionados, tales como anticuerpos monoclonales humanos anti-CD38, se unen a epítopos únicos, puede usarse mutagénesis de sitio dirigido o de sitios múltiples.

55 Para determinar el isotipo de los anticuerpos purificados, pueden efectuarse ELISA de isotipo. Pueden recubrirse los pocillos de placas de microtitulación con  $10\ \mu\text{g/ml}$  de Ig anti-humano durante una noche a  $4^{\circ}\text{C}$ . Después de bloquear con BSA (albúmina sérica bovina) al 5%, se hacen reaccionar las placas con  $10\ \mu\text{g/ml}$  de anticuerpos monoclonales o controles de isotipo purificados, a temperatura ambiente durante dos horas. Entonces pueden hacerse reaccionar los pocillos con IgG1 humana, IgG2, IgG3 o IgG4, IgE, IgA1, IgA2, o sondas conjugadas a fosfatasa alcalina específicas para IgM humanas. Después de lavar, se revelan las placas con sustrato pNPP ( $1\ \text{mg/ml}$ ) y se analizan mediante la DO a 405 nm.

60

Para demostrar la presencia de anticuerpos anti-CD38 en sueros de ratones inmunizados o la unión de los CD38BP (incluyendo anticuerpos anti-CD38) a células vivas que expresan el CD38, puede emplearse citometría de flujo. En resumen, se mezclan líneas celulares que expresan CD38 (cultivadas en condiciones de cultivo convencionales) con diversas concentraciones de CD38BP en PBS que contiene BSA al 0,1 % y azida sódica al 0,02%, y se incuban a

65

4°C durante 30 minutos. Después de lavar, las células se hacen reaccionar con anticuerpo IgG anti-humano marcado con fluoresceína en las mismas condiciones que la tinción de anticuerpo primario. Las muestras pueden analizarse mediante citometría de flujo con un citómetro de flujo (por ejemplo, un instrumento FACS de Becton Dickinson) usando las propiedades de dispersión de luz y lateral para clasificar células individuales vivas. Puede usarse un ensayo alternativo usando microscopía de fluorescencia (además de o en lugar de) el ensayo de citometría de flujo. Las células pueden teñirse exactamente como se ha descrito anteriormente y examinarse mediante microscopía de fluorescencia. Este método permite la visualización de células individuales, pero puede tener una sensibilidad reducida dependiendo de la densidad del antígeno.

Los CD38BP, tales como las IgG humanas anti-CD38, pueden ensayarse adicionalmente respecto de su reactividad con antígeno CD38 mediante Western blot. En resumen, pueden prepararse extractos celulares de células que expresan CD38 y someterse a electroforesis en gel de poliacrilamida de dodecilsulfato sódico (SDS). Después de la electroforesis, los antígenos separados se transferirán a membranas de nitrocelulosa, bloqueadas con leche desgrasada al 20%, y se sondan con los CD38BP que se van a ensayar. La unión a IgG humana puede detectarse usando fosfatasa alcalina anti-IgG humana y revelarse con comprimidos de sustrato BCIP/NBT (Sigma Chem. Co., St. Louis, MO), pero también pueden usarse agentes de detección dirigidos a otras partes específicas del CD38BP.

Además de unirse específicamente a CD38, los CD38BP (incluyendo anticuerpos humanos anti-CD38) pueden ensayarse respecto de su capacidad para inhibir diversas actividades de células que expresan CD38, tales como, pero sin restringirse a, producción de insulina, liberación de  $Ca^{2+}$ , producción de citocinas, inducción de lisis, diferenciación, y proliferación.

En una realización, en el presente documento se describen animales no humanos transgénicos y transcromosómicos, tales como ratones transgénicos o transcromosómicos, que son capaces de expresar anticuerpos humanos que se unen específicamente a CD38. En particular, en el presente documento se describe un ratón transgénico o transcromosómico que comprende un trasgén de cadena pesada humana, de tal forma que el ratón produce anticuerpos anti-CD38 humanos cuando se inmuniza con células que expresan CD38. El trasgén de cadena pesada humana puede integrarse en el ADN cromosómico del ratón, como es el caso de los ratones transgénicos, por ejemplo, HuMAb, tal como se describe detalladamente en el presente documento. Como alternativa, el trasgén de cadena pesada humana puede mantenerse de manera extracromosómica, como es el caso de ratones transcromosómicos (por ejemplo, KM) tal como se describe en el documento WO02/43478. Dichos animales transgénicos y transcromosómicos son capaces de producir múltiples isotipos de anticuerpos monoclonales humanos para CD38 (por ejemplo, IgG, IgA y/o IgE) sometidos a recombinación V-D-J/V-J e intercambio de isotipo. El diseño de un animal no humano transgénico o transcromosómico que responde a estimulación con antígeno exógeno con un repertorio de anticuerpo heterólogo, requiere que los transgenes de inmunoglobulina heterólogos contenidos dentro del animal transgénico funcionen correctamente mediante la vía de desarrollo de células B. Esto incluye, por ejemplo, intercambio de isotipo del trasgén de cadena pesada heterólogo. Por consiguiente, se construyen transgenes de tal forma que pueda inducirse el intercambio de isotipo y una o más de las siguientes características de genes de anticuerpo: (1) expresión de alto nivel y específica de tipo celular, (2) reordenamiento génico funcional, (3) activación de y respuesta a la exclusión alélica, (4) expresión de un repertorio primario suficiente, (5) transducción de señales, (6) hipermutación somática, y (7) dominio del locus del trasgén de anticuerpo durante la respuesta inmune.

No es necesario que se cumplan todos los criterios anteriores. Por ejemplo, cuando los locus de inmunoglobulina endógenos del animal transgénico están rotos funcionalmente, el trasgén no necesita activar la exclusión alélica. Además, en donde el trasgén comprende un gen de inmunoglobulina de cadena pesada y/o ligera reorganizado, es innecesario el segundo criterio de reorganización génica funcional, al menos para aquel trasgén que ya se encuentre reorganizado. Para información general acerca de la inmunología molecular, véase, *Fundamental Immunology*, 2ª edición (1989), Paul William E., ed. Raven Press, N.Y.

En determinadas realizaciones, los animales no humanos transgénicos o transcromosómicos usados para generar los anticuerpos monoclonales humanos de la presente invención contienen transgenes reorganizados, no reorganizados o una combinación de transgenes de cadena pesada y ligera de inmunoglobulina heterólogos reorganizados y no reorganizados en la línea germinal del animal transgénico. Cada uno de los transgenes de cadena pesada comprende al menos un gen de  $C_H$ . Además, el trasgén de cadena pesada puede comprender secuencias de intercambio de isotipo funcionales, que son capaces de soportar el intercambio de isotipo de un trasgén heterólogo que codifica múltiples genes de  $C_H$  en las células B del animal transgénico. Dichas secuencias de intercambio pueden ser aquellas que se producen naturalmente en el locus de inmunoglobulina de línea germinal de la especie que sirve como fuente de los genes del trasgén de  $C_H$ , o dichas secuencias de intercambio pueden derivarse de aquellas que se producen en la especie que va a recibir la construcción de trasgén (el animal transgénico). Por ejemplo, una construcción de trasgén humano que se usa para producir un ratón transgénico puede producir una mayor frecuencia de acontecimientos de intercambio de isotipo si incorpora secuencias de intercambio similares a aquellas que se producen de manera natural en el locus de cadena pesada de ratón, ya que supuestamente, las secuencias de intercambio de ratón se optimizan para funcional con el sistema de enzima recombinasa de intercambio de ratón, mientras que las secuencias de intercambio de ratón no. Las secuencias de intercambio pueden aislarse y clonarse mediante métodos de clonación convencionales, o pueden sintetizarse de

*novo* a partir de oligonucleótidos sintéticos solapantes basándose en información de secuencia publicada relativa a secuencias de región de intercambio de inmunoglobulina (Mills et al., Nucl. Acids Res. 15, 7305-7316 (1991) Sideras et al., Intl. Immunol. 1, 631-642 (1989)). Para cada uno de los animales transgénicos anteriores, los transgenes de inmunoglobulina de cadena pesada y ligera heterólogos reorganizados funcionalmente se encuentran en una proporción significativa de las células B del animal transgénico (al menos el 10%).

Los transgenes usados para generar los animales transgénicos no humanos tal como se describen en el presente documento incluyen un transgén de cadena pesada que comprende ADN que codifica al menos un segmento génico variable, un segmento génico de diversidad, un segmento génico de unión y al menos un segmento génico de región constante. El transgén de cadena ligera de inmunoglobulina comprende ADN que codifica al menos un segmento génico variable, un segmento génico de unión y al menos un segmento génico de región constante. Los segmentos génicos que codifican los segmentos génicos de cadena ligera y pesada son heterólogos para el animal transgénico en tanto que se derivan de, o corresponden a, ADN que codifica segmentos génicos de cadena pesada y ligera de inmunoglobulina de una especie que no consiste en el animal transgénico no humano. El transgén se puede construir de tal modo que los segmentos génicos individuales no están reorganizados, es decir, no reorganizados para codificar una cadena ligera o pesada de inmunoglobulina funcional. Dichos transgenes no reorganizados soportan la recombinación de los segmentos génicos V, D, y J (reorganización funcional) y pueden soportar la incorporación de la totalidad o parte de un segmento génico de región D en la cadena pesada de inmunoglobulina reorganizada resultante dentro del animal transgénico cuando se expone al antígeno CD38.

En una realización alternativa, los transgenes comprenden un "minilocus" no reorganizado. Dichos transgenes comprenden típicamente una porción sustancial de los segmentos C, D, y J así como un subconjunto de los segmentos génicos V. En dichas construcciones de transgén, las diversas regiones reguladoras, por ejemplo, promotores, potenciadores, regiones de intercambio de clase, secuencias de donante de corte y empalme y de aceptor de corte y empalme para el procesamiento de ARN, señales de recombinación y similares, comprenden secuencias correspondientes derivadas del ADN heterólogo. Dichas secuencias reguladoras pueden incorporarse en el transgén de la misma especie o una relacionada del animal no humano usado. Por ejemplo, los segmentos génicos de inmunoglobulina humanos pueden combinarse en un transgén con una secuencia potenciadora de inmunoglobulina de roedor para su uso en un ratón transgénico. Como alternativa, pueden incorporarse secuencias reguladoras sintéticas en el transgén, en donde dichas secuencias reguladoras sintéticas no son homólogas para una secuencia de ADN funcional que se sabe que se produce de manera natural en los genomas de animales. Las secuencias reguladoras sintéticas se diseñan de acuerdo con reglas consenso, tales como, por ejemplo, aquellas que especifican las secuencias permisibles de un sitio aceptor de corte y empalme o un motivo promotor/potenciador. Por ejemplo, un minilocus comprende una parte de los locus genómicos de inmunoglobulina que tienen al menos una eliminación interna (es decir, no en un extremo de la porción) de una parte de ADN no esencial (por ejemplo, secuencia intermedia; intrón o porción del mismo) en comparación con el locus de Ig de línea germinal de origen natural.

Los ejemplos de animales no humanos transgénicos y transcromosómicos, tales como ratones, mostrarán producción de inmunoglobulinas con un repertorio significativo, de manera ideal sustancialmente similar al de un ser humano después de ajustar respecto al volumen.

De manera ideal, el repertorio se aproximará a aquel mostrado en un ser humano cuando se ajusta respecto al volumen, normalmente con una diversidad aproximadamente un 10% igual de grande, tal como del 25 al 50% o más. En general, se producirán al menos aproximadamente mil inmunoglobulinas diferentes (idealmente, IgG), tal como de  $10^4$  a  $10^6$  o más, dependiendo del número de diferentes regiones V, J y D introducidas en el genoma de ratón y dirigidas por la diversidad adicional generada por las reorganizaciones de segmento génico V(-D)-J y las adiciones de nucleótidos aleatorios en las regiones de unión. Normalmente, las inmunoglobulinas mostrarán una afinidad ( $K_D$ ) para antígenos preseleccionados de menos de  $10^{-8}$  M, tal como de menos de  $10^{-9}$  M,  $10^{-10}$  M or  $10^{-11}$  M o incluso menor. Los animales no humanos transgénicos y transcromosómicos, por ejemplo, ratones, tal como se han descrito anteriormente, pueden inmunizarse con, por ejemplo, células que expresan CD38. Como alternativa, los animales transgénicos pueden inmunizarse con ADN que codifica CD38 humano. Entonces los animales producirán células B que sufren intercambio de clase mediante recombinación de intercambio (intercambio *cis*) y expresarán inmunoglobulinas reactivas para CD38. Las inmunoglobulinas serán anticuerpos humanos (también citados como "anticuerpos de secuencia humana"), en donde los polipéptidos de cadena pesada y ligera están codificados por secuencias de transgén humanas, que pueden incluir secuencias derivadas mediante mutación somática y uniones recombinatorias de región V, así como secuencias codificadas por la línea germinal; estos anticuerpos humanos pueden citarse como sustancialmente idénticos a una secuencia polipeptídica codificada por los segmentos génicos  $V_L$  y  $J_L$  o  $V_H$ ,  $D_H$  y  $J_H$  humanos, aunque pueden estar presentes otras secuencias no de línea germinal como resultado de mutación somático y uniones de recombinación V-J y V-D-J. Las regiones variables de cada cadena de anticuerpo son típicamente al menos un 80 por ciento similares a los segmentos génicos de línea germinal humana V, y J, y, en el caso de las cadenas pesadas, segmentos génicos de línea germinal humana V, D, y J; con frecuencia idénticos en al menos un 85 por ciento a secuencias de línea germinal humana presentes en el transgén; a menudo similares en un 90 o 95 por ciento a las secuencias de línea germinal humana presentes en el transgén. Sin embargo, ya que se introducen secuencias no de línea germinal mediante mutación somática y unión VJ y VDJ, los anticuerpos de secuencia humana con frecuencia tendrán algunas secuencias de región variable que no están

codificadas por los segmentos génicos humanos V, D, o J, tal como se encuentran en los transgenes humanos en la línea germinal de los ratones. Normalmente, dichas secuencias no de línea germinal (o posiciones de nucleótidos individuales) se agruparán en o próximas a las CDR, o en regiones donde se sabe que se agrupan las mutaciones somáticas.

5 La presente divulgación también describe células B derivadas de animales no humanos transgénicos o transcrómicos, tal como se describen en el presente documento. Pueden usarse las células B para generar hibridomas que expresan anticuerpos monoclonales humanos que se unen con alta afinidad (por ejemplo, con una constante de equilibrio de disociación ( $K_D$ ) de menos de  $10^{-8}$  M) a CD38 humano. Por lo tanto, en una realización, en el presente documento se proporciona un hibridoma que produce un anticuerpo humano que tiene una afinidad ( $K_D$ ) menor de  $10^{-8}$  M, tal como de menos de  $10^{-9}$  M,  $10^{-10}$  M o  $10^{-11}$  M o incluso menor cuando se determina mediante análisis de Scatchard de células que expresan CD38 usando un anticuerpo monoclonal marcado radiactivamente o determinando la concentración de unión semimáxima usando análisis FACS, o mediante análisis usando resonancia de plasmón superficial, según se mide en un instrumento BIAcore.

15 Un anticuerpo anti-CD38 de la presente invención puede comprender una secuencia de cadena ligera humana compuesta de (1) una región variable de cadena ligera que tiene una secuencia de polipéptido que es sustancialmente idéntica a una secuencia de polipéptido codificada por un segmento génico de  $V_L$  y un segmento  $J_L$  humano, y (2) una región constante de cadena ligera codificada por un segmento génico de  $C_L$  humano; y una secuencia de cadena pesada humana compuesta de (1) una región variable de cadena pesada que tiene una secuencia de polipéptido que es sustancialmente idéntica a una secuencia de polipéptido codificada por un segmento génico  $V_H$  humano, una región D, y un segmento  $J_H$  humano, y (2) una región constante codificada por un segmento génico de  $C_H$  humano. Cabe destacar que los genes D humanos pueden alterarse sustancialmente mediante sucesos de recombinación y mutación somática, de tal forma que la secuencia de línea germinal humana original puede no reconocerse fácilmente.

30 El desarrollo de anticuerpos monoclonales humanos de alta afinidad contra CD38 puede facilitarse mediante un método para expandir el repertorio de segmentos génicos de región variable humana en un animal no humano transgénico que tiene un genoma que comprende un transgén de inmunoglobulina humana integrado, comprendiendo dicho método introducir en el genoma un transgén de gen V que comprende segmentos génicos de región V que no están presentes en dicho transgén de inmunoglobulina humana integrado. A menudo, el transgén de región V es un cromosoma artificial de levadura (YAC) que comprende una parte de una matriz de segmento génico humano  $V_H$  o  $V_L$  ( $V_K$ ), que puede producirse naturalmente en un genoma humano o que puede cortarse y empalmarse conjuntamente por separado mediante métodos de recombinación, que pueden incluir segmentos génicos V no funcionales u omitidos. A menudo, al menos cinco o más segmentos génicos V funcionales están contenidos en el YAC. En esta variación, es posible producir un animal transgénico producido mediante el método de expansión del repertorio de V, en donde el animal expresa una cadena de inmunoglobulina que comprende una secuencia de región variable codificada por un segmento génico de región V presente en el transgén de región V y una región C codificada en el transgén de Ig humana. Mediante el método de expansión de repertorio de V, pueden generarse animales transgénicos que tienen al menos 5 genes V distintos; así como animales que contienen al menos 24 genes V o más. Algunos segmentos génicos V pueden ser no funcionales (por ejemplo, pseudogenes y similares); estos segmentos pueden retenerse o pueden eliminarse de manera selectiva mediante métodos recombinantes disponibles para el experto en la materia, si se desea.

45 Una vez que se ha modificado la línea germinal de ratón para que contenga un YAC funcional que tiene un repertorio expandido de segmento V, sustancialmente no presente en el transgén de Ig humana que contiene los segmentos génicos J y C, puede propagarse el rasgo y cruzarse en otros fondos genéticos, incluyendo fondos donde el YAC funcional que tiene un repertorio de segmento V expandido se cruza en una línea germinal de animal no humano que tiene un transgén de Ig humana diferente. Pueden cruzarse múltiples YAC funcionales que tienen un repertorio de segmento V expandido en una línea germinal para trabajar con un transgén de Ig humana (o múltiples transgenes de Ig humana). Aunque en el presente documento se citan como transgenes de YAC, dichos transgenes, cuando se integran en el genoma, pueden carecer sustancialmente de secuencias de levadura, tales como secuencias necesarias para la replicación autónoma en levaduras; dichas secuencias pueden eliminarse opcionalmente mediante ingeniería genética (por ejemplo, digestión de restricción y electroforesis en gel de campo pulsado u otro método adecuado) después de que su replicación en levaduras ya no sea necesaria (es decir, antes de su introducción en una célula ES de ratón o en un prozigoto de ratón). Los métodos para propagar el rasgo de expresión de secuencia de inmunoglobulina humana incluyen el cruzamiento de un animal transgénico que tiene los transgenes de Ig humana, y que opcionalmente también tienen un YAC funcional que tiene un repertorio de segmento V expandido. Ambos segmentos génicos  $V_H$  y  $V_L$  pueden estar presentes en el YAC. El animal transgénico puede cruzarse con un fondo deseado por el experto, incluyendo fondos que portan otros transgenes humanos, incluyendo transgenes de Ig humana y/o transgenes que codifican otras proteínas de linfocitos humanos. La presente divulgación también describe una secuencia humana de alta afinidad producida por un ratón transgénico que tiene un transgén de YAC de repertorio de región V expandida. Aunque lo anterior describe una realización específica del animal transgénico, se contemplan otras realizaciones que se han clasificado en tres categorías:

65 I. Animales transgénicos que contienen un transgén de cadena pesada no reorganizada y de cadena ligera

reorganizada de inmunoglobulina;

II. Animales transgénicos que contienen un transgén de cadena pesada no reorganizada y de cadena ligera no reorganizada de inmunoglobulina; y

5 III. Animales transgénicos que contienen un transgén de cadena pesada reorganizada y de cadena ligera no reorganizada de inmunoglobulina.

En una realización, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo de CD38 de la presente invención. Las composiciones farmacéuticas pueden formularse con vehículos o diluyentes farmacéuticamente aceptables así como cualquier otro adyuvante y excipiente conocido de acuerdo con técnicas convencionales, tales como aquellas divulgadas en Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19ª Edición, Gennaro, Ed., Mack Publishing Co., Easton, PA, 1995.

Los vehículos o diluyentes farmacéuticamente aceptables así como cualquier otro adyuvante y excipiente conocido debe ser adecuado para el compuesto de la presente invención seleccionado y el modo de administración seleccionado. La adecuación para los vehículos u otros componentes de las composiciones farmacéuticas se determina basándose en la ausencia de un impacto negativo significativo en las propiedades biológicas deseadas del compuesto o composición farmacéutica de la presente invención seleccionada (por ejemplo, menos que un impacto sustancial (una inhibición relativa del 10% o menor, una inhibición relativa del 5% o menor, etc.) en la unión al antígeno.

Una composición farmacéutica de la presente invención también puede incluir diluyentes, cargas, sales, tampones, detergentes (por ejemplo, un detergente no iónico, tal como Tween-80), estabilizantes, estabilizantes (por ejemplo, azúcares o aminoácidos sin azúcares), conservantes, fijativos de tejidos, solubilizantes, y/u otros materiales adecuados para su inclusión en una composición farmacéutica.

Los niveles de dosificación reales de los principios activos en las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden variarse para obtener una cantidad del principio activo que es eficaz para lograr la respuesta terapéutica deseada para un paciente particular, composición, y modo de administración, sin ser tóxico para el paciente. El nivel de dosificación seleccionado dependerá de una variedad de factores farmacocinéticos incluyendo la actividad de las composiciones particulares de la presente invención empleadas, o el éster, sal o amida de las mismas, la ruta de administración, el tiempo de administración, la velocidad de excreción del compuesto particular que se esté empleando, de la duración del tratamiento, otros fármacos, compuestos y/o materiales usados en combinación con las composiciones particulares empleadas, la edad, sexo, el peso, afección, salud general e historial médico previo del paciente que se esté tratando, y factores similares bien conocidos en la práctica médica.

La composición farmacéutica puede administrarse mediante cualquier ruta y modo adecuado. Las rutas adecuadas para administrar un compuesto de la presente invención *in vivo* e *in vitro* se conocen bien en la técnica y pueden seleccionarse por los expertos habituales en la materia.

Los compuestos de la presente invención pueden administrarse por cualquier ruta adecuada, tal como una ruta oral, nasal, inhalable, tópica (incluyendo bucal, transdérmica y sublingual), rectal, vaginal y/o parenteral.

En una realización, una composición farmacéutica de la presente invención se administra por vía oral, por ejemplo, con un diluyente inerte o un transportador comestible asimilable. El principio activo puede atraparse en cápsulas de gelatina dura o blanda, comprimirse formando comprimidos, o incorporarse directamente en la dieta del sujeto. Las composiciones farmacéuticas de la presente invención que son adecuadas para administración oral incluyen comprimidos ingeribles, comprimidos bucales, trociscos, cápsulas, elixires, suspensiones, jarabes, obleas, y similares que contienen dichos vehículos conocidos en la técnica como adecuados. Para administrar un compuesto de la presente invención por administración oral, puede ser necesario recubrir el compuesto con, o coadministrar el compuesto con, un material para prevenir su inactivación.

En una realización, una composición farmacéutica de la presente invención se administra por vía nasal. Las composiciones farmacéuticas de la presente invención que son adecuadas para administración nasal se conocen en la técnica y típicamente incluyen pulverizadores, gotas nasales e inhalantes.

En una realización, una composición farmacéutica de la presente invención se administra por vía tópica. Las composiciones farmacéuticas de la presente invención que son adecuadas para administración tópica o transdérmica incluyen polvos, pulverizadores, pomadas, pastas, cremas, lociones, geles, soluciones, parches e inhalantes que contienen dichos vehículos conocidos en la técnica como adecuados.

En una realización, una composición farmacéutica de la presente invención se administra por vía rectal. Las composiciones farmacéuticas de la presente invención que son adecuadas para administración rectal se conocen en la técnica e incluyen geles, pastas, formulaciones en pulverizador, supositorios.

En una realización, una composición farmacéutica de la presente invención se administra por vía vaginal. Las composiciones farmacéuticas de la presente invención que son adecuadas para administración vaginal incluyen pesarios, tampones, cremas, geles, pastas, espumas o formulaciones en espray que contienen dichos vehículos que

se conocen en la técnica como adecuadas.

En una realización, una composición farmacéutica de la presente invención se administra por vía parenteral.

5 Las expresiones "administración parenteral" y "administrado por vía parenteral", tal como se usan en el presente documento, significan modos de administración distintos de administración entérica y tópica, normalmente mediante inyección, e incluyen inyección e infusión epidérmica, intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardiaca, intradérmica, intraperitoneal, intratendinosa, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoidea, intraespinal, intracraneal, intratorácica, epidural e  
10 intraesternal.

En una realización, dicha composición farmacéutica se administra por inyección o infusión intravenosa o subcutánea.

15 En una realización, los compuestos de la presente invención se administran en forma cristalina mediante inyección subcutánea, véase, por ejemplo, Yang et al., PNAS USA 100(12), 6934-6939 (2003).

Las composiciones farmacéuticas pueden administrarse con dispositivos médicos conocidos en la técnica. Por ejemplo, en una realización, puede administrarse una composición farmacéutica de la presente invención con un dispositivo de inyección hipodérmica sin aguja, tal como los dispositivos divulgados en los documentos US 5.399.163, US 5.383.851, US 5.312.335, US 5.064.413, US 4.941.880, US 4.790.824, o US 4.596.556. Los ejemplos bien conocidos de implantes y módulos útiles en la presente invención incluyen: US 4.487.603, que divulga una bomba de micro-infusión implantable para dispensar medicación a una velocidad controlada; US 4.486.194, que divulga un dispositivo terapéutico para administrar medicamentos a través de la piel; US 4.447.233, que divulga una bomba de infusión de medicación para administrar medicación a una velocidad de infusión precisa; US 4.447.224 que divulga un aparato de infusión implantable de flujo variable para el suministro continuo de fármacos; US 25 4.439.196, que divulga un sistema de suministro de fármacos osmótico que tiene compartimentos multicámara; y US 4.475.196, que divulga un sistema de suministro de fármaco osmótico. Los expertos en la materia conocen muchos otros implantes, sistemas de suministro y módulos similares.

30 Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden formularse para rutas de administración particulares, tales como oral, nasal, tópica (incluyendo bucal, transdérmica y sublingual), rectal, vaginal y/o parenteral. Las composiciones farmacéuticas pueden presentarse convenientemente en forma de dosis unitaria y pueden prepararse mediante cualquier método conocido en la técnica de farmacia. La cantidad de ingrediente activo que puede combinarse con un material transportador para producir una forma de dosis unitaria variará dependiendo del sujeto a tratar, y del modo de administración concreto. La cantidad de ingrediente activo que puede combinarse con un material transportador para producir una forma de dosis unitaria será generalmente aquella cantidad de la composición que produce un efecto terapéutico. En general, de un cien por ciento, esta cantidad variará de aproximadamente un 0,01% a aproximadamente un 99% de principio activo, tal como de aproximadamente un 0,1 % a aproximadamente un 70%, por ejemplo, de aproximadamente un 1% a aproximadamente un 30%.

40 Independientemente de la vía de administración seleccionada, los compuestos de la presente invención, que puede usarse en forma de una sal farmacéuticamente aceptable o en una forma hidratada adecuada, y/o las composiciones farmacéuticas de la presente invención, se formulan en formas de dosificación farmacéuticamente aceptables mediante métodos convencionales conocidos para los expertos en la materia. Una "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a una sal que mantiene la actividad biológica deseada del compuesto parental y no confiere cualquier efecto toxicológico no deseado (véase, por ejemplo, Berge, S.M. et al., J. Pharm. Sci. 66, 1-19 (1977)). Los ejemplos de dichas sales incluyen sales de adición de ácido y sales de adición de base. Las sales de adición de ácido incluyen aquellas derivadas de ácidos inorgánicos no tóxicos, tales como ácido clorhídrico, nítrico, fosfórico, sulfúrico, bromhídrico, yodhídrico, fosfórico y similares, así como de ácidos orgánicos no tóxicos, tales como ácidos mono y dicarboxílicos alifáticos, ácidos alcanóicos sustituidos con fenilo, ácidos hidroxí alcanóicos, ácidos aromáticos, ácidos sulfónicos alifáticos y aromáticos y similares. Las sales de adición de base incluyen aquellas derivadas de metales alcalinotérreos, tales como sodio, potasio, magnesio, calcio y similares, así como de aminas orgánicas no tóxicas, tales como N,N'-dibencil-etilendiamina, N-metilglucamina, cloroprocaína, colina, dietanolamina, etilen-diamina, procaína y similares.

55 Los vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen cualquiera y todos los disolventes adecuados, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes de isotonicidad, antioxidantes y agentes retardantes de la absorción, y similares que son fisiológicamente compatibles con un compuesto de la presente invención.

60 Los ejemplos de vehículos acuosos y no acuosos adecuados que pueden emplearse en las composiciones farmacéuticas de la presente invención incluyen agua, suero salino, solución salina tamponada con fosfato, etanol, dextrosa, polioles (tales como glicerol, propilenglicol, polietilenglicol, y similares), y mezclas adecuadas de los mismos, aceites vegetales, tales como aceite de oliva, aceite de maíz, aceite de cacahuete, aceite de semilla de algodón, y aceite de sésamo, soluciones coloidales de carboximetil celulosa, goma de tragacanto y ésteres orgánicos inyectables, tales como oleato de etilo, y/o diversos tampones. En las técnicas farmacéuticas se conocen

otros vehículos.

Los vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. El uso de dichos medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas es conocido en la técnica. Excepto en el caso de que cualquier agente o medio convencional sea incompatible con el compuesto activo, se contempla el uso de los mismos en las composiciones farmacéuticas de la presente invención.

Puede mantenerse la fluidez adecuada, por ejemplo, usando materiales de recubrimiento, tal como lecitina, manteniendo el tamaño de partícula adecuado en el caso de las dispersiones, y usando tensioactivos.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención también pueden comprender antioxidantes farmacéuticamente aceptables, por ejemplo, (1) antioxidantes hidrosolubles, tales como ácido ascórbico, cloruro de cisteína, bisulfato sódico, metabisulfito de sodio, sulfito de sodio y similares; (2) antioxidantes solubles en aceite, tales como palmitato de ascorbilo, hidroxianisol butilado (BHA), hidroxitolueno butilado (BHT, de *butylated hydroxytoluene*), lecitina, galato de propilo, alfa tocoferol y similares; y (3) agentes quelantes de metales, tales como ácido cítrico, ácido etilendiamina tetraacético (EDTA), sorbitol, ácido tartárico, ácido fosfórico, y similares.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención también pueden comprender agentes isotónicos, tales como azúcares, polialcoholes, tales como manitol, sorbitol, glicerol o cloruro de sodio en las composiciones.

Los diluyentes farmacéuticamente aceptables incluyen suero salino y soluciones acuosas de tampón.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención también pueden contener uno o más adyuvantes adecuados para la ruta de administración seleccionada, tales como conservantes, agentes humectantes, agentes emulsionantes, agentes de dispersión, conservantes y tampones, que pueden potenciar la vida útil o la eficacia de la composición farmacéutica. Los compuestos de la presente invención pueden mezclarse, por ejemplo, con lactosa, sacarosa, polvos (por ejemplo, polvo de almidón), ésteres de celulosa de ácidos alcanoicos, ácido esteárico, talco, estearato de magnesio, óxido de magnesio, sales de sodio y calcio de ácido fosfórico y sulfúrico, goma arábiga, gelatina, alginato sódico, polivinilpirrolidona, y/o alcohol polivinílico. Otros ejemplos de adyuvantes son QS21, GM-CSF, SRL-172, diclorhidrato de histamina, timocartina, Tio-TEPA, composiciones de lípido A de monofosforilo/micobacterias, alumbre, adyuvante incompleto de Freund, monanida ISA, sistema adyuvante ribi, adyuvante TiterMax, formulaciones adyuvantes syntex, complejos inmunoestimulantes (ISCOM), adyuvante gerbu, oligodesoxinucleótidos de CpG, lipopolisacárido, y ácido poliinosínico:policitidílico.

La prevención de la presencia de microorganismos puede asegurarse mediante procedimientos de esterilización y mediante la inclusión de diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabeno, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, y similares. Además, la absorción prolongada de la forma farmacéutica inyectable puede lograrse mediante la inclusión de agentes que retrasan la absorción, tales como monoestearato de aluminio y gelatina.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención que comprenden un compuesto de la presente invención también pueden incluir una sal adecuada del mismo. Cualquier sal adecuada, tal como una sal de metal alcalinotérreo en cualquier forma adecuada (por ejemplo, una sal de tampón), puede usarse en la estabilización del compuesto de la presente invención. Las sales adecuadas incluyen típicamente cloruro de sodio, succinato de sodio, sulfato de sodio, cloruro de potasio, cloruro de magnesio, sulfato de magnesio, y cloruro de calcio. En una realización, se usa una sal de aluminio para estabilizar un compuesto de la presente invención en una composición farmacéutica de la presente invención, sirviendo también dicha sal de aluminio como adyuvante cuando se administra dicha composición a un paciente.

Las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la presente invención pueden encontrarse en una diversidad de formas adecuadas. Dichas formas incluyen, por ejemplo, formas de dosificación líquidas, semisólidas y sólidas, tales como soluciones líquidas (por ejemplo, soluciones inyectables e infundibles), dispersiones o suspensiones, emulsiones, microemulsiones, geles, cremas, gránulos, polvos, comprimidos, píldoras, polvos, liposomas, dendrímeros y otras nanopartículas (véase, por ejemplo, Baek et al., *Methods Enzymol.* 362, 240-9 (2003), Nigavekar et al., *Pharm Res.* 21(3), 476-83 (2004), micropartículas, y supositorios.

La forma óptima depende del modo de administración seleccionado, de la naturaleza de la composición, y de la aplicación terapéutica. Las formulaciones pueden incluir, por ejemplo, polvos, pastas, pomadas, gelatinas, ceras, aceites, lípidos, vesículas que contienen lípidos (catiónicos o aniónicos), conjugados de ADN, pastas de absorción anhidras, emulsiones de aceite en agua y de agua en aceite, emulsiones de carbowax (polietilenglicoles de diversos pesos moleculares), geles semisólidos, y mezclas semisólidas que contienen carbowax. Puede ser cualquiera de los anteriores en tratamientos y terapias de acuerdo con la presente invención, siempre que el principio activo en la composición farmacéutica no se inactive mediante la formulación y que la formulación sea fisiológicamente compatible y tolerable con la ruta de administración. Véase también, por ejemplo, Powell et al., "Compendium of excipients for parenteral formulations" *PDA J Pharm Sci Technol.* 52, 238-311 (1998) y las citas en el mismo para información adicional relacionada con excipientes y vehículos bien conocidos para los químicos farmacéuticos.

Los compuestos de la presente invención pueden prepararse con vehículos que protegerán al compuesto frente a la rápida liberación, tal como una formulación de liberación controlada, incluyendo implantes, parches transdérmicos y sistemas de suministro microencapsulados. Dichos vehículos pueden incluir gelatina, monoestearato de glicerilo, diestearato de glicerilo, polímeros biodegradables biocompatibles, tales como acetato de etilvinilo, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres, y ácido poliláctico solo o con una cera, u otros materiales bien conocidos en la técnica. Los métodos para la preparación de dichas formulaciones son generalmente conocidos para los expertos en la materia. Véase, por ejemplo, Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1978.

Para administrar composiciones de la presente invención por determinadas rutas de administración, puede ser necesario recubrir el compuesto con, o coadministrar el compuesto con, un material para prevenir su inactivación. Por ejemplo, el compuesto de la presente invención puede administrarse a un sujeto en un vehículo adecuado, por ejemplo, liposomas, o un diluyente. Los liposomas incluyen emulsiones de CGF de agua-en aceite-en agua así como liposomas convencionales (Strejan et al., J. Neuroimmunol. 7, 27 (1984)).

Dependiendo de la ruta de administración, el compuesto activo puede recubrirse en un material para proteger el compuesto frente a la acción de ácidos y otras condiciones naturales que pueden inactivar el compuesto. Por ejemplo, el compuesto puede administrarse a un sujeto en un vehículo adecuado, por ejemplo, liposomas. Los liposomas incluyen emulsiones de CGF de agua-en aceite-en agua así como liposomas convencionales (Strejan et al., J. Neuroimmunol. 7, 27 (1984)).

En una realización, los compuestos de la presente invención pueden formularse para asegurar una buena distribución *in vivo*. Por ejemplo, la barrera hematoencefálica (BHE) excluye a muchos compuestos altamente hidrófilos. Para asegurar que los compuestos terapéuticos de la presente invención atraviesen la BHE (en caso de que se desee), pueden formularse, por ejemplo, en liposomas. Para los métodos de fabricación de liposomas, véanse, por ejemplo, los documentos US 4.522.811, US 5.374.548 y US 5.399.331. Los liposomas pueden comprender uno o más residuos que se transportan de manera selectiva en células u órganos específicos, potenciando de este modo el suministro del fármaco (véase, por ejemplo, V.V. Ranade J. Clin. Pharmacol. 29, 685 (1989)). Los residuos de direccionamiento ejemplares incluyen folato o biotina (véase, por ejemplo, el documento US 5.416.016), manósidos (Umezawa et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 153, 1038 (1988)), anticuerpos (P.G. Bloeman et al., FEBS Lett. 357, 140 (1995), M. Owais et al., Antimicrob. Agents Chemother. 39, 180 (1995)), receptor tensioactivo de proteína A (Briscoe et al., Am. J. Physiol. 1233, 134 (1995)), diferentes especies que comprenden las composiciones farmacéuticas de la presente invención, así como componentes de las moléculas inventadas, p120 (Schreier et al., J. Biol. Chem. 269, 9090 (1994)), véase también K. Keinanen, M.L. Laukkanen, FEBS Lett. 346, 123 (1994) y J.J. Killion, I.J. Fidler, Immunomethods 4, 273 (1994).

Los anticuerpos anti-CD38 de la presente invención pueden formularse en liposomas. Los liposomas pueden incluir un residuo de direccionamiento. Los anticuerpos en los liposomas se pueden suministrar mediante inyección en bolo en un sitio próximo al área deseada, por ejemplo, el sitio de inflamación o infección, o el sitio de un tumor. Las composiciones deben ser fluidas hasta tal punto que sean fácilmente inyectables con una jeringuilla. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y tiene que conservarse contra la acción contaminante de microorganismos como bacterias y hongos.

En una realización, los anticuerpos de la presente invención pueden formularse para prevenir o reducir su transporte a través de la placenta. Esto puede efectuarse mediante métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, mediante PEGilación de los compuestos o mediante el uso de fragmentos F(ab')<sub>2</sub>. Puede hacerse referencia adicional a Cunningham-Rundles C et al., J Immunol Methods. 152, 177-190 (1992) y a Landor M., Ann Allergy Asthma Immunol 74, 279-283 (1995).

Los vehículos farmacéuticamente aceptables para administración parenteral incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. El uso de dichos medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas es conocido en la técnica. Excepto en el caso de que cualquier agente o medio convencional sea incompatible con el compuesto activo, se contempla el uso de los mismos en las composiciones farmacéuticas de la presente invención. Pueden incorporarse también compuestos activos suplementarios en las composiciones.

Las composiciones farmacéuticas para inyección deben ser típicament estériles y estables en las condiciones de fabricación y almacenamiento. La composición puede formularse en forma de una solución, microemulsión, liposoma, u otra estructura ordenada adecuada para altas concentraciones de fármaco. El vehículo puede ser un disolvente o medio de dispersión acuoso o no acuoso que contiene, por ejemplo, agua, etanol, polioles (tales como glicerol, propilenglicol, polietilenglicol, y similares), y mezclas adecuadas de los mismos, aceites vegetales, tales como aceite de oliva, y ésteres orgánicos inyectables, tales como oleato de etilo. Se puede mantener la fluidez apropiada, por ejemplo, usando un recubrimiento tal como lecitina, manteniendo el tamaño de partícula necesario en el caso de la dispersión y mediante el uso de tensioactivos. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes, tales como glicerol, manitol, sorbitol, o cloruro sódico en la composición. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede provocarse incluyendo en la

composición un agente que retrase la absorción, por ejemplo, sales de monoestearato y gelatina. Pueden prepararse soluciones inyectables estériles incorporando el compuesto activo en la cantidad necesaria en un disolvente adecuado con uno o una combinación de ingredientes, por ejemplo, tal como se enumeran anteriormente, según se requiera, seguido de esterilización por microfiltración. En general, las dispersiones se preparan incorporando el compuesto activo en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los otros ingredientes necesarios, por ejemplo, entre aquellos enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los ejemplos de preparación son secado al vacío y criodesecado (liofilización) que proporcionan un polvo del principio activo más cualquier ingrediente adicional deseado a partir de una solución previamente esterilizada por filtración de los mismos.

Pueden prepararse soluciones inyectables estériles incorporando el compuesto activo en la cantidad necesaria en un disolvente adecuado con uno o una combinación de ingredientes, tal como se enumeran anteriormente, según se requiera, seguido de esterilización por microfiltración. En general, las dispersiones se preparan incorporando el compuesto activo en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los otros ingredientes necesarios, entre aquellos enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los ejemplos de preparación son secado al vacío y criodesecado (liofilización) que proporcionan un polvo del principio activo más cualquier ingrediente adicional deseado a partir de una solución previamente esterilizada por filtración de los mismos.

La composición farmacéutica de la presente invención puede contener un compuesto de la presente invención o una combinación de compuestos de la presente invención. Por lo tanto, en una realización, una composición farmacéutica de la presente invención incluye una combinación de múltiples (por ejemplo, dos o más) compuestos de la presente invención que actúan mediante mecanismos diferentes, por ejemplo, un compuesto que actúa predominantemente mediante la inducción de CDC en combinación con otro compuesto que actúa predominantemente mediante la inducción de apoptosis.

Los anticuerpos anti-CD38 (y los inmunoconjugados, moléculas biespecíficas/multiespecíficas, composiciones y otros derivados descritos en el presente documento) de la presente invención tienen numerosas utilidades diagnósticas y terapéuticas *in vitro* e *in vivo* que implican el diagnóstico y tratamiento de trastornos que implican a células que expresan CD38. Por ejemplo, los anticuerpos pueden administrarse a células en cultivo, por ejemplo, *in vitro* o *ex vivo*, o a sujetos humanos, por ejemplo, *in vivo*, para tratar, prevenir y diagnosticar una diversidad de trastornos. Tal como se usa en el presente documento, el término "sujeto" pretende incluir animales humanos y no humanos que responden al anticuerpo de CD38. Los sujetos pueden incluir, por ejemplo, pacientes humanos que tienen trastornos que pueden corregirse o aliviarse mediante la inhibición de la función de CD38, tal como la actividad enzimática, la transducción de señales, la inducción de expresión de citocinas, la inducción de la proliferación o diferenciación, y/o la inducción de lisis y/o eliminando/reduciendo el número de células que expresan CD38.

Por ejemplo, pueden usarse los anticuerpos de CD38 para desencadenar *in vivo* o *in vitro* una o más de las siguientes actividades biológicas: inhibición de la función de CD38 (tal como la actividad enzimática, la transducción de señales, la inducción de expresión de citocinas, la inducción de la proliferación o diferenciación, y/o la inducción de la lisis), eliminación de una célula que expresa CD38, mediación de la fagocitosis o ADCC de una célula que expresa CD38 en presencia de células efectoras humanas, y mediando la CDC de una célula que expresa CD38 en presencia de complemento, o eliminando células que expresan CD38 mediante apoptosis.

Cualquier composición que comprende anticuerpos de CD38 de la presente invención que tienen sitios de unión a complemento, tales como porciones de IgG1, -2, o -3 o IgM que se unen a complemento, también pueden usarse en presencia de complemento. Puede complementarse el tratamiento *ex vivo* de una población de células que comprende células diana con un anticuerpo CD38BP de la presente invención y células efectoras mediante la adición de complemento o suero que contiene complemento. La fagocitosis o la lisis de células diana recubiertas con un anticuerpo de CD38 de la presente invención pueden mejorarse mediante unión a proteínas de complemento. Las células diana recubiertas con los anticuerpos de CD38 de la presente invención también pueden lisarse mediante complemento. En una realización, los anticuerpos de CD38 de la presente invención no activan al complemento.

Los anticuerpos de CD38 de la presente invención también pueden administrarse junto con complemento. Por consiguiente, dentro del alcance de la presente invención se encuentran composiciones que comprenden anticuerpos de CD38 con suero o complemento. En estas composiciones, el complemento se ubica en estrecha proximidad a los anticuerpos de CD38, por ejemplo, mediante conjugación o pueden ser adecuados para administración simultánea. Como alternativa, los anticuerpos de CD38 y el complemento o suero pueden administrarse por separado.

Los anticuerpos de CD38 de la presente invención también pueden usarse para dirigirse a células diana que expresan FcγR o CD38, por ejemplo, para marcar dichas células. Para dicho uso, los anticuerpos de CD38 pueden unirse a una molécula que puede detectarse. Por lo tanto, la presente invención proporciona métodos para localizar *ex vivo* o *in vitro* células que expresan receptores Fc, tales como FcγR, o CD38. El marcador detectable puede ser, por ejemplo, un radioisótopo, un compuesto fluorescente, una enzima, o un cofactor enzimático.

Las células efectoras específicas de diana, por ejemplo, células efectoras unidas a un anticuerpo de CD38 de la presente invención pueden usarse también como agentes terapéuticos. Las células efectoras para direccionamiento pueden ser leucocitos humanos, tales como macrófagos, neutrófilos o monocitos. Otras células incluyen eosinófilos, linfocitos citolíticos naturales y otras células portadoras de receptor de IgG o IgA. Si se desea, las células efectoras pueden obtenerse del sujeto que se va a tratar. Las células efectoras específicas de diana, pueden administrarse como una suspensión de células en una solución fisiológicamente aceptable. El número de células administradas puede encontrarse en el orden de  $10^8$  a  $10^9$  pero variará dependiendo del fin terapéutico. En general, la cantidad será suficiente para obtener la localización en la célula diana, por ejemplo, una célula tumoral que expresa CD38, y para eliminar de manera eficaz a la célula mediante, por ejemplo, fagocitosis o lisis.

La terapia con células efectoras específicas de diana puede llevarse a cabo conjuntamente con otras técnicas para la eliminación de células diana. Por ejemplo, puede usarse terapia antitumoral usando los anticuerpos de CD38 de la presente invención y/o células efectoras armadas con estas composiciones conjuntamente con quimioterapia. Además, puede usarse inmunoterapia combinada para dirigir dos poblaciones efectoras citotóxicas distintas hacia el rechazo de la célula tumoral. Por ejemplo, pueden usarse anticuerpos de CD38 unidos a anti-FcγRI o a anti-CD3 en conjunción con agentes de unión específicos para receptor de IgG o IgA. Las moléculas biespecíficas y multiespecíficas de la presente invención también pueden usarse para modular los niveles de FcαR o FcγR en células efectoras, tal como mediante tapado y eliminación de receptores en la superficie de la célula. También pueden usarse mezclas de anti-receptores Fc para este fin.

En una realización, la presente invención proporciona métodos para detectar la presencia de antígeno CD38 en una muestra, o medir la cantidad de antígeno CD38, que comprenden poner en contacto la muestra, y una muestra de control, con un anticuerpo de CD38 de la invención que se une específicamente a CD38, en condiciones que permiten la formación de un complejo entre el anticuerpo de CD38 o una porción del mismo y CD38. Entonces se detecta la formación de un complejo, en donde una diferencia en la formación de complejo entre la muestra comparada con la muestra de control es indicativa de la presencia de antígeno CD38 en la muestra. Los ejemplos de métodos para inmunoensayos de detección incluyen, sin limitación, un ELISA, un RIA, ensayos FACS, ensayos de resonancia de plasmón, ensayos cromatográficos, inmunohistoquímica tisular, *Western blot*, y/o inmunoprecipitación.

En una realización, los anticuerpos de CD38 de la presente invención pueden usarse para detectar niveles de CD38 en circulación o niveles de células que contienen CD38 en su superficie de membrana, pudiendo relacionarse dichos niveles con determinados síntomas de enfermedades. Como alternativa, los anticuerpos de CD38 pueden usarse para eliminar o interactuar con la función de células que expresan CD38, implicando de este modo a estas células como mediadores importantes de la enfermedad. Esto puede lograrse poniendo en contacto una muestra y una muestra de control con el anticuerpo anti-CD38 en condiciones que permiten la formación de un complejo entre el anticuerpo y CD38. Cualquier complejo formado entre el anticuerpo y CD38 se detecta y se compara en la muestra y en el control.

Los anticuerpos de CD38 de la presente invención pueden probarse inicialmente respecto de la actividad de unión asociada con un uso terapéutico o diagnóstico *in vitro*. Por ejemplo, pueden ensayarse los anticuerpos de CD38 usando ensayos de citometría de flujo. Además, puede ensayarse la actividad de los anticuerpos de CD38 para desencadenar al menos una actividad de célula efectora mediada por efector. Por ejemplo, puede ensayarse la capacidad de los anticuerpos anti-CD38 de la presente invención para desencadenar CDC y/o apoptosis. Los protocolos para ensayar respecto de CDC, adhesión homotípica, agrupamiento molecular o apoptosis se conocen bien en la técnica.

En una realización, la presente invención proporciona un método para detectar la presencia o cuantificar la cantidad de células que expresan CD38 *in vivo* o *in vitro*. El método comprende (i) administrar a un sujeto un anticuerpo de la presente invención conjugado a un marcador detectable; (ii) exponer al sujeto a un medio para detectar dicho marcador detectable para identificar áreas que contienen células que expresan CD38.

En una realización, los inmunoconjugados de la presente invención pueden usarse para dirigir compuestos (por ejemplo, agentes terapéuticos, marcadores, citotoxinas, inmunosupresores, etc.) a células que tienen CD38 unido a su superficie usando dichos compuestos diana como los restos terapéuticos en los inmunoconjugados de la presente invención.

Los anticuerpos anti-CD38 de la presente invención se pueden usar en métodos para localizar *ex vivo* o *in vitro* células que expresan CD38 (por ejemplo, con un marcador detectable, tal como un radioisótopo, un compuesto fluorescente, una enzima, o un cofactor enzimático).

Los anticuerpos anti-CD38 de la presente invención se pueden usar en métodos para eliminar células que tienen CD38 unido a su superficie mediante la administración de inmunotoxinas de la presente invención.

Los anticuerpos anti-CD38 de la presente invención proporcionan métodos para tratar o prevenir un trastorno que implica a células que expresan CD38 en un sujeto, comprendiendo dicho método la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo de CD38 de la presente invención a un sujeto que lo necesite. Dichos

anticuerpos de CD38 se usan para inhibir las actividades inducidas por CD38 asociadas con determinados trastornos o para eliminar o reducir el número de células que expresan CD38.

Dicho método implica la administración a un sujeto de una composición de anticuerpo de CD38 de la presente invención en una cantidad eficaz para tratar o prevenir el trastorno. La composición de anticuerpo de CD38 puede administrarse sola o junto con otro agente terapéutico, tal como se describe en otras partes del presente documento que actúa conjuntamente con o de manera sinérgica con la composición de anticuerpo de CD38 para tratar o prevenir las enfermedades que implican células que expresan CD38. Como alternativa, pueden usarse inmunocombinados para eliminar células que tienen CD38 expresado en su superficie dirigiendo citotoxinas o radiotoxinas a CD38.

El trastorno que implica células que expresan CD38 que puede tratarse con anticuerpos de la invención puede ser un trastorno tumorigénico, tal como un trastorno caracterizado por la presencia de células tumorales que expresan CD38, incluyendo, por ejemplo, linfoma de linfocitos B, neoplasias de células plasmáticas, linfoma de células T/NK y neoplasias mieloides.

Los ejemplos de dichas enfermedades tumorigénicas incluyen linfoma/leucemias de células B, incluyendo leucemia/linfoma linfoblástico de células B y linfoma no Hodgkin de células B; leucemia promielocítica aguda, leucemia linfoblástica aguda y neoplasias de células B maduras, tales como leucemia linfocítica crónica de células B (CLL)/linfoma linfocítico pequeño (SLL), leucemia linfocítica aguda de células B, leucemia prolinfocítica de células B, linfoma linfoplasmácito, linfoma de células del manto (MCL), linfoma folicular (FL), incluyendo FL de bajo grado, de grado intermedio y de grado alto, linfoma cutáneo del centro folicular, linfoma de células B de la zona marginal (de tipo MALT, de tipo nodal y de tipo esplénico), tricoleucemia, linfoma difuso de células B grandes, linfoma de Burkitt, plasmacitoma, mieloma de células plasmáticas, leucemia de células plasmáticas, trastorno linfoproliferativo post-trasplante, macroglobulinemia de Waldenström, leucemias de células plasmáticas y linfoma anaplásico de células grandes (ALCL).

En una realización, el trastorno que implica células que expresan CD38 es mieloma múltiple.

Los ejemplos de linfomas no Hodgkin de células B son granulomatosis linfomatoide, linfoma de efusión primario, linfoma intravascular de células B grandes, linfoma mediastinal de células B grandes, enfermedades de la cadena pesada (incluyendo enfermedad de  $\gamma$ ,  $\mu$  y  $\alpha$ ), linfomas inducidos por terapia con agentes inmunosupresores, tales como linfoma inducido por ciclosporina, y linfoma inducido por metotrexato.

En una realización de la presente invención, el trastorno que implica a células que expresan CD38 puede ser linfoma de Hodgkin.

Los ejemplos de un trastorno que implican a células que expresan CD38 pueden ser una neoplasia maligna derivada de células T y NK incluyendo: neoplasias de células T y de células NK maduras, incluyendo leucemia prolinfocítica de células T, leucemia linfocítica granular de células T grandes, leucemia agresiva de células NK, leucemia/linfoma de células T adultas, linfoma extranodal de células NK/T, linfoma de células T de tipo enteropático de tipo nasal, linfoma hepatoesplénico de células T, linfoma subcutáneo de células T similar a la paniculitis, linfoma blástico de células NK, micosis fungoide/síndrome de Sezary, trastornos linfoproliferativos cutáneos primarios de células T positivas a CD30 (linfoma primario anaplásico de células grandes cutáneo C-ALCL, papulosis linfomatoide, lesiones borde), linfoma angioinmunoblástico de células T, linfoma inespecífico periférico de células T, y linfoma anaplásico macrocítico.

Los ejemplos de neoplasias malignas derivadas de células mieloides incluyen leucemia mieloides aguda, incluyendo leucemia promielocítica aguda, y enfermedades mieloproliferativas crónicas, incluyendo leucemia mieloides crónica.

En una realización de la presente invención, el trastorno que implica a células que expresan CD38 puede ser trastornos inmunitarios en los que las células B que expresan CD38, células plasmáticas, monocitos y células T están implicadas.

Los ejemplos de trastornos inmunitarios en los que las células B que expresan CD38, células plasmáticas, monocitos y células T están implicadas incluyen trastornos autoinmunitarios, tales como psoriasis, artritis psoriásica, dermatitis, esclerodermia y esclerosis sistémica, enfermedad inflamatoria del intestino (EII), enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, síndrome de dificultad respiratoria, meningitis, encefalitis, uveitis, glomerulonefritis, eccema, asma, aterosclerosis, deficiencia de adhesión de leucocitos, esclerosis múltiple, síndrome de Raynaud, síndrome de Sjögren, diabetes de aparición juvenil, enfermedad de Reiter, enfermedad de Bechet, nefritis compleja inmunitaria, nefropatía por IgA, polineuropatías de IgM, trombocitopenias mediadas por inmunidad, tales como púrpura trombocitopénica idiopática aguda y púrpura trombocitopénica idiopática crónica, anemia hemolítica, miastenia grave, nefritis lúpica, lupus eritematoso sistémico, artritis reumatoide (AR), dermatitis atópica, perfringoide, enfermedad de Graves, tiroiditis de Hashimoto, granulomatosis de Wegner, síndrome de Omenn, insuficiencia renal crónica, mononucleosis infecciosa aguda, esclerosis múltiple, VIH, y enfermedades asociadas con herpes virus. Los ejemplos adicionales son el síndrome del distrés respiratorio agudo grave y coleorretinitis. Además, se incluyen otras enfermedades y trastornos, tales como aquellos causados por o mediados por la infección de células B con virus,

tales como el virus de Epstein-Barr (EBV).

En una realización, el trastorno que implica a células que expresan CD38 es artritis reumatoide.

- 5 Los ejemplos adicionales de trastornos inflamatorios, inmunitarios y/o autoinmunitarios en los que destacan los autoanticuerpos y/o la actividad excesiva de los linfocitos B y T y que pueden tratarse de acuerdo con la presente invención incluyen los siguientes:

- 10 vasculitis y otros trastornos vasculares, tales como poliangeitis microscópica, síndrome de Churg-Strauss, y otras vasculitis asociadas con ANCA, poliarteritis nodosa, vasculitis crioglobulinémica esencial, angitis leucocitoclástica cutánea, enfermedad de Kawasaki, arteritis de Takayasu, arteritis de células gigantes, púrpura de Henoch-Schonlein, angitis cerebral primaria o aislada, eritema nodoso, tromboangitis obliterante, púrpura trombocitopénica trombótica (incluyendo síndrome hemolítico urémico), y vasculitis secundarias, incluyendo vasculitis leucocitoclástica cutánea (por ejemplo, secundaria a la hepatitis B, hepatitis C, macroglobulinemia de Waldenström, neoplasias de células B, artritis reumatoide, síndrome de Sjögren, o lupus eritematoso sistémico);
- 15 los ejemplos adicionales son eritema nodoso, vasculitis alérgica, paniculitis, enfermedad de Weber-Christian, púrpura hiperglobulinémica, y enfermedad de Buerger;
- trastornos cutáneos, tales como dermatitis de contacto, dermatosis lineal por IgA, vitíligo, pioderma gangrenoso, epidermólisis bullosa adquirida, pénfigo vulgar (incluyendo penfigoide cicatrizal y penfigoide bulloso), alopecia areata (incluyendo alopecia universal y alopecia total), dermatitis herpetiforme, eritema multiforme, y urticaria autoinmunitaria crónica (incluyendo edema angioneurótico y vasculitis urticante);
- 20 citopenias mediadas por inmunidad, tales como neutropenia autoinmunitaria, y aplasia pura de glóbulos rojos;
- trastornos del tejido conectivo, tales como lupus del SNC, lupus sistémico discoide, síndrome de CREST, enfermedad del tejido conectivo mixto, polimiositis/dermatomiositis, miositis por cuerpos de inclusión, amiloidosis secundaria, crioglobulinemia de tipo I y de tipo II, fibromialgia, síndrome de anticuerpos contra fosfolípidos, hemofilia secundaria, policondritis recidivante, sarcoidosis, síndrome del hombre rígido, y fiebre reumática; un ejemplo adicional es la fascitis eosinofílica;
- 25 artritis, tal como espondilitis anquilosante, artritis crónica juvenil, enfermedad de Still del adulto, y síndrome SAPHO; los ejemplos adicionales son sacroileitis, artritis reactiva, enfermedad de Still, y gota;
- 30 trastornos hematológicos, tales como anemia anaplásica, anemia hemolítica primaria (incluyendo síndrome de las aglutininas frías), anemia hemolítica secundaria a CLL o lupus eritematoso sistémico; síndrome de POEMS, anemia perniciosa, y púrpura hiperglobulinémica de Waldenström; los ejemplos adicionales son agranulocitosis, neutropenia autoinmune, enfermedad de Franklin, enfermedad de Seligmann, enfermedad de la cadena pesada gamma, síndrome paraneoplásico secundario a timoma y linfomas, un síndrome paraneoplásico secundario a
- 35 timoma y linfomas, y formación de inhibidor de factor VII;
- endocrinopatías, tales como poliendocrinopatía, y enfermedad de Addison; los ejemplos adicionales son hipoglucemia autoinmunitaria, hipotiroidismo autoinmunitario, síndrome insulínico autoinmunitario, tiroiditis de Quervain, y resistencia a la insulina mediada por anticuerpo para receptor de insulina;
- 40 trastornos hepato-gastrointestinales, tales como enfermedad celiaca, enfermedad de Whipple, cirrosis biliar primaria, hepatitis crónica activa, y colangitis esclerosante primaria; un ejemplo adicional es la gastritis autoinmunitaria;
- nefropatías, tales como glomerulonefritis rápida progresiva, nefritis post-estreptocócica, síndrome de Goodpasture, glomerulonefritis membranosa, y nefritis crioglobulinémica; un ejemplo adicional es la enfermedad de carga mínima;
- 45 trastornos neurológicos, tales como neuropatías autoinmunitarias, mononeuritis múltiple, síndrome miasténico de Lambert-Eaton, corea de Sydenham, tabes dorsal, y síndrome de Guillain-Barre; los ejemplos adicionales son paraparesis espástica mielopática/trópica, miastenia grave, polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica, y polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica; esclerosis múltiple;
- 50 trastornos cardíacos y pulmonares, tal como EPOC, alveolitis fibrosante, bronquiolitis obliterante, aspergilosis alérgica, fibrosis quística, síndrome de Löffler, miocarditis, y pericarditis; los ejemplos adicionales son neumonitis por hipersensibilidad, y síndrome paraneoplásico secundario al cáncer de pulmón;
- trastornos alérgicos, tales como asma bronquial y síndrome de hiper-IgE; un ejemplo adicional es amaurosis fugax; trastornos oftalmológicos, tales como coriorretinitis idiopática;
- 55 enfermedades infecciosas, tales como infección por parvovirus B (incluyendo el síndrome de las manos y medias);
- trastornos ginecológicos-obstétricos, tales como aborto recurrente, pérdida fetal recurrente, y retraso de crecimiento intrauterino; un ejemplo adicional es el síndrome paraneoplásico secundario a neoplasias ginecológicas;
- 60 trastornos reproductivos masculinos, tales como síndrome paraneoplásico secundario a neoplasias testiculares; y trastornos derivados de trasplantes, tales como rechazo de aloinjerto y xenoinjerto, y enfermedad de injerto contra hospedador.

- 65 El anticuerpo también puede administrarse profilácticamente para reducir el riesgo de desarrollar cáncer, tal como un trastorno tumorigénico tal como se ha descrito anteriormente, retraso en la aparición de la ocurrencia de un acontecimiento en dicha progresión del cáncer, y/o reducir el riesgo de recurrencia cuando dicho cáncer se encuentra en remisión. Esto puede ser especialmente útil en pacientes en donde es difícil localizar un tumor que se

sabe que está presente debido a otros factores biológicos.

Las composiciones de la presente invención pueden incluir una "cantidad terapéuticamente eficaz" o una "cantidad profilácticamente eficaz" de un anticuerpo de CD38 de la invención. Una "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad eficaz, en las dosis y durante los periodos de tiempo necesarios, para lograr un resultado terapéutico deseado. Una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo de CD38 puede variar dependiendo de factores tales como la patología, edad, sexo, y peso del individuo, y de la capacidad del anticuerpo de CD38 para provocar una respuesta deseada en el individuo. Una cantidad terapéuticamente eficaz es también aquella en la que cualquier efecto tóxico o perjudicial del anticuerpo o parte de anticuerpo se ve sobrepasada por los efectos terapéuticamente beneficiosos. Una "cantidad profilácticamente eficaz" se refiere a una cantidad que es eficaz, en las dosis y durante los periodos de tiempo necesarios, para lograr el resultado profiláctico deseado (por ejemplo, una reducción en la probabilidad de desarrollar un trastorno, una reducción en la intensidad o diseminación de un trastorno, un aumento en la probabilidad de supervivencia durante un trastorno inminente, un retraso en la aparición de una afección patológica, etc.). Normalmente, debido a que se usa una dosis profiláctica en sujetos antes de o en una etapa más temprana de la enfermedad, la cantidad profilácticamente eficaz será menor que la cantidad terapéuticamente eficaz.

Una "cantidad terapéuticamente eficaz" para el tratamiento de tumores también puede medirse según su capacidad para estabilizar la progresión de la enfermedad. Puede evaluarse la capacidad de un compuesto para inhibir el cáncer en un sistema de modelo animal predictivo de la eficacia en tumores humanos. Como alternativa, esta propiedad de una composición puede evaluarse examinando la capacidad del compuesto para inhibir el crecimiento celular o para inducir apoptosis en ensayos *in vitro* conocidos para los expertos en la materia. Una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto terapéutico puede reducir el tamaño tumoral, o de otro modo mejorar los síntomas en un sujeto. Un experto habitual en la materia podrá ser capaz de determinar dichas cantidades basándose en factores tales como el tamaño del sujeto, la gravedad de los síntomas del sujeto, y de la composición o ruta de administración particular seleccionada.

Una "cantidad terapéuticamente eficaz" para la artritis reumatoide puede dar como resultado al menos una definición preliminar de mejora ACR<sub>20</sub> en los pacientes, tal como al menos una definición preliminar de mejora ACR<sub>50</sub>, por lo menos, una definición preliminar de mejora ACR<sub>70</sub>.

La definición preliminar de mejora ACR<sub>20</sub> se define como:

una mejora  $\leq 20\%$  en: recuento de articulaciones blandas (TJC) y recuento de articulaciones inflamadas (SJC) y una mejora  $\leq 20\%$  en 3 de las siguientes 5 evaluaciones: Evaluación de dolor del paciente (VAS), Evaluación global del paciente (VAS), Evaluación global del médico (VAS), Discapacidad auto-evaluada del paciente (HAQ), Reactivo de fase aguda (CRP o ESR).

ACR<sub>50</sub> y ACR<sub>70</sub> se definen del mismo como con mejoras  $\leq 50\%$  y  $\leq 70\%$ , respectivamente. Para más detalles véase Felson et al., en American College of Rheumatology Preliminary Definition of Improvement in Rheumatoid Arthritis; Arthritis Rheumatism 38, 727-735 (1995).

Como alternativa, puede medirse una cantidad terapéuticamente eficaz para la artritis reumatoide mediante DAS (puntuación de actividad de la enfermedad), incluyendo DAS28 y/o DAS56, tal como se define por EULAR.

Los regímenes de dosificación se ajustan para proporcionar la respuesta óptima deseada (por ejemplo, una respuesta terapéutica). Por ejemplo, puede administrarse un solo bolo, pueden administrarse varias dosis divididas en el tiempo o la dosis puede reducirse o aumentarse proporcionalmente según sea indicado por las exigencias de la situación terapéutica. Las composiciones parenterales pueden formularse en forma de dosis unitaria por facilidad de administración y uniformidad de dosificación. Una forma de dosis unitaria, tal como se usa en el presente documento, se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosis unitarias para los sujetos que se van a tratar; cada unidad contiene una cantidad predeterminada de compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el vehículo farmacéutico necesario. La especificación para las formas de dosis unitaria están dictadas por y son directamente dependientes de (a) las características únicas del compuesto activo y del efecto terapéutico particular que se pretende lograr, y (b) las limitaciones inherentes en la técnica de formulación de compuestos, como un compuesto activo para el tratamiento de la sensibilidad en individuos.

Las dosificaciones eficaces y los regímenes de dosificación para los anticuerpos de CD38 de la presente invención dependen de la enfermedad o afección que se vaya a tratar y pueden determinarse por los expertos en la materia. Un intervalo ejemplar no limitante para una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de la presente invención es de aproximadamente 0,1-100 mg/kg, tal como aproximadamente 0,1-50 mg/kg, por ejemplo, aproximadamente 0,1-20 mg/kg, tal como aproximadamente 0,1-10 mg/kg, por ejemplo, aproximadamente 0,5, tal como aproximadamente 0,3, aproximadamente 1, o aproximadamente 3 mg/kg.

Un médico o veterinario experto en la materia puede determinar y prescribir fácilmente la cantidad eficaz de la composición farmacéutica necesaria. Por ejemplo, el médico o veterinario puede comenzar con dosis de los

anticuerpos de CD38 de la presente invención en la composición farmacéutica a niveles menores de los necesarios para lograr el efecto terapéutico deseado y gradualmente aumentar la dosis hasta que se logre el efecto deseado. En general, una dosis adecuada de una composición de la presente invención será aquella cantidad del compuesto que sea la dosis menor eficaz para producir un efecto terapéutico. Dicha dosis eficaz dependerá generalmente de los factores descritos anteriormente. La administración puede ser intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, o subcutánea, y, por ejemplo, administrarse próxima al sitio de la diana. Si se desea, la dosis diaria eficaz de una composición farmacéutica puede administrarse como dos, tres, cuatro, cinco, seis o más sub-dosis administradas por separado a intervalos adecuados a lo largo del día, opcionalmente, en formas de dosificación unitarias. Aunque es posible administrar un compuesto de la presente invención solo, es preferible administrar el compuesto en forma de una composición farmacéutica, tal como se ha descrito anteriormente.

En una realización, los anticuerpos de CD38 de la presente invención pueden administrarse mediante infusión en una dosificación semanal de 10 a 500 mg/m<sup>2</sup>, tal como de 200 a 400 mg/m<sup>2</sup>. Dicha administración puede repetirse, por ejemplo, de 1 a 8 veces, tal como de 3 a 5 veces. La administración puede efectuarse mediante infusión continua a lo largo de un periodo de 2 a 24 horas, tal como de 2 a 12 horas.

En una realización, los anticuerpos de CD38 de la presente invención pueden administrarse mediante infusión lenta continua durante un periodo prolongado, tal como más de 24 horas, para reducir los efectos secundarios tóxicos.

En una realización, los anticuerpos de CD38 de la presente invención pueden administrarse en una dosificación semanal de 250 mg a 2000 mg, tal como por ejemplo, 300 mg, 500 mg, 700 mg, 1000 mg, 1500 mg o 2000 mg, hasta 8 veces, tal como de 4 a 6 veces. La administración puede efectuarse mediante infusión continua a lo largo de un periodo de 2 a 24 horas, tal como de 2 a 12 horas. Dicho régimen puede repetirse una o más veces según sea necesario, por ejemplo, después de 6 meses o 12 meses. La dosificación puede determinarse o ajustarse midiendo la cantidad de compuesto de la presente invención en la sangre tras la administración, por ejemplo, extrayendo una muestra biológica y usando anticuerpos anti-idiotípicos que se dirigen a la región de unión a antígeno de los anticuerpos de CD38 de la presente invención.

En una realización, los anticuerpos de CD38 de la presente invención pueden administrarse mediante terapia de mantenimiento, tales como, por ejemplo, una vez a la semana durante un periodo de 6 meses o más.

En una realización, los anticuerpos de CD38 de la presente invención pueden administrarse mediante un régimen que incluye una infusión de un anticuerpo de CD38 de la presente invención seguido de una infusión de un anticuerpo de CD38 de la presente invención conjugado a un radioisótopo. Puede repetirse el régimen, por ejemplo, de 7 a 9 días después.

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

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención también pueden administrarse en terapia combinada, es decir, combinadas con otros agentes terapéuticos relevantes para la enfermedad o afección que se va a tratar. Dicha administración puede ser simultánea, separada o secuencial. Para la administración simultánea, los agentes pueden administrarse en forma de una composición o en forma de composiciones separadas, según sea adecuado.

Por consiguiente, la presente invención proporciona los anticuerpos de la presente invención para su uso en métodos para tratar un trastorno que implica a células que expresan CD38 tal como se han descrito anteriormente, comprendiendo dichos métodos la administración de un CD38BP de la presente invención combinado con uno o más agentes terapéuticos adicionales, tal como se describen más adelante.

Los anticuerpos de la presente invención pueden usarse para la preparación de una composición farmacéutica que se va a administrar con al menos un agente quimioterapéutico para un trastorno que implica células que expresan CD38, tal como se ha descrito anteriormente.

La terapia combinada puede incluir la administración de una composición de la presente invención junto con al menos un agente quimioterapéutico, al menos un agente antiinflamatorio, o al menos un agente inmunosupresor y/o agente inmunomodulador.

En una realización, la presente invención proporciona un anticuerpo de la presente invención para su uso en un método para tratar un trastorno que implica células que expresan CD38 en un sujeto, comprendiendo dicho método la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo de CD38 de la presente invención y al

menos un agente quimioterapéutico a un sujeto que lo necesite.

En una realización, la presente invención proporciona un anticuerpo de la presente invención para su uso en un método para tratar el mieloma múltiple, comprendiendo dicho método la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo de CD38 de la presente invención y al menos un agente quimioterapéutico a un sujeto que lo necesite.

En una realización, los anticuerpos de la presente invención se usan para la preparación de una composición farmacéutica que se va a administrar con al menos un agente quimioterapéutico para tratar el mieloma múltiple.

En una realización, dicho agente quimioterapéutico puede seleccionarse entre un antimetabolito, tal como metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, fludarabina, 5-fluorouracilo, dacarbazina, hidroxiurea, asparaginasa, gemcitabina, cladribina y agentes similares.

En una realización, dicho agente quimioterapéutico puede seleccionarse entre un agente alquilante, tales como mecloretamina, tiotepa, clorambucilo, melfalano, carmustina (BCNU), lomustina (CCNU), ciclofosfamida, busulfán, dibromomanitol, estreptoizotocina, dacarbazina (DTIC), procarbazona, mitomicina C, cisplatino y otros derivados de platino, tal como carboplatino, y agentes similares.

En una realización, dicho agente quimioterapéutico puede seleccionarse entre un antibiótico, tal como dactinomomicina (anteriormente actinomomicina), bleomicina, daunorrubicina (anteriormente daunomicina), doxorubicina, idarrubicina, mitramicina, mitomicina, mitoxantrona, plicamicina, antramicina (AMC) y agentes similares.

En una realización, dicho agente quimioterapéutico puede seleccionarse entre un agente anti-mitótico, tal como taxanos, por ejemplo, docetaxel, y paclitaxel, y alcaloides de la vinca, por ejemplo, vindesina, vincristina, vinblastina, y vinorelbina.

En una realización, dicho agente quimioterapéutico puede seleccionarse entre un inhibidor de topoisomerasa, tal como topotecán.

En una realización, dicho agente quimioterapéutico puede seleccionarse entre un inhibidor de factores de crecimiento, tal como un inhibidor de ErbB1 (EGFR) (tal como gefitinib (Iressa<sup>®</sup>), cetuximab (Erbix<sup>®</sup>), erlotinib (Tarceva<sup>®</sup>), HuMax-EGFr (2F8 divulgado en el documento WO 2002/100348) y agentes similares), un inhibidor de ErbB2 (Her2/neu) (tal como trastuzumab (Herceptin<sup>®</sup>) y agentes similares). En una realización, dicho inhibidor de factores de crecimiento puede ser un inhibidor de farnesil transferasa, tal como SCH-66336 y R115777. En una realización, dicho inhibidor de factores de crecimiento puede ser un inhibidor de factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), tal como bevacizumab (Avastin<sup>®</sup>).

En una realización, dicho agente quimioterapéutico puede ser un inhibidor de tirosina cinasa, tal como imatinib (Glivec, Gleevec STI571), lapatinib, PTK787/ZK222584 y agentes similares.

En una realización, dicho agente quimioterapéutico puede ser un inhibidor de histona desacetilasa. Los ejemplos de dichos inhibidores de histona desacetilasa incluyen compuestos polares híbridos basados en ácido hidroxámico, tales como SAHA (ácido suberoilánilida hidroxámico).

En una realización, dicho agente quimioterapéutico puede ser un inhibidor de MAP cinasa P38a, tal como SCIO-469.

En una realización, la presente invención proporciona los anticuerpos de la presente invención para su uso en un método para tratar un trastorno que implica células que expresan CD38 en un sujeto, comprendiendo dicho método la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo y al menos un inhibidor de la angiogénesis, neovascularización, y/u otra vascularización a un sujeto que lo necesite.

En una realización, la presente invención proporciona los anticuerpos de la presente invención para su uso en un método para tratar el mieloma múltiple, comprendiendo dicho método la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo de CD38 de la presente invención y al menos un inhibidor de la angiogénesis, neovascularización, y/u otra vascularización a un sujeto que lo necesite.

En una realización, los anticuerpos de la presente invención pueden usarse para la preparación de una composición farmacéutica que se va a administrar con al menos un inhibidor de la angiogénesis, neovascularización, y/u otra vascularización para tratar el mieloma múltiple.

Los ejemplos de dichos inhibidores de la angiogénesis son inhibidores de urocinasa, inhibidores de metaloproteasa de matriz (tales como marimastat, neovastat, BAY 12-9566, AG 3340, BMS-275291 y agentes similares), inhibidores de la migración y proliferación de células endoteliales (tales como TNP-470, escualamina, 2-metoxiestradiol, combretastatinas, endostatina, angiostatina, penicilamina, SCH66336 (Schering-Plough Corp, Madison, NJ), R115777 (Janssen Pharmaceutica, Inc, Titusville, NJ) y agentes similares), antagonistas de factores de crecimiento angiogénicos (tales como ZD6474, SU6668, anticuerpos contra agentes angiogénicos y/o sus receptores (tales como

VEGF, bFGF, y angiopoyetina-1), talidomida (Thalomid<sup>®</sup>), análogos de talidomida (tales como CC-5013 (lenalidomida, Revlimid<sup>™</sup>) y CC4047 (Actimid<sup>™</sup>), Sugen 5416, SU5402, ribozima antiangiogénica (tal como angiozima), interferón  $\alpha$  (tal como interferón  $\alpha$ 2a), suramina y agentes similares), inhibidores de cinasa de VEGF-R y otros inhibidores de tirosina cinasa anti-angiogénicos (tales como SU011248), inhibidores de la señalización de integrina/supervivina específica endotelial (tales como vitaxina y agentes similares), antagonistas/quelantes de cobre (tales como tetrahidromolibdato, captopril y agentes similares), carboxiamido-triazol (CAI), ABT-627, CM101, interleucina-12 (IL-12), IM862, PNU145156E así como moléculas de nucleótido que inhiben la angiogénesis (tales como ADNc antisentido para VEGF, ADNc que codifica angiostatina, ADNc que codifica p53 y ADNc que codifica el receptor-2 deficiente para VEGF) y agentes similares.

Otros ejemplos de dichos inhibidores de la angiogénesis, neovascularización, y/o otra vascularización son derivados de heparina anti-angiogénicos y moléculas relacionadas (por ejemplo, heparinasa III), temozolomida, NK4, factor inhibidor de la migración de macrófagos (MIF), inhibidores de la ciclooxigenasa-2, inhibidores del factor 1 inducible por hipoxia, isoflavonas de la soja anti-angiogénicas, oltipraz, fumagilina y análogos de los mismos, análogos de somatostatina, polisulfato de pentosano, tecogalan sódico, dalteparina, tumstatina, trombospondina, NM-3, combrestatina, canstatina, avastatina, anticuerpos contra otras dianas relevantes (tales como mAb anti-alfa-v/beta-3 integrina y anti-kininostatina) y agentes similares.

En una realización, los anticuerpos de la presente invención pueden usarse para la preparación de una composición farmacéutica que se va a administrar con talidomida (Thalomid<sup>®</sup>), análogos de talidomida (tales como CC-5013 (lenalidomida, Revlimid<sup>™</sup>) y/o CC4047 (Actimid<sup>™</sup>)). En una realización adicional, los anticuerpos de la presente invención pueden usarse para la preparación de una composición farmacéutica que se va a administrar con talidomida.

En una realización, los anticuerpos de la presente invención pueden usarse para la preparación de una composición farmacéutica que se va a administrar con un anticuerpo anti-CD20, tal como rituximab (Rituxan<sup>®</sup>, Mabthera<sup>®</sup>), un anticuerpo monoclonal anti-CD20 tal como se divulga en el documento WO 2004/035607, tal como 11 B8, 2F2 o 7D8.

En una realización, un agente terapéutico para su uso en combinación con los anticuerpos de CD38 de la presente invención para tratar los trastornos descritos anteriormente puede ser un inhibidor de proteasa, tal como bortezomib (Velcade<sup>®</sup>).

En una realización, un agente terapéutico para su uso en combinación con los anticuerpos de CD38 de la presente invención para tratar los trastornos descritos anteriormente puede ser un corticosteroide, tal como prednisona, prednisolona, dexametasona, etc.

En una realización, un agente terapéutico para su uso en combinación con los anticuerpos de CD38 de la presente invención para tratar los trastornos descritos anteriormente puede ser un corticosteroide, tal como prednisona, prednisolona, dexametasona, etc.

En una realización, un agente terapéutico para su uso en combinación con los anticuerpos de CD38 de la presente invención para tratar los trastornos descritos anteriormente puede ser un inmunógeno anti-cáncer, tal como un antígeno de cáncer/antígeno asociado a tumores (por ejemplo, molécula de adhesión de células epiteliales (EpCAM/TACSTD1 mucina 1 (MUC1), antígeno carcinoembrionario (CEA), glucoproteína 72 asociada a tumores (TAG-72), gp100, Melan-A, MART-1, KDR, RCAS1, MDA7, vacunas para virus asociados con el cáncer (por ejemplo, vacunas para el papilomavirus humano), proteínas de choque térmico derivadas de tumores, y agentes similares. Asimismo, o como alternativa, pueden usarse en dicha realización una serie de otros antígenos de cáncer/antígenos asociados a tumores adecuados descritos en otras partes del presente documento y moléculas similares conocidas en la técnica. Los péptidos inmunogénicos anti-cáncer también incluyen "vacunas" anti-idiotípicas, tales como anticuerpos anti-idiotípicos BEC2, Mítumomab, CeaVac y anticuerpos anti-idiotípicos relacionados, el anticuerpo anti-idiotípico para el anticuerpo MG7, y otros anticuerpos anti-idiotípicos contra el cáncer (véase, por ejemplo, Birebent et al., Vaccine. 21 (15), 1601-12 (2003), Li et al., Chin Med J (Engl). 114(9), 962-6 (2001), Schmitt et al., Hybridoma. 13(5), 389-96 (1994), Maloney et al., Hybridoma. 4(3), 191-209 (1985), Raychardhuri et al., J Immunol. 137(5), 1743-9 (1986), Pohl et al., Int J Cancer. 50(6), 958-67 (1992), Bohlen et al., Cytokines Mol Ther. 2(4), 231-8 (1996) y Maruyama, J Immunol Methods. 264(1-2), 121-33 (2002)). Dichos anticuerpos anti-idiotípicos pueden conjugarse opcionalmente a un transportador, que puede ser una molécula transportadora sintética (típicamente inerte), una proteína (por ejemplo, hemocianina de lapa californiana (KLH) (véase, por ejemplo, Ochi et al., Eur J Immunol. 17(11), 1645-8 (1987)), o una célula (por ejemplo, un glóbulo rojo de la sangre - véase, por ejemplo, Wi et al., J Immunol Methods. 122(2), 227-34 (1989)).

En una realización, un agente terapéutico para su uso en combinación con los anticuerpos de CD38 de la presente invención para tratar los trastornos descritos anteriormente puede ser un bisfosfonato. Los ejemplos de bisfosfonatos potencialmente adecuados son pamidronato (Aredia<sup>®</sup>), ácido zoledrónico (Zometa<sup>®</sup>), clodronato (Bonefos<sup>®</sup>), risendronato (Actonel<sup>®</sup>), ibandronato (Boniva<sup>®</sup>), etidronato (Didronel<sup>®</sup>), alendronato (Fosamax<sup>®</sup>), tiludronato (Skelid<sup>®</sup>), incadronato (Yamanouchi Pharmaceutical) y minodronato (YM529, Yamanouchi).

En una realización, un agente terapéutico para su uso en combinación con los anticuerpos de CD38 de la presente invención para tratar los trastornos descritos anteriormente puede ser un factor estimulante de colonias. Los ejemplos de factores estimulantes de colonias adecuados son factores estimulantes de colonias de granulocitos (G-CSF), tales como filgrastim (Neupogen®) y pegfilgrastim (Neulasta®), y factores estimulantes de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) tales como sargramostim (Leukine®).

En una realización, un agente terapéutico para su uso en combinación con los anticuerpos de CD38 de la presente invención para tratar los trastornos descritos anteriormente puede ser un agente eritropoyético. Los ejemplos de agentes eritropoyéticos adecuados son eritropoyetina (EPO), tales como epoetina alfa (por ejemplo, Procrit®, Epogen® y Eprex®) y epoetina beta (por ejemplo, NeoRecormon®) y proteínas estimulantes de la eritropoyesis (por ejemplo, Aranesp®).

En una realización, un agente terapéutico para su uso en combinación con los anticuerpos de CD38 de la presente invención para tratar los trastornos descritos anteriormente puede ser una citocina anti-cáncer, quimiocina, o una combinación de las mismas. Los ejemplos de citocinas y factores de crecimiento adecuados incluyen IFN $\gamma$ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-7, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, IL-18, IL-23, IL-24, IL-27, IL-28a, IL-28b, IL-29, KGF, IFN $\alpha$  (por ejemplo, INF $\alpha$ 2b), IFN $\beta$ , GM-CSF, CD40L, ligando Flt3, factor de células madre, ancestim, y TNF $\alpha$ . Las quimiocinas adecuadas pueden incluir citocinas negativas a Glu-Leu-Arg (ELR), tales como IP-10, MCP-3, MIG, y SDF-1 $\alpha$  de las familias de quimiocinas humanas CXC y C-C. Las citocinas adecuadas incluyen derivados de citocinas, variantes de citocinas, fragmentos de citocinas, y proteínas de fusión de citocinas.

Estos y otros métodos o usos que implican ácidos nucleicos que codifican péptidos de origen natural en el presente documento pueden efectuarse como alternativa o adicionalmente mediante "activación génica" y técnicas de regulación positiva por recombinación de homólogos, tal como se describen en los documentos US 5.968.502, US 6.063.630 y US 6.187.305 y EP 0505500.

En una realización, un agente terapéutico para su uso en combinación con los anticuerpos de CD38 de la presente invención para tratar los trastornos descritos anteriormente puede ser un agente que modula, por ejemplo, potencia o inhibe, la expresión o actividad de receptores de Fc $\alpha$  o Fc $\gamma$ . Los ejemplos de agentes adecuados para este uso incluyen interleucina-1 (IL-1), interleucina-2 (IL-2), interleucina-6 (IL-6), factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), tales como filgrastim (Neupogen®) y pegfilgrastim (Neulasta®), y factores estimulantes de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) tales como sargramostim (Leukine®), interferón- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), y factor de necrosis tumoral (TNF).

En una realización, un agente terapéutico para su uso en combinación con los anticuerpos de CD38 de la presente invención para tratar los trastornos tal como se han descrito anteriormente puede ser un regulador del control del ciclo celular/apoptosis (o un "agente regulador"). Un regulador del control del ciclo celular/apoptosis puede incluir moléculas (i) que se dirigen a y modulan reguladores del control del ciclo celular/apoptosis, tales como cdc-25 (tales como NSC 663284), (ii) cinasas dependientes de ciclina que sobreestimulan el ciclo celular (tales como flavopiridol (L868275, HMR1275), 7-hidroxiestaurosporina (UCN-01, KW-2401), y roscovitina (R-roscovitina, CYC202)), y (iii) moduladores de telomerasa (tales como BIBR1532, SOT-095, GRN163 y composiciones descritas en, por ejemplo, los documentos US 6.440.735 y US 6.713.055). Los ejemplos no limitantes de moléculas que interfieren con las vías apoptóticas incluyen ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF (TRAIL)/ligando-2 de apoptosis (Apo-2L), agentes que producen el bloqueo de NF- $\kappa$ B que da lugar a la inhibición de la producción de IL-6, anticuerpos que activan receptores TRAIL, IFN, Bcl-2 antisentido, y As $_2$ O $_3$  (tríóxido de arsénico, Trisenox®).

En una realización, un agente terapéutico para su uso en combinación con los anticuerpos de CD38 de la presente invención para tratar los trastornos descritos anteriormente puede ser un agente regulador hormonal, tales como agentes útiles para terapia anti-andrógenos y anti-estrógenos. Los ejemplos de dichos agentes reguladores hormonales son tamoxifeno, idoxifeno, fulvestrant, droloxifeno, toremifeno, raloxifeno, dietilestibestrol, etinil estradiol/etinilo, y antiandrógeno (tal como flutamida/elulexina), una progestina (tal como caproato de hidroxiprogesterona, medroxiprogesterona/provera, acetato de megestrol/megace), un adrenocorticosteroide (tal como hidrocortisona, prednisona), hormona liberadora de la hormona luteinizante (y análogos de la misma y otros agonistas de LHRH, tales como buserelina y goserelina), un inhibidor de aromatasas (tal como anastrozol/arimidex, aminoglutetimida/citraden, exemestano), un inhibidor de hormonas (tales como ocreótido/sandostatina) y agentes similares.

En una realización, un agente terapéutico para su uso en combinación con los anticuerpos de CD38 de la presente invención para tratar los trastornos descritos anteriormente puede ser un agente anti-anérgico (por ejemplo, compuestos de molécula pequeña, proteínas, glucoproteínas, o anticuerpos que rompen la tolerancia a antígenos tumorales y del cáncer). Los ejemplos de dichos compuestos son moléculas que bloquean la actividad de CTLA-4, tales como MDX-010 (Phan et al., PNAS USA 100, 8372 (2003)).

En una realización, el agente terapéutico para su uso en combinación con los anticuerpos de CD38 de la presente invención para tratar los trastornos descritos anteriormente puede ser un ácido nucleico o vector que contiene un

gen supresor tumoral, tla como un adenovirus deficiente para replicación que codifica p53/SCH58500 humano recombinante o de tipo silvestre, etc.; ácidos nucleicos antisentido dirigidos a oncogenes, genes mutados o desregulados; o ARNpi dirigido a genes mutados o desregulados. Los ejemplos de dianas supresoras tumorales incluyen, por ejemplo, BRCA1, RB1, BRCA2, DPC4 (Smad4), MSH2, MLH1, y DCC.

5 En una realización, un agente terapéutico para su uso en combinación con los anticuerpos de CD38 de la presente invención para tratar los trastornos descritos anteriormente puede ser un ácido nucleico anti-cáncer, tal como genasense (augmerosen/G3139), LY900003 (ISIS 3521), ISIS 2503, OGX-011 (ISIS 112989), LE-AON/LEraf-AON (oligonucleótido antisentido c-raf encapsulado en liposomas/ISIS-5132), MG98, y otros ácidos nucleicos antisentido que se dirigen a PKC $\alpha$ , clusterina, IGFBP, proteína cinasa A, ciclina D1, o Bcl-2h.

15 En una realización, un agente terapéutico para su uso en combinación con los anticuerpos de CD38 de la presente invención para tratar los trastornos descritos anteriormente puede ser una molécula de ARN inhibidora anticáncer (véase, por ejemplo, Lin et al., *Curr Cancer Drug Targets*. 1(3), 241-7 (2001), corregido en: *Curr Cancer Drug Targets*. 3(3), 237 (2003), Lima et al., *Cancer Gene Ther*. 11 (5), 309-16 (2004), Grzmil et al., *Int J Oncol*. 4(1), 97-105 (2004), Collis et al., *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 57(2 Supl), S144 (2003), Yang et al., *Oncogene*. 22(36), 5694-701 (2003) y Zhang et al., *Biochem Biophys Res Commun*. 303(4), 1169-78 (2003)).

20 Las composiciones y metodos de administración combinados de la presente invención también incluyen la administración de vacunas de ácido nucleico, tales como vacunas de ADN desnudo que codifican dichos antígenos de cáncer/antígenos asociados a tumores (véanse, por ejemplo, los documentos US 5.589.466, US 5.593.972, US 5.703.057, US 5.879.687, US 6.235.523, y US 6.387.888). En una realización, el método de administración combinado y/o la composición combinada comprende una composición de vacuna autóloga. En una realización, el método de administración combinado y/o la composición combinada comprende una vacuna de células completas o células que expresan citocinas (por ejemplo, un fibroblasto que expresa IL-2 recombinante, células dendríticas que expresan citocinas recombinantes, y similares) (véase, por ejemplo, Kowalczyk et al., *Acta Biochim Pol*. 50(3), 613-24 (2003), Reilly et al., *Methods Mol Med*. 69, 233-57 (2002) y Tirapu et al., *Curr Gene Ther*. 2(1), 79-89 (2002). Otro ejemplo de dicha estrategia de células autólogas que puede ser útil en métodos combinados de la presente invención es el método de inmunoterapia personalizada MyVax $\text{\textcircled{R}}$  (anteriormente citado como GTO-99) (Genitope Corporation - Redwood City, CA, EE.UU.).

35 En una realización, la presente invención proporciona composiciones combinadas y métodos de administración combinada en donde se combina un anticuerpo de CD38 de la invención o se coadministra con un virus, proteínas virales, y similares. Los virus deficientes para replicación, que generalmente son capaces de una o solo unas pocas rondas de replicación *in vivo*, y que se dirigen a células tumorales, pueden ser, por ejemplo, componentes útiles de dichas composiciones y métodos. Dichos agentes víricos pueden comprender o estar asociados con ácidos nucleicos que codifican inmunoestimulantes, tales como GM-CSF y/o IL-2. Tanto los virus oncolíticos naturales como los virus oncolíticos recombinantes (por ejemplo, virus de HSV-1, reovirus, adenovirus deficientes para replicación y sensibles a la replicación, etc.) pueden ser componentes útiles de dichos métodos y composiciones. Por consiguiente, en una realización, la presente invención proporciona composiciones combinadas y métodos de administración combinada en donde se combina un anticuerpo de CD38 de la invención o se coadministra con un virus oncolítico. Los ejemplos de dichos virus incluyen adenovirus oncolíticos y herpesvirus, que pueden ser o no virus modificados (véase, por ejemplo, Shah et al., *J Neurooncol*. 65(3), 203-26 (2003), Stiles et al., *Surgery*. 134(2), 357-64 (2003), Sunarmura et al., *Pancreas*. 28(3), 326-9 (2004), Teshigahara et al., *J Surg Oncol*. 85(1), 42-7 (2004), Varghese et al., *Cancer Gene Ther*. 9(12), 967-78 (2002), Wildner et al., *Cancer Res*. 59(2), 410-3 (1999), Yamanaka, *Int J Oncol*. 24(4), 919-23 (2004) y Zwiebel et al., *Semin Oncol*. 28(4), 336-43 (2001).

50 Las composiciones combinadas y los métodos de administración combinada que implican anticuerpos de la presente invención también pueden implicar métodos de inmunoterapia de "células completas" y "adoptivos". Por ejemplo, dichos métodos pueden comprender la infusión o re-infusión de células del sistema inmune (por ejemplo, linfocitos infiltrantes en tumores (TIL), tales como células T CD4 $^{+}$  y/o CD8 $^{+}$  (por ejemplo, células T expandidas con antígenos específicos de tumores y/o potenciamientos genéticos), células B que expresan anticuerpo u otras células productoras/presentadoras de anticuerpo, células dendríticas (por ejemplo, células dendríticas recombinantes que expresan anti-citocinas, células dendríticas cultivadas con un agente expansor de DC, tal como GM-CSF y/o Flt3-L, y/o células dendríticas cargadas con antígeno asociado a tumores), células NK antitumorales, las denominadas células híbridas, o una de sus combinaciones. También pueden ser útiles los lisados celulares en dichos métodos y composiciones. Las "vacunas" celulares en ensayos clínicos que pueden ser útiles en dichos aspectos incluyen Canvaxin $\text{\textsuperscript{TM}}$ , APC-8015 (Dendreon), HSPPC-96 (Antigenics), y lisados celulares Melacine $\text{\textcircled{R}}$ . Los antígenos extraídos de células de cáncer, y mezclas de los mismos (véase, por ejemplo, Bystryn et al., *Clinical Cancer Research* Vol. 7, 1882-1887, julio de 2001), opcionalmente mezclados con adyuvantes, tales como alumbre, pueden ser también componentes en dichos métodos y composiciones combinadas.

65 En una realización, un anticuerpo de CD38 de la presente invención puede suministrarse a un paciente en combinación con la aplicación de un método de vacunación interno. Vacunación interna se refiere a la muerte tumoral o de células cancerosas inducida, tal como muerte celular inducida por fármacos o inducida por radiación de las células tumorales, en un paciente, que típicamente da lugar a que se provoque una respuesta inmunitaria dirigida hacia (i) las células tumorales en su conjunto o (ii) partes de las células tumorales incluyendo (a) proteínas

- secretadas, glucoproteínas u otros productos, (b) proteínas asociadas a membrana o glucoproteínas u otros componentes asociados con o insertados en membranas, y/o (c) proteínas intracelulares u otros componentes intracelulares. Una respuesta inmunitaria inducida por vacunación interna puede ser humoral (es decir, mediada por anticuerpo-complemento) o mediada por células (por ejemplo, el desarrollo y/o aumento de linfocitos T citotóxicos endógenos que reconocen las células tumorales eliminadas internamente o partes de las mismas). Además de radioterapia, los ejemplos no limitantes de fármacos y agentes que pueden usarse para inducir dicha muerte de células tumorales y de vacunación interna son agentes quimioterapéuticos convencionales, inhibidores del ciclo celular, fármacos anti-angiogénesis, anticuerpos monoclonales, agentes inductores de la apoptosis, e inhibidores de la transducción de señales.
- Los ejemplos de otros agentes anti-cáncer, que pueden ser relevantes como agentes terapéuticos para su uso en combinación con los anticuerpos de CD38 de la presente invención para tratar los trastornos descritos anteriormente son agentes inductores de la diferenciación, ácido retinoico y análogos de ácido retinoico (tales como ácido todo trans retinoico, ácido 13-cis retinoico y agentes similares), análogos de la vitamina D (tales como seocalcitol y agentes similares), inhibidores de ErbB3, ErbB4, IGF-IR, el receptor de insulina, PDGFRa, PDGFRbeta, Flk2, Flt4, FGFR1, FGFR2, FGFR3, FGFR4, TRKA, TRKC, c-met, Ron, Sea, Tie, Tie2, Eph, Ret, Ros, Alk, LTK, PTK7 y agentes similares.
- Los ejemplos de otros agentes anti-cáncer, que pueden ser relevantes como agentes terapéuticos para su uso en combinación con los anticuerpos de CD38 de la presente invención para tratar los trastornos descritos anteriormente son catepsina B, moduladores de la actividad deshidrogenasa de catepsina D, glutatión-S-transferasa (tales como glutacilcisteína sintetasa y lactato deshidrogenasa), y agentes similares.
- Los ejemplos de otros agentes anti-cáncer, que pueden ser relevantes como agentes terapéuticos para su uso en combinación con los anticuerpos de CD38 de la presente invención para tratar los trastornos descritos anteriormente son estramustina y epirubicina.
- Los ejemplos de otros agentes anti-cáncer, que pueden ser relevantes como agentes terapéuticos para su uso en combinación con los anticuerpos de CD38 de la presente invención para tratar los trastornos descritos anteriormente son un inhibidor HSP90 similar a 17-alil amino geldanamicina, anticuerpos dirigidos contra un antígeno tumoral, tal como PSA, CA125, KSA, etc., integrinas tales como integrina  $\beta$ 1, inhibidores de VCAM y agentes similares.
- Los ejemplos de otros agentes anti-cáncer, que pueden ser relevantes como agentes terapéuticos para su uso en combinación con los anticuerpos de CD38 de la presente invención para tratar los trastornos descritos anteriormente son inhibidores de calcineurina (tales como valsopodar, PSC 833 y otros inhibidores de MDR-1 o de p-glucoproteína), inhibidores de TOR (tales como sirolimus, everolimus y rapamicina) e inhibidores de los mecanismos de "alojamiento de linfocitos" (tales como FTY720), y agentes con efectos en la señalización celular, tales como inhibidores de moléculas de adhesión (por ejemplo, anti-LFA, etc.).
- En una realización, la presente invención proporciona un anticuerpo de la invención para su uso en un método para tratar un trastorno que implica células que expresan CD38 en un sujeto, comprendiendo dicho método la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo CD38 de la presente invención y radioterapia a un sujeto que lo necesite.
- En una realización, la presente invención proporciona un anticuerpo de la invención para su uso en un método para tratar el mieloma múltiple, comprendiendo dicho método la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo de CD38 de la presente invención y radioterapia a un sujeto que lo necesite.
- En una realización, los anticuerpos de la presente invención pueden usarse para la preparación de una composición farmacéutica que se va a administrar con radioterapia para tratar el mieloma múltiple.
- La radioterapia puede comprender que se proporcione radiación o la administración asociada de radiofarmacéuticos a un paciente. La fuente de radiación puede ser externa o interna para el paciente que se esté tratando (el tratamiento con radiación puede, por ejemplo, estar en forma de radioterapia de haz externo (EBRT), braquiterapia (BT) o radioterapia dirigida al esqueleto). Los elementos radiactivos que pueden usarse en la práctica de dichos métodos incluyen, por ejemplo, radio, cesio-137, iridio-192, americio-241, oro-198, cobalto-57, cobre-67, tecnecio-99, yodo-123, yodo-131, e indio-111.
- En una realización, la presente invención proporciona un anticuerpo de la invención para su uso en un método para tratar un trastorno que implica células que expresan CD38 en un sujeto, comprendiendo dicho método la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo de CD38 de la presente invención a un sujeto que lo necesite combinado con una célula madre periférica autóloga o trasplante de médula ósea.
- En una realización, la presente invención proporciona un anticuerpo de la invención para su uso en un método para tratar el mieloma múltiple, comprendiendo dicho método la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo de CD38 de la presente invención a un sujeto que lo necesite combinado con una célula madre

periférica autóloga o trasplante de médula ósea.

En una realización, los anticuerpos de la presente invención pueden usarse para la preparación de una composición farmacéutica para su administración con células madre periféricas autólogas o trasplante de médula ósea para tratar el mieloma múltiple.

En una realización, la presente invención proporciona un anticuerpo de la invención para su uso en un método para tratar un trastorno que implica células que expresan CD38 en un sujeto, comprendiendo dicho método la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo a un sujeto que lo necesite combinado con una intervención ortopédica.

En una realización, la presente invención proporciona el uso de un CD38BP de la presente invención para la preparación de una composición farmacéutica para su administración con células madre periféricas autólogas o trasplante de médula ósea para tratar el mieloma múltiple.

Las intervenciones ortopédicas pueden usarse en el tratamiento de un trastorno que implica a células que expresan CD38, tal como el mieloma múltiple, para ayudar a controlar el dolor o mantener la función o movilidad. Dichas intervenciones pueden incluir terapia física, el astillado de huesos para prevenir o tratar fracturas, o procedimientos quirúrgicos (menores o mayores) para reparar fracturas.

En una realización, un anticuerpo de CD38 de la presente invención puede administrarse en relación con el suministro de uno o más agentes que promueven el acceso del anticuerpo de CD38 o composición combinada al interior de un tumor. Dichos métodos pueden efectuarse, por ejemplo, en asociación con el suministro de relaxina, que es capaz de relajar un tumor (véase, por ejemplo, el documento US 6.719.977). En una realización, un anticuerpo de CD38 de la presente invención puede unirse a un péptido penetrante en células (CPP). Los péptidos penetrantes en células y péptidos relacionados (tales como anticuerpos penetrantes en células modificados) se describen en, por ejemplo, Zhao et al., *J Immunol Methods*. 254(1-2), 137-45 (2001), Hong et al., *Cancer Res*. 60(23), 6551-6 (2000). Lindgren et al., *Biochem J*. 377(Pt 1), 69-76 (2004), Buerger et al., *J Cancer Res Clin Oncol*. 129(12), 669-75 (2003), Pooga et al., *FASEB J*. 12(1), 67-77 (1998) y Tseng et al., *Mol Pharmacol*. 62(4), 864-72 (2002).

En una realización, la presente invención proporciona un anticuerpo de la presente invención para su uso en un método para tratar un trastorno que implica células que expresan CD38 en un sujeto, comprendiendo dicho método la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo de la presente invención y al menos un agente antiinflamatorio a un sujeto que lo necesite.

En una realización, la presente invención proporciona un anticuerpo de la presente invención para su uso en un método para tratar el mieloma múltiple, comprendiendo dicho método la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo de la presente invención y al menos un agente antiinflamatorio a un sujeto que lo necesite.

En una realización, los anticuerpos de la presente invención pueden usarse para la preparación de una composición farmacéutica que se va a administrar con al menos un agente antiinflamatorio para tratar el mieloma múltiple.

En una realización, dicho agente antiinflamatorio puede seleccionarse entre un fármaco esteroideo y un AINE (fármaco antiinflamatorio no esteroideo).

En una realización, dicho agente antiinflamatorio puede seleccionarse entre aspirina y otros salicilatos, inhibidores de Cox-2 (tales como rofecoxib y celecoxib), AINE (tales como ibuprofeno, fenoprofeno, naproxeno, sulindaco, diclofenaco, piroxicam, ketoprofeno, diflunisal, nabumetona, etodolac, oxaprozina, e indometacina), anticuerpos anti-IL6R, anticuerpos anti-IL8, anticuerpos anti-IL15, anticuerpos anti-IL15R, anticuerpos anti-CD4, anticuerpos anti-CD11a (por ejemplo, efalizumab), anticuerpos anti-alfa-4/beta-1 integrina (VLA4) (por ejemplo, natalizumab), CTLA4-Ig para el tratamiento de enfermedades inflamatorias, prednisolona, prednisona, fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad (DMARD), tales como metotrexato, hidroxicloroquina, sulfasalazina, inhibidores de la síntesis de pirimidina (tales como leflunomida), agentes bloqueantes de receptor de IL-1 (tales como anakinra), agentes bloqueantes de TNF- $\alpha$  (tales como etanercept, infliximab, y adalimumab) y agentes similares.

En una realización, la presente invención proporciona un anticuerpo de la presente invención para su uso en un método para tratar un trastorno que implica células que expresan CD38 en un sujeto, comprendiendo dicho método la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo y al menos un agente inmunosupresor y/o inmunomodulador a un sujeto que lo necesite.

En una realización, la presente invención proporciona un anticuerpo de la presente invención para su uso en un método para tratar el mieloma múltiple, comprendiendo dicho método la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo y al menos un agente inmunosupresor y/o inmunomodulador a un sujeto que lo necesite.

En una realización, los anticuerpos de la presente invención pueden usarse para la preparación de una composición farmacéutica que se va a administrar con al menos un agente inmunosupresor y/o inmunomodulador para tratar el mieloma múltiple.

5 En una realización, dicho agente inmunosupresor y/o inmunomodulador puede seleccionarse entre ciclosporina, azatioprina, ácido micofenólico, mofetilo de micofenolato, corticosteroides, tales como prednisona, metotrexato, sales de oro, sulfasalazina, antimaláricos, brequinar, leflunomida, mizoribina, 15-desoxipergualina, 6-mercaptopurina, ciclofosfamida, rapamicina, tacrolimus (FK-506), OKT3, globulina anti-timocitos, timopentina, timosina- $\alpha$  y agentes similares.

10 En una realización, dicho agente inmunosupresor y/o inmunomodulador puede seleccionarse entre anticuerpos inmunosupresores, tales como anticuerpos que se unen a p75 del receptor de IL-2, o anticuerpos que se unen a, por ejemplo, MHC, CD2, CD3, CD4, CD7, CD28, B7, CD40, CD45, IFN $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-4, IL-5, IL-6R, IL-6; IGF, IGFR1, IL-7, IL-8, IL-10, CD11a, o CD58, o anticuerpos que se unen a sus ligandos.

15 En una realización, dicho agente inmunosupresor y/o inmunomodulador puede seleccionarse entre IL-15R soluble, IL-10, moléculas B7 (B7-1, B7-2, sus variantes, y fragmentos de los mismos), ICOS, y OX40, un inhibidor de un regulador negativo de células T (tal como un anticuerpo contra CTLA4) y agentes similares.

20 Los anticuerpos de CD38 de la presente invención pueden administrarse en combinación con dos o más agentes inmunosupresores y/o inmunomoduladores, tal como en combinación con prednisona y ciclosporina; prednisona, ciclosporina y azatioprina; o prednisona, ciclosporina y micofenolato de mofetilo.

25 En una realización, la presente invención proporciona un anticuerpo de la presente invención para su uso en un método para tratar un trastorno que implica células que expresan CD38 en un sujeto, comprendiendo dicho método la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo y un anticuerpo anti-C3b(i) a un sujeto que lo necesite.

30 En una realización, la presente invención proporciona un anticuerpo de la presente invención para su uso en un método para tratar el mieloma múltiple, comprendiendo dicho método la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo de la presente invención y un anticuerpo anti-C3b(i) a un sujeto que lo necesite.

35 En una realización, los anticuerpos de la presente invención pueden usarse para la preparación de una composición farmacéutica que se va a administrar con un anticuerpo anti-C3b(i) para tratar el mieloma múltiple.

40 En una realización, un agente terapéutico para su uso en combinación con los anticuerpos de CD38 de la presente invención para tratar los trastornos descritos anteriormente puede seleccionarse entre inhibidores de histona desacetilasa (por ejemplo, fenilbutirato) y/o agentes de reparación del ADN (por ejemplo, enzimas reparadoras del ADN y composiciones relacionadas, tales como dimericina).

45 Los métodos que implican anticuerpos de la presente invención para tratar un trastorno tal como se ha descrito anteriormente que comprenden la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo de CD38 de la presente invención también pueden comprender terapia fotodinámica dirigida contra el cáncer (por ejemplo, terapia láser contra el cáncer que, opcionalmente, puede practicarse con el uso de un agente fotosensibilizante, véase, por ejemplo, Zhang et al., J Control Release. 93(2), 141-50 (2003)), terapias de ondas sonoras y ondas de choque contra el cáncer (véase, por ejemplo, Kambe et al., Hum Cell. 10(1), 87-94 (1997)), y/o terapia nutracéutica contra el cáncer (véase, por ejemplo, Roudebush et al., Vet Clin North Am Small Anim Pract. 34(1), 249-69, viii (2004) y Rafi, Nutrition. 20(1), 78-82 (2004). Del mismo modo, un anticuerpo de CD38 de la presente invención puede usarse para la preparación de una composición farmacéutica para tratar un trastorno tal como se ha descrito anteriormente con terapia fotodinámica dirigida contra el cáncer (por ejemplo, terapia láser contra el cáncer, que puede ponerse en práctica opcionalmente con el uso de agente fotosensibilizante, terapias de ondas sonoras y ondas de choque contra el cáncer, y/o terapia nutracéutica contra el cáncer.

55 Tal como se ha descrito anteriormente, una composición farmacéutica de la presente invención puede administrarse en terapia combinada, es decir, combinada con uno o más agentes relevantes para la enfermedad o afección que se va a tratar como composiciones farmacéuticas separadas o con un compuesto de la presente invención coformulado con uno o más agentes terapéuticos adicionales, tal como se han descrito anteriormente. Dichas terapias combinadas pueden necesitar dosis menores del compuesto de la presente invención y/o de los agentes coadministrados, evitando de este modo toxicidades o complicaciones posibles asociadas con las diversas monoterapias.

60 En una realización, la presente invención proporciona un anticuerpo de CD38 que se conjuga a un inmunomodulador, tal como una citocina inmunomoduladora, factor de crecimiento de células madre, linfoxina (tal como un TNF, tal como TNF $\alpha$ ), o factor hematopoyético. Los ejemplos de dichas moléculas que pueden ser útiles como conjugados incluyen IL-1, IL-2, IL-3, IL-6, IL-10, IL-12, IL-18, y IL-21, factores estimulantes de colonias (tales como factor estimulantes de colonias de granulocitos (G-CSF) y factor estimulante de colonias de granulocitos y

macrófagos (GM-CSF)), interferones (tales como IFN $\alpha$ , IFN $\beta$ , e IFN $\gamma$ ) el factor de crecimiento de células madre, denominado "factor S1", eritropoyetina, y trombopoyetina, fragmentos activos de los mismos, derivados de los mismos, sus variantes, o una combinación de cualquiera de los mismos.

- 5 En una realización, los anticuerpos de CD38 de la presente invención pueden usarse *in vivo* o *in vitro* para diagnosticar enfermedades en donde las células activadas que expresan CD38 desempeñan un papel activo en la patogénesis mediante la detección de los niveles de CD38, o los niveles de células que contienen CD38 sobre su superficie de membrana. Esto puede lograrse, por ejemplo, poniendo en contacto una muestra que se va a ensayar, opcionalmente junto con una muestra de control, con el anticuerpo de CD38 en condiciones que permiten la formación de un complejo entre el anticuerpo y CD38. Entonces se detecta la formación de complejo (por ejemplo, usando un ELISA). Cuando se usa una muestra de control junto con la muestra de ensayo, el complejo se detecta en ambas muestras y cualquier diferencia estadísticamente significativa en la formación de complejos entre las muestras es indicativa de la presencia de CD38 en la muestra de ensayo.
- 10
- 15 Más específicamente, los anticuerpos de la presente invención proporcionan métodos para la identificación de, y el diagnóstico de células y tejidos invasores, y otras células usadas como diana por anticuerpos de CD38 de la presente invención, y para el control del progreso de los tratamientos terapéuticos, el estado después del tratamiento, el riesgo de desarrollar cáncer, la progresión del cáncer, y similares.
- 20 En un ejemplo de dicho ensayo diagnóstico, los anticuerpos de la presente invención proporcionan un método para diagnosticar el nivel de células invasoras en un tejido que comprende formar un inmunocomplejo entre un anticuerpo de CD38 y tejidos que potencialmente contienen CD38, y detectar la formación del inmunocomplejo, en donde la formación del inmunocomplejo se correlaciona con la presencia de células invasoras en el tejido. La puesta en contacto puede efectuarse *in vivo*, usando anticuerpos aislados marcados y técnicas de obtención de imágenes convencionales, o pueden efectuarse *in vitro* en muestras de tejido.
- 25

Los CD38BP, tales como los anticuerpos de CD38, pueden usarse para detectar péptidos que contienen CD38 y fragmentos peptídicos en cualquier muestra biológica adecuada mediante cualquier técnica adecuada. Los ejemplos de inmunoensayos convencionales proporcionados por los anticuerpos de la presente invención incluyen, sin limitación, un ELISA, un RIA, ensayos FACS, ensayos de resonancia de plasmón, ensayos cromatográficos, inmunohistoquímica tisular, *Western blot*, y/o inmunoprecipitación usando un CD38BP. Los anticuerpos anti-CD38 de la presente invención pueden usarse para detectar CD38 y fragmentos de CD38 en seres humanos. Los marcadores adecuados para el CD38BP y/o los anticuerpos secundarios usados en dichas técnicas incluyen, sin limitación, diversas enzimas, grupos prostéticos, materiales fluorescentes, materiales luminiscentes, y materiales radioactivos.

30

35 Los ejemplos de enzimas adecuadas incluyen peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina,  $\beta$ -galactosidasa, o acetilcolinesterasa; los ejemplos de complejos de grupo prostético adecuado incluyen estreptavidina/biotina y avidina/biotina; los ejemplos de materiales fluorescentes adecuados incluyen umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, diclorotriazinilamina fluoresceína, cloruro de dansilo o ficoeritrina; un ejemplo de material luminiscente incluye luminol; y los ejemplos de material radioactivo adecuado incluyen  $^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{35}\text{S}$  t  $^3\text{H}$ .

40

Los CD38BP, tales como los anticuerpos de CD38, también pueden ensayarse en una muestra biológica mediante un inmunoensayo de competición que utiliza patrones de péptido de CD38 marcados con una sustancia detectable y un CD38BP no marcado, tal como un anticuerpo anti-CD38 no marcado, por ejemplo. En dicho ensayo, la muestra biológica, los patrones de péptido de CD38 marcados y el CD38BP se combinan y se determina la cantidad de patrón de CD38 marcado unido al CD38BP no marcado. La cantidad de péptido de CD38 en la muestra biológica es inversamente proporcional a la cantidad de patrón de CD38 marcado unido al CD38BP.

45

Los anticuerpos de CD38 son particularmente útiles para obtener imágenes *in vivo* de tumores. La obtención de imágenes *in vivo* de tumores asociados con CD38 puede efectuarse mediante cualquier técnica adecuada. Por ejemplo, puede usarse marcaje con  $^{99}\text{Tc}$  o marcado con otro isótopo emisor de rayos gamma para marcar anticuerpos anti-CD38 en tumores o complejos marcados secundarios (por ejemplo, marcados con FITC) de anticuerpo de CD38:CD38 de tumores y obtenerse imágenes con una cámara de centelleo gamma (por ejemplo, un dispositivo Elscint Apex 409ECT), típicamente usando un colimador de baja energía y alta resolución o un colimador de baja energía para todos los fines. Entonces pueden evaluarse los tejidos teñidos para recuentos de radiactividad como indicador de la cantidad de péptidos asociados a CD38 en el tumor. Las imágenes obtenidas mediante el uso de dichas técnicas pueden usarse para evaluar la biodistribución de CD38 en un paciente, mamífero, o tejido, por ejemplo, en el contexto de usar CD38 o fragmentos de CD38 como biomarcadores para la presencia de células cancerosas invasoras. Las variaciones de esta técnica pueden incluir el uso de imágenes de resonancia magnética (IRM) para mejorar la obtención de imágenes frente a técnicas de cámara gamma. Se describen métodos y principios de inmunoescintografía similares en, por ejemplo, Srivastava (ed.), *Radiolabeled Monoclonal Antibodies For Imaging And Therapy* (Plenum Press 1988), Chase, "Medical Applications of Radioisotopes," en *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 18<sup>a</sup> Edición, Gennaro et al., (eds.), págs. 624-652 (Mack Publishing Co., 1990), y Brown, "Clinical Use of Monoclonal Antibodies," en *Biotechnology And Pharmacy* 227-49, Pezzuto et al., (eds.) (Chapman and Hall 1993). Dichas imágenes también pueden usarse para el suministro dirigido de otros agentes anticáncer, ejemplos de los cuales se describen en el presente documento (por ejemplo, agentes apoptóticos, toxinas, o

50

55

60

65

composiciones de quimioterapia CHOP). Además, dichas imágenes pueden servir además o como alternativa como base para técnicas quirúrgicas para la extirpación de tumores. Además, dichas técnicas de obtención de imágenes *in vivo* pueden permitir la identificación y localización de un tumor en una situación donde se identifica que un paciente tiene un tumor (debido a la presencia de otro biomarcador, metástasis, etc.), pero el tumor no puede identificarse mediante técnicas analíticas tradicionales. Todos estos métodos son características de acuerdo con la presente invención.

Los métodos de obtención de imágenes *in vivo* y otros métodos diagnósticos que utilizan los anticuerpos de la presente invención son particularmente útiles en la detección de micrometástasis en un paciente humano (por ejemplo, un paciente al que no se ha diagnosticado previamente un cáncer o un paciente en un periodo de recuperación/remisión de un cáncer). Las células de cáncer de carcinoma, que forman hasta un 90% de todas las células cancerosas, por ejemplo, han mostrado muy buena tinción con composiciones conjugado de anticuerpo anti-CD38. La detección con anticuerpos monoclonales anti-CD38 y otros CD38BP descritos en el presente documento puede ser indicativa de la presencia de carcinomas que son agresivos/invasivos y también o como alternativa proporcionan una indicación de la factibilidad de uso de un anticuerpo anti-CD38 monoclonal relacionado, CD38BP, o tratamientos con composición relacionanda contra dichas micrometástasis. Además, los anticuerpos monoclonales anti-CD38 que se asocian con las células cancerosas son ventajosamente capaces de distinguir dichos tejidos y células asociados con el cáncer de las células normales que otras formas de CD38 que puedan estar asociadas.

En un método de obtención de imágenes *in vivo* un CD38BP, tal como un anticuerpo anti-CD38 de la presente invención, se puede conjugar a un agente promotor de la detección opaco a la radiación, el anticuerpo conjugado se administra a un hospedador, tal como mediante inyección en el torrente sanguíneo, y se ensaya la presencia y ubicación del anticuerpo marcado en el hospedador. Mediante esta técnica y cualquier otro método diagnóstico descrito en el presente documento, se proporciona en el presente documento un método para explorar respecto de la presencia de células relacionadas con la enfermedad en un paciente humano o una muestra biológica tomada de un paciente humano.

Para obtención de imágenes diagnósticas, los radioisótopos pueden unirse a un CD38BP, tal como un anticuerpo de CD38, bien directamente, o indirectamente mediante el uso de un grupo funcional intermedio. Los grupos funcionales intermedios útiles incluyen quelantes, tales como ácido etilendiaminotetraacético y ácido dietilentriaminopentaacético (véase, por ejemplo, el documento US 5.057.313). En dichos ensayos diagnósticos que implican CD38BP conjugados a radioisótopos, la dosificación de péptido conjugado administrado al paciente se mantiene típicamente a un nivel tan bajo como sea posible seleccionando un isótopo para la mejor combinación de semivida mínima, mínima retención en el cuerpo, y mínima cantidad de isótopo, que permitirá la detección y medición precisa.

Además de la adición de radioisótopos y agentes opacos a la radiactividad, pueden efectuarse métodos diagnósticos usando CD38BP, tales como los anticuerpos de CD38, que se conjugan a colorantes (tal como con el complejo biotina-estreptavidina), agentes de contraste, compuestos fluorescentes o moléculas y agentes potenciadores (por ejemplo, iones paramagnéticos) para la obtención de imágenes por resonancia magnética (IRM) (véase, por ejemplo, Patente de los Estados Unidos. n.º 6.331.175, que describe técnicas de IRM y la preparación de anticuerpos conjugados a un agente potenciador de IRM). Dichos agentes diagnósticos/de detección pueden seleccionarse entre agentes para su uso en obtención de imágenes por resonancia magnética, y compuestos fluorescentes. Para cargar un CD38BP, tal como un anticuerpo, componente con metales radiactivos o iones paramagnéticos, puede ser necesario hacerlo reaccionar con un reactivo que tenga una cola larga a la que se une una serie de grupos quelantes para unir los iones. Dicha cola puede ser un polímero, tal como una polilisina, polisacárido, u otra cadena derivatizada o derivatizable que tiene grupos colgantes a los que pueden unirse grupos quelantes, tales como, por ejemplo, porfirinas, poliaminas, éteres corona, bistiosemicarbazonas, polioximas, y grupos similares conocidos como útiles con este fin. Los quelatos pueden acoplarse a CD38BP usando químicas convencionales. Un quelato se une normalmente a un CD38BP, tal como un mAb anti-CD38, mediante un grupo, que permite la formación de un enlace con la molécula con una pérdida mínima de inmunorreactividad y una mínima agregación y/o reticulación interna. Otros métodos y reactivos más infrecuentes para conjugar quelatos a anticuerpos se divulgan en, por ejemplo, el documento US 4.824.659. Los ejemplos de combinaciones de quelato de metal potencialmente útiles incluyen 2-bencil-DTPA y sus análogos de monometilo y ciclohexilo, usados con isótopos diagnósticos en el intervalo general de energía de 60 a 4.000 keV, tales como  $^{125}\text{I}$ ,  $^{123}\text{I}$ ,  $^{124}\text{I}$ ,  $^{62}\text{Cu}$ ,  $^{64}\text{Cu}$ ,  $^{18}\text{F}$ ,  $^{111}\text{In}$ ,  $^{67}\text{Ga}$ ,  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ,  $^{94\text{m}}\text{Tc}$ ,  $^{11}\text{C}$ ,  $^{13}\text{N}$ ,  $^{15}\text{O}$  y  $^{76}\text{Br}$ , para obtención de radioimágenes. Estos y quelatos similares, cuando se complejan con metales no radiactivos, tales como manganeso, hierro, y gadolinio pueden ser útiles para métodos diagnósticos de IRM en relación a los CD38BP. Los quelatos macrocíclicos, tales como NOTA, DOTA, y TETA son útiles con una serie de metales y radiometales, más particularmente con radionúclidos de galio, itrio, y cobre, respectivamente. Dichos complejos de quelato de metal pueden hacerse muy estables ajustando el tamaño del anillo para el metal de interés. Otros quelatos de tipo anillo, tales como poliéteres macrocíclicos, que son de interés para unir núclidos de manera estable, tales como  $^{223}\text{Ra}$  para RAIT también pueden ser adecuados en métodos diagnósticos.

Por lo tanto, en el presente documento se proporcionan conjugados de anticuerpo de CD38 diagnósticos, en donde el anticuerpo de CD38 se conjuga a un agente de contraste (tal como para obtención de imágenes por resonancia

magnética, tomografía computarizada, o un agente potenciador de contraste de ultrasonidos) o un radionúclido que puede ser, por ejemplo, un gamma-, beta-, alfa-, electrón penetrante, o isótopo emisor de positrones. Los CD38BP conjugados útiles adicionales se describen en otras partes del presente documento, que también pueden ser útiles en métodos y composiciones diagnósticas (por ejemplo, kits diagnósticos) proporcionados por la presente invención.

5 En el presente documento se describe un kit para diagnosticar un cáncer que comprende un envase que comprende un CD38BP, tal como un anticuerpo anti-CD38, y uno o más reactivos para detectar la unión del CD38BP a un péptido de CD38. Los reactivos pueden incluir, por ejemplo, marcadores fluorescentes, marcadores enzimáticos, u  
10 otros marcadores detectables. Los reactivos también pueden incluir anticuerpos secundarios o terciarios para reacciones enzimáticas, en donde las reacciones enzimáticas producen un producto que puede visualizarse. En una realización, en el presente documento se proporciona un kit diagnóstico que comprende uno o más CD38BP, tales como anticuerpos anti-CD38 de la presente invención, en forma marcada o no marcada en envases adecuados, reactivos para las incubaciones para un ensayo indirecto, y sustratos o agentes derivatizantes para la detección en dicho ensayo, dependiendo de la naturaleza del marcador. También pueden incluirse reactivos de control e  
15 instrucciones para su uso.

También pueden suministrarse kits diagnósticos para su uso con un CD38BP, tal como un anticuerpo anti-CD38 conjugado/marcado, para la detección de una actividad celular o para detectar la presencia de péptidos de CD38 en una muestra de tejido u hospedador. En dichos kits diagnósticos, así como en kits para usos terapéuticos descritos  
20 en otras partes del presente documento, puede proporcionarse típicamente un CD38BP en forma liofilizada en un envase, ya sea solo o conjuntamente con anticuerpos adicionales específicos para una célula o péptido diana. Normalmente, un vehículo farmacéutico aceptable (por ejemplo, un diluyente inerte) y/o componentes del mismo, tales como tampón Tris, fosfato, o carbonato, estabilizantes, conservantes, biocidas, biocidas, proteínas inertes, por ejemplo, albúmina de suero, o similares, también se incluyen (típicamente en un envase separado para mezclar) y reactivos adicionales (también típicamente en envases separados). En determinados kits, también se incluye un anticuerpo secundario capaz de unirse al anticuerpo anti-CD38 u otro CD38BP, que está típicamente presente en un envase separado. El segundo anticuerpo se conjuga típicamente a un marcador y se formula de un modo similar al anticuerpo anti-CD38 de la presente invención.

30 Usando los métodos descritos anteriormente y en otras partes de presente documento, los CD38BP, tales como los anticuerpos, pueden usarse para definir subconjuntos de células cancerosas/tumorales y caracterizar dichas células y tejidos/crecimientos relacionados.

En un ejemplo, un CD38BP o anticuerpo anti-CD38, puede añadirse a nitrocelulosa, u otro soporte sólido que es capaz de inmovilizar células, partículas celulares, o proteínas solubles. El soporte puede entonces lavarse con tampones adecuados seguido de tratamiento con el péptido o anticuerpo de CD38 marcado de manera detectable. El soporte de fase sólida puede entonces lavarse con el tampón una segunda vez para retirar el péptido o anticuerpo no unido. Entonces puede detectarse la cantidad de marcador unido sobre el soporte sólido mediante etapas de método conocidas.

40 Las enzimas unidas que reaccionan con un sustrato expuesto pueden usarse para generar un residuo químico que puede detectarse, por ejemplo, por medios espectrofotométricos, fluorométricos o visuales, en el contexto de un conjugado y/o proteína de fusión de CD38BP. Las enzimas que pueden usarse para marcar de manera detectable los CD38BP tales como anticuerpos anti-CD38 incluyen malato deshidrogenasa, nucleasa estafilocócica, delta-5-esteroides isomerasa, alcohol deshidrogenasa de levadura, alfa-glicerofosfato deshidrogenasa, triosa fosfato isomerasa, peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, asparaginasa, glucosa oxidasa, beta-galactosidasa, ribonucleasa, ureasa, catalasa, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, glucoamilasa, y acetilcolinesterasa. También es posible marcar un CD38BP, tal como un anticuerpo de CD38, con un compuesto fluorescente. Cuando el anticuerpo marcado fluorescentemente se expone a luz con la longitud de onda adecuada, puede detectarse su presencia  
50 debido a la fluorescencia. Entre los compuestos para marcaje fluorescente más comúnmente usados se encuentran el isotiocianato de fluoresceína, rodamina, ficeeritrina, ficocianina, alofococianina, o-ftalaldehído, y fluorescamina.

Los CD38BP, tales como anticuerpos anti-CD38, también pueden marcarse de manera detectable usando metales emisores de fluorescencia, tales como  $^{152}\text{Eu}$ , u otros de la serie de los lantánidos. Estos metales pueden unirse a un anticuerpo anti-CD38, por ejemplo, usando grupos quelantes metálicos, tales como ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA) o ácido etilendiaminotetraacético (EDTA).

Los CD38BP, tales como los anticuerpos anti-CD38, también pueden marcarse de manera detectable mediante acoplamiento a un compuesto quimioluminiscente. La presencia del CD38BP marcado quimioluminiscentemente se determina entonces detectando la presencia de luminiscencia que surge durante el transcurso de una reacción química. Los ejemplos de compuestos de marcaje quimioluminiscente particularmente útiles son luminol, isoluminol, éster de acridinio teromático, imidazol, sal de acridinio, y éster de oxalato.

Del mismo modo, puede usarse un compuesto bioluminiscente para marcar un CD38BP. La bioluminiscencia es un tipo de quimioluminiscencia hallada en sistemas biológicos en los que una proteína catalítica aumenta la eficacia de la reacción quimioluminiscente. La presencia de una proteína bioluminiscente se determina detectando la presencia

de luminiscencia. Los compuestos luminiscentes importantes para fines de marcaje son luciferina, luciferasa, y aequorina.

5 La detección de un péptido o anticuerpo marcado, fragmento de anticuerpo o derivado puede lograrse mediante un contador de centelleo, por ejemplo, si el marcador detectable es un emisor gamma radiactivo, o mediante un fluorímetro, por ejemplo, si el marcador es un material fluorescente. En el caso de un marcador enzimático, puede lograrse la detección mediante métodos colorimétricos que emplean un sustrato para la enzima. La detección también puede lograrse mediante comparación visual del alcance de la reacción enzimática de un sustrato en comparación con patrones preparados de manera similar.

10 Estas y otras técnicas diagnósticas pueden usarse para explorar cualquier material adecuado para péptidos de CD38 o fragmentos de CD38. Los ejemplos de materiales que pueden explorarse incluyen, por ejemplo, sangre, suero, células linfoides, orina, exudado inflamatorio, líquido cefalorraquídeo, fluido amniótico, un extracto u homogenizado de tejido, y similares. Sin embargo, la presente divulgación no se limita a ensayos que usan únicamente estas muestras, siendo posible para un experto habitual en la materia determinar condiciones adecuadas que permiten el uso de otras muestras.

15 La detección *in situ* puede lograrse retirando un espécimen histológico de un paciente, y proporcionando la combinación de CD38BP marcados, tales como anticuerpos anti-CD38, de la presente invención para dicho espécimen. El CD38BP, anticuerpo anti-CD38 (incluyendo fragmento) de la presente invención pueden proporcionarse aplicando o recubriendo el CD38BP marcado, tal como un anticuerpo anti-CD38 marcado, de la presente invención a una muestra biológica. Mediante el uso de dicho procedimiento, es posible determinar no solo la presencia de CD38 o fragmentos de CD38, sino también la distribución de dichos péptidos en el tejido examinado (por ejemplo, en el contexto de evaluar la diseminación de células de cáncer). Usando la presente invención, los expertos habituales en la materia percibirán fácilmente que puede modificarse cualquiera de una gran variedad de métodos histológicos (tales como procedimientos de tinción) para lograr dicha detección *in situ*.

20 La presente invención incluye además métodos para promover la venta y/o el uso de un CD38BP tal como se describe en el presente documento que comprende distribuir información (tal como mediante materiales impresos que se entregan en mano, se envían por correo, etc., mediante carteles publicitarios, mediante programas y anuncios televisados, mediante programas y anuncios emitidos por radio, mediante publicaciones en sitios de internet, por correo electrónico, por telemarketing, o mediante marketing a puerta fría o entre personas, financiando y/o elaborando conferencias, paneles, foros, etc., empleando y/o contratando los servicios de comerciales y/o enlaces médicos/científicos, financiando y/o albergando investigación científica y publicaciones científicas relacionadas con dichos usos, etc.) relacionados con el uso del compuesto en la prevención o tratamiento de cualquier condición o combinación de condiciones como se describen en otras partes del presente documento a cualquier persona o entidad de potencial interés (tales como cadenas de farmacias, gerentes de formulación, compañías aseguradas, HMO, hospitales y cadenas de hospitales, otras compañías para el cuidado de la salud, gerentes de beneficios farmacéuticos, pacientes potenciales, pacientes de cáncer, ex-pacientes de cáncer, pacientes en remisión, médicos de atención primaria, enfermeras, farmacéuticos, y/o líderes de opinión clave).

25 La presente divulgación también incluye kits que comprenden una composición farmacéutica de un compuesto de la presente invención e instrucciones de uso. El kit puede contener además uno o más agentes adicionales, tales como un reactivo inmunosupresor, un agente quimioterapéutico, un agente antiinflamatorio o un agente radiotóxico, tal como se ha descrito anteriormente, o uno o más CD38BP adicionales tal como se describen en el presente documento (tal como un CD38BP que tiene una actividad complementaria). Como se describe en el presente documento, un kit incluye también agentes diagnósticos y/u otros agentes terapéuticos. En una realización, un kit incluye un CD38BP tal como se describe en el presente documento y un agente diagnóstico que puede usarse en un método diagnóstico para diagnosticar el estado o la existencia de un trastorno que implica células que expresan CD38 en un sujeto. En una realización, el kit incluye un CD38BP tal como se describe en el presente documento en una forma altamente estable (tal como en una forma liofilizada) en combinación con vehículos farmacéuticamente aceptables que pueden mezclarse con la composición altamente estable para formar una composición inyectable.

30 Todos los títulos y subtítulos se usan en el presente documento solo por conveniencia y no deben interpretarse como limitantes de la presente invención en modo alguno.

35 El uso de los términos "un", "una" y "el" o "la" y referentes similares en el contexto de la descripción de la presente invención deben interpretarse como inclusivos tanto del singular como del plural, a menos que se indique de otra forma en el presente documento o se contradiga claramente por el contexto.

40 La lectura de los intervalos de valores del presente documento está destinada simplemente para servir como un método taquigráfico para referirse de forma individual a cada valor separado que esté dentro del intervalo, a menos que se especifique lo contrario en el presente documento, y se incorpore cada valor separado dentro de la especificación como si se leyera de forma individual en el presente documento. A menos que se indique lo contrario, todos los valores exactos proporcionados en el presente documento son representativos de los valores aproximados correspondientes (por ejemplo, puede considerarse que todos los valores ejemplares exactos proporcionados

respecto de un factor o medición particular también proporcionan una medición aproximada correspondiente, modificada por "aproximadamente", según sea adecuado).

5 Todos los métodos descritos en el presente documento pueden interpretarse en cualquier orden adecuado a menos que se indique de otra forma en el presente documento o se contradiga claramente por el contexto de otra forma.

10 El uso de cualquiera y de todos los ejemplos, o lenguaje ejemplar (por ejemplo, "tal como") proporcionado en el presente documento, solo pretende ilustrar mejor la presente invención y no impone una limitación al alcance de la presente invención, a menos que se indique otra cosa. Ninguna expresión en la memoria descriptiva debe interpretarse como indicativa de que cualquier elemento sea esencial para la práctica de la presente invención, a menos que esto se indique de manera explícita.

15 La citación e incorporación de documentos de patente en el presente documento se efectúa solo por conveniencia y no refleja ninguna visión sobre la validez, patentabilidad, y/o imponentabilidad de dichos documentos de patente.

20 La descripción en el presente documento de cualquier realización de la presente invención usando términos tales como "que comprende", "que tiene", "que incluye" o "que contiene" con referencia a un elemento o elementos pretende proporcionar soporte para una realización similar de la presente invención que "consiste en", "consiste esencialmente en", o "comprende sustancialmente" ese elemento o elementos particulares, a menos que se afirme lo contrario o se contradiga claramente a partir del contexto (por ejemplo, una composición descrita en el presente documento por que comprende un elemento particular debe entenderse también como descriptiva de una composición que consiste en ese elemento, a menos que se afirme lo contrario o se contradiga claramente a partir del contexto).

25 La presente invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos que no deben interpretarse como adicionalmente limitantes.

## Ejemplos

### 30 EJEMPLO 1

#### Producción de células (Daudi-luc) transfectadas con luciferasa

35 Se cultivó un cultivo de células Daudi (originarias de linfoma de Burkitt) en medio de cultivo RPMI 1640 complementado con FCS al 10% (Optimum C241, Wisent Inc., St. Bruno, QC, Canadá), L-glutamina 2 mM, penicilina 100 UI/ml, 100 mg/ml de estreptomina, piruvato sódico 1 mM (todos procedentes de Gibco BRL, Life Technologies, Paisley, Escocia). El medio se refrescó dos veces a la semana. Antes de la transfección, se separaron las células y se sembraron a  $1-1,5 \times 10^6$  células/ml para asegurar la viabilidad y crecimiento óptimo.

#### 40 Transfección de luciferasa

45 Se recogieron  $8,2 \times 10^6$  células Daudi CD3<sup>8+</sup> en 350 µl de RPMI (complementado con dFCS al 10%, Gibco BRL) y se transfirieron a una cubeta de electroporación (Biorad, Hemel Hempstead, Herts, R.U.). Después, se añadieron 40 µg de gWIZ luciferasa de GTS (Aldevron, Fargo, ND, EE.UU.) y 10 µg de vector pPur (BD Biosciences, Alphen a/d Rijn, Países Bajos), que confieren resistencia a puromicina. Después de dejar reposar las células sobre hielo durante 10 minutos, se electroporaron las células (250 V, 950 µF; Gene Pulser II, Biorad Laboratories GmbH, München, Alemania). De nuevo, se dejaron reposar las células sobre hielo, y se recogieron en 40 ml de RPMI (complementado con FCS al 10%). Después, las células se emplacaron en placas de cultivo tisular de 96 pocillos (100 µl por pocillo). Después de 48 horas, se añadió puromicina (concentración final: 1 µg/ml; Sigma-Aldrich Chemie BV, Zwijndrecht, Países Bajos). Los clones resistentes a puromicina se cultivaron adicionalmente en placas de cultivo tisular de 24 pocillos.

#### Determinación de la actividad de luciferasa

55 La actividad de luciferasa de las células se determinó usando el sistema de ensayo de luciferasa (n.º E4030, Promega, Madison, WI, EE.UU.). Se centrifugaron  $1 \times 10^5$  células (13.500 rpm, 1 min) en una centrifugadora Eppendorf, y se lavó el sedimento en 100 ml de PBS. Después de la centrifugación (13.500 rpm, 1 min), se lisó el sedimento con 20 ml de tampón de lisis indicador (Promega), se congeló y se descongeló. Después de la centrifugación (13.500 rpm, 1 min), se desecharon 20 µl de sobrenadante, y se añadieron 100 µl de reactivo de ensayo de luciferasa (es tubos de luminómetro especiales, Promega). La luminiscencia se midió (10 s) en un luminómetro (LB9507, Berthold, Vilvoorde, Bélgica).

### EJEMPLO 2

65 Inmunización de ratones y generación de hibridomas

Protocolo de inmunización para -003

Se inmunizaron ratones HCo12 cada quince días con 20 µg de HA-CD38 purificado. La primera inmunización se efectuó por vía i.p. en presencia de 100 µl de PBS, mezclados con 100 µl de adyuvante completo de Freund (CFA).  
 5 Después de esta primera inmunización, se efectuaron refuerzos posteriores (13x) con HA-CD38 purificado en presencia de 100 µl de PBS, mezclado con 100 µl de adyuvante incompleto de Freund (IFA) alternando s.c. con i.p. Después de revelar el título, se reforzó a los ratones con 20 µg de HA-CD38 en PBS, i.v.

Protocolo de inmunización para -005 y -024

10 Se inmunizó a ratones HCo12 cada quince días con 20 µg de HA-CD38 purificado alternando con células transfectadas con NIH-3T3-CD38. La primera inmunización se efectuó con  $5 \times 10^6$  células en 100 µl de PBS, mezclados con 100 µl de CFA, i.p., las inmunizaciones segunda y posteriores con HA-CD38 s.c., en presencia de 100 µl de PBS, mezclado con 100 µl de IFA. Las siguientes inmunizaciones con células transfectadas se efectuaron en presencia de 200 µl de PBS. Después de revelar el título, se reforzó a los ratones con 20 µg de HA-CD38 en PBS, i.v.

Generación de hibridomas que producen anticuerpos monoclonales humanos para CD38

20 Se aislaron esplenocitos de ratón de ratones HCo12 y se fusionaron con PEG a una línea celular de mieloma de ratón basándose en protocolos convencionales. Después, se exploraron los hibridomas resultantes respecto de la producción de anticuerpo humano mediante ELISA y respecto de la especificidad para CD38 usando células NS/0 transfectadas con CD38 humano mediante análisis FACS y unión de proteína recombinante HA-CD38 mediante ELISA. Se seleccionaron tres líneas celulares de hibridoma que expresan los anticuerpos monoclonales humanos anti-CD38, -003, -005 y -024, respectivamente.

**EJEMPLO 3**Transfección de células NIH con CD38

30 El vector (pCIPuroCD38) para producir células NIH-3T3-CD38 se obtuvo a través del Prof. M. Glennie (Tenovus Research Laboratory, Southampton General Hospital, Southampton, R.U.). Las células NIH-3T3 (DSMZ, ACC 59; 150.000 células/pocillo; 0,5 ml; placas de 96 pocillos de fondo plano, Greiner) se cultivaron en DMEM (complementado con glucosa [4,5 g/l], FCS al 10%, L-glutamina, piruvato de Na; BioWhittaker) durante 24 h.  
 35 Después, ADN (0,8 µg) y lipofectamina (Invitrogen, Breda, Países Bajos) se diluyeron en DMEM, y se mezclaron (20 min, TA). A continuación, la mezcla (100 µl) se añadió a cada pocillo y se incubó (ON, 37°C).

Exploración respecto de la expresión de CD38

40 Las células NIH-3T3-CD38 se lavaron (en 1 ml de PBS) y se tripsinizaron (200 µl, tripsina-EDTA, BioWhittaker). Después, se añadió 1 ml de DMEM y se pipeteó la muestra en tubos de FACS. Después de la centrifugación (1200 rpm, 5 min), las células se lavaron en tampón de FACS (FB; PBS, BSA al 0,05%, Na<sub>3</sub> al 0,02%) y se resuspendieron en 1 ml de FB. Después de la centrifugación (1200 rpm, 5 min), se retiró el sobrenadante y se añadió anti-CD38 humano-PE (dilución 1/50, Sanquin, Amsterdam, Países Bajos). Después de lavar las células dos veces en FB, se resuspendieron las células en FB para su adquisición mediante citometría de flujo.

Expansión y selección

50 Después del tratamiento con tripsina, se transfirieron las células a matraces T25 (Greiner) en DMEM (complementado con 4,5 g/l de glucosa, L-glutamina 2 mM, y puromicina (2 µg/ml) BioWhittaker). Las células resistentes a puromicina se ensayaron respecto de expresión estable de CD38 mediante citometría de flujo después de dos semanas en medio que contenía puromicina. Las células NIH-3T3-CD38 seleccionadas se subclonaron mediante dilución limitante. Después de expandir estas células, los 15 clones de NIH-3T3-CD38 se exploraron respecto de su expresión de CD38. Las células NIH-3T3-CD38 CD38high se congelaron en nitrógeno líquido (-80°C) hasta su uso.

Cultivo de células NIH-3T3-CD38

60 Las células se cultivaron en DMEM (complementado con glucosa (4,5 g/l), FCS al 10%, L-glutamina 2 mM, piruvato de Na, penicilina, estreptomina). Las células se pasaron dos veces a la semana mediante el uso de tripsina/EDTA y se sembraron a una concentración de  $1 \times 10^6$  células/matraz T75. Las células NIH-3T3-CD38 CD38high se congelaron en nitrógeno líquido (-80°C) hasta su uso.

Purificación de antígeno HA-CD38

65 Se acopló sefaroza 4B (Amersham Bioscience, Uppsala, Suecia) con anticuerpo anti-CD38 (Serotec, Oxford, R.U.).

La columna (el tubo de columna HR5/20 se empaquetó con 12 cm de altura de lecho, volumen de columna de 2,4 ml; caudal máximo 0,5 ml/min) se equilibro con al menos 5 volúmenes de columna (VC) de PBS. La muestra se filtró y se cargó en la columna. La columna se lavó con PBS hasta que la señal volvió a la basal (aproximadamente 3 VC). La elución se llevó a cabo con glicina 0,1 M a pH 2. Las fracciones eluidas se neutralizaron con Tris-HCl al 1 % (v/v) 2 M, pH 9.

Purificación de anticuerpos anti-CD38

Se purificaron anticuerpos anti-CD38 humanos a partir de los sobrenadantes de cultivos de tejidos. En primer lugar, se filtraron los sobrenadantes en un filtro sin salida de 0,20 µM. Después, se cargó el sobrenadante en una columna de proteína A de 5 ml (rProtein A FF, Amersham Bioscience) y se eluyó con ácido cítrico-NaOH 0,1 M, pH 3. El eluato se neutralizó inmediatamente con Tris-HCl 2 M, pH 9 y se dializó O/N con fosfato sódico 12,6 mM, NaCl 140 mM, pH 7,4 (B. Braun, Oss, Países Bajos). Después de la diálisis, las muestras se esterilizaron por filtración sobre un filtro sin salida de 0,20 µM.

Purificación de lotes de His-CD38

La proteína está presente en el sobrenadante de cultivo tisular de células que expresan His-CD38, con una construcción de ADN que contiene la secuencia para el dominio extracelular de CD38. Se incluye una secuencia marcadora de poli-His adicional en las construcciones y se presenta en el extremo N-terminal de la proteína. Este marcador permite la purificación con cromatografía de afinidad de metal inmovilizado. En este proceso, se carga un quelante fijado sobre la resina cromatográfica con cationes Co<sup>2+</sup>. En particular, una secuencia que incluye 6 aminoácidos de histidina se une fuertemente a Co<sup>2+</sup>. Por lo tanto, las proteínas CD38 marcadas con His se unen fuertemente a dicha columna, mientras que otras proteínas presentes en los sobrenadantes de cultivo fluirán a través de la columna o se eliminarán por lavado. Las proteínas CD38 marcadas con His fuertemente unidas se eluyen después con un tampón que contiene imidazol, que compite con la unión de His a Co<sup>2+</sup>. Cuando se ha purificado suficiente His-CD38, se retira el eluyente de la proteína mediante intercambio de tampón en una columna de desalado.

**EJEMPLO 4**

Unión de -003, -005, y -024 a células CHO transfectadas con CD38 (CHO-CD38), a células Daudi-luc y a células tumorales de mieloma múltiple (MM) recientes

Después de cosechar y contar, las células Daudi-luc, las células CHO transfectadas con CD38 y las células de control CHO se resuspendieron en PBS (1 x 10<sup>6</sup> células/ml). Después, las células se colocaron en placas de fondo en V de 96 pocillos (100 µl/pocillo) y se lavaron dos veces en PBS-BSA (PBS complementado con BSA al 0,1 % y azida de Na al 0,02%). A continuación, se añadieron 50 µl de solución de anticuerpo en PBS-BSA a las células (4°C, 30 min). Después de lavar tres veces en PBS-BSA, se añadieron 50 µl (dilución 1:400) de anti-IgG humana-FITC de conejo en PBS-BSA (4°C en la oscuridad, 30 min). Las células se lavaron tres veces y se detectó la unión específica de anticuerpos para CD38 a células CHO-CD38 y Daudi-luc mediante citometría de flujo. HuMab-KLH (un anticuerpo monoclonal humano contra KLH (hemocianina de lapa californiana) generado por Genmab B.V., Utrecht, Países Bajos mediante el uso de los protocolos de inmunización descritos en otras partes del presente documento) se usaron como control. Las figuras 1 y 2 muestran que -003, -005, y -024 se unen a células CHO-CD38 y a células Daudi-luc, aunque con diferentes CE<sub>50</sub> (Tabla 1). No se observa unión a células CHO de control (datos no mostrados).

Se obtuvieron células tumorales de MM frescas del Dr. Lokhorst (University Medical Center Utrecht, Utrecht, Países Bajos). Las células tumorales se aislaron de médula ósea de pacientes de mieloma múltiple mediante gradiente de centrifugación Ficoll (Bio Whittaker; medio de separación de linfocitos, n.º de cat. 17-829E). Después de cosechar y contar, las células MM (100.000 células/pocillo) se resuspendieron con 25 µl de anticuerpos específicos para CD38 marcados con FITC y 25 µl de CD138. Después de la incubación (4°C, 30 min), las células se lavaron en PBS-BSA y se añadió IgG de cabra anti-ratón marcada con PE (1:200; Jackson ImmunoResearch Europe Ltd. Soham, R.U.). Después de la incubación (4°C, 30 min) y lavado de las células en PBS-BSA, se midió la fluorescencia mediante citometría de flujo.

La figura 3 muestra que -003, -005 y -024 se unen a células de MM.

**Tabla 1 - Valores de CE<sub>50</sub> de la unión de anticuerpos anti-CD38 en células CHO-CD38, células Daudi-luc y células tumorales de MM recientes.**

Anticuerpos específicos para CD38	CE <sub>50</sub> de CHO-CD38 (µg/ml)	CE <sub>50</sub> de Daudi-luc (µg/ml)	CE <sub>50</sub> de células MM (µg/ml)
-003	0,54	0,26	0,56
-005	0,23	0,09	0,04
-024	0,08	0,05	0,02

**EJEMPLO 5**5 Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo

Las células Daudi-luc, células tumorales de mieloma múltiple recientes, células tumorales de leucemia de células plasmáticas recientes y células de mieloma múltiple JK6L y AMO-1 se recogieron ( $5 \times 10^6$  células) en RPMI<sup>++</sup> (medio de cultivo RPMI 1640 complementado con suero cósmico de ternero al 10% (HyClone, Logan, UT, EE.UU.)), a las que se añadieron 100  $\mu$ Ci de <sup>51</sup>Cr (Cromo-51; Amersham Biosciences Europe GmbH, Roosendaal, Países Bajos), y la mezcla se incubó en un baño de agua a 37°C durante 1 h. Después de lavar las células (dos veces en PBS, 1500 rpm, 5 min), las células se resuspendieron en RPMI<sup>++</sup> y se contaron mediante exclusión de azul de tripano. Las células se enrasaron a una concentración de  $1 \times 10^5$  células/ml.

15 Preparación de células efectoras

Las células mononucleares de sangre periférica (voluntarios sanos, UMC Utrecht, Utrecht, Países Bajos) se aislaron a partir de 40 ml de sangre heparinizada mediante Ficoll (Bio Whittaker; medio de separación de linfocitos, n.º de cat 17-829E) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Después de resuspender las células en RPMI<sup>++</sup>, las células se contaron mediante exclusión de azul de tripano y se enrasaron a una concentración de  $1 \times 10^7$  células/ml.

Configuración de ADCC

Se pipetearon 50  $\mu$ l de células diana marcadas con <sup>51</sup>Cr en placas de 96 pocillos, y se añadieron 50  $\mu$ l de anticuerpo, diluido en RPMI<sup>++</sup> (concentraciones finales 10, 1, 0,1, 0,01  $\mu$ g/ml). Las células se incubaron (TA, 15 min), y se añadieron 50  $\mu$ l de células efectoras, dando una relación de efector a diana de 100:1 (para la determinación de la lisis máxima, se añadieron 100  $\mu$ l de Triton-X100 al 5% en lugar de células efectoras; para la determinación de la lisis espontánea, se usaron 50  $\mu$ l de células diana y 100  $\mu$ l de RPMI<sup>++</sup>). Las células se centrifugaron (500 rpm, 5 min), y se incubaron (37°C, CO<sub>2</sub> al 5%, 4 h). Después de centrifugar las células (1500 rpm, 5 min), se recogieron 100  $\mu$ l de sobrenadante en tubos micrónicos, y se contaron en un contador gamma. El porcentaje de lisis específica se calculó del modo siguiente:

$$(cpm \text{ muestra} - cpm \text{ solo células diana}) / (cpm \text{ lisis máxima} - cpm \text{ solo células diana})$$

35 en donde cpm es las cuentas por minuto.

En células Daudi-luc (Figura 4 y Tabla 2) -003, -005, y -024 inducen lisis mediante ADCC, y -003, y -005 funcionan ligeramente mejor que rituximab (mAb anti-CD20). Interesantemente, también cuando se usaron células tumorales de mieloma múltiple (obtenidas del Dr. H. Lokhorst, UMCU, Países Bajos) como células diana, La ADCC se induce por -003, -005 y -024 (Figura 5A y Tabla 2).

**Tabla 2 - Valores de CE<sub>50</sub> de anticuerpos específicos para CD38 obtenidos en la ADCC**

Anticuerpos específicos para CD38	CE <sub>50</sub> de Daudi-luc (ng/ml)	CE <sub>50</sub> de células MM (ng/ml)
-003	9,0	27
-005	4,5	5,7
-024	9,7	56

Enriquecimiento de células morfonucleares de sangre periférica Erlangen

45 La sangre de voluntarios humanos sanos (universidad de Erlangen, Erlangen, Alemania) se diluyó dos veces en RPMI 1640 y los glóbulos rojos se dispusieron en capas sobre Ficoll (medio de separación de linfocitos, 1077 g/ml, 710 g, TA, 20 min; BioWhittaker, Cambrex Bio Science Verviers, Verviers, Bélgica, n.º de cat. 17-829E, n.º de lote 0148 32). Se recogieron células mononucleares de sangre periférica (MNC) de la interfase, se lavaron y se resuspendieron en medio de cultivo RPMI 1640 complementado con FCS al 10%, L-glutamina 2 mM, 5 U/ml de penicilina, estreptomina 50  $\mu$ g/ml (todos de BioWhittaker) a los que se añadió HEPES 25 mM.

Configuración de ADCC II

55 Las células B diana (células tumorales de leucemia de células plasmáticas recientes, líneas de células B JK6L y AMO-1, obtenidas del Dr. T. Valerius, University of Erlangen, Erlangen, Alemania) se marcaron con 20  $\mu$ Ci de <sup>51</sup>Cr (Amersham Biosciences, Uppsala, Suecia) durante 2 horas. Después de un lavado exhaustivo en RPMI-10, las células se ajustaron a  $1 \times 10^5$  células/ml. Se añadieron MNC (50  $\mu$ l), anticuerpos sensibilizantes (50  $\mu$ l), y RPMI-10 (50  $\mu$ l) a placas de microtitulación de fondo redondo (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Alemania). Los ensayos se iniciaron añadiendo células tumorales de leucemia de células plasmáticas recientes, células JK6L o AMO-1 (50  $\mu$ l) dando un volumen final de 200  $\mu$ l. Se usó una relación de efector a diana (E:T) de 40:1. Después de la incubación (3

h, 37°C), los ensayos se detuvieron mediante centrifugación, y se midió la liberación de  $^{51}\text{Cr}$  por triplicado en cuentas por minuto (cpm) en un contador de centelleo. Se calculó el porcentaje de citotoxicidad celular usando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de lisis específica} = (\text{cpm experimentales} - \text{cpm basales}) / (\text{cpm máximas} - \text{cpm basales}) \times 100$$

5 determinándose la liberación máxima de  $^{51}\text{Cr}$  añadiendo ácido perclórico (concentración final del 3%) a las células diana, y la liberación basal se midió en ausencia de anticuerpos sensibilizantes y células efectoras.

10 En ambas líneas celulares de mieloma múltiple (es decir, JK6L y AMO-1), se induce la lisis tanto por -003 como por -005 (Figuras 6 y 7), incluso cuando la expresión de CD38 es baja (línea celular AMO-1).

-003, -005 y -024 inducen ADCC de células tumorales de leucemia primaria de células plasmáticas (Figura 5B).

## 15 EJEMPLO 6

### Citotoxicidad dependiente de complemento

20 Después de recoger y contar células Daudi-luc, la viabilidad de las células debería ser  $\leq 90\%$ . Después del lavado (PBS), las células se suspenden a  $2,0 \times 10^6$  células/ml en RPMI-B (RPMI complementado con RMI al 1%). A continuación, las células se cloran en una placa de cultivo tisular de 96 pocillos de fondo redondo a  $1 \times 10^5$  células/pocillo (50  $\mu\text{l}$ /pocillo). Después, se añaden 50  $\mu\text{l}$  de anticuerpos a los pocillos (intervalo de concentración final entre 0-100  $\mu\text{g/ml}$  (diluciones de factor tres de RPMI-B)). Después de la incubación TA, 15 min), se añadieron 11  $\mu\text{l}$  se suero humano agrupado (agrupación de 18 donantes sanos) a cada pocillo (37°C, 45 min). Los pocillos se resuspendieron una vez y se transfirieron 120  $\mu\text{l}$  a tubos FACS (Greiner). Después, se añadieron 10  $\mu\text{l}$  de yorodor de propidio (PI; Sigma-Aldrich Chemie B.V.) (solución a 10  $\mu\text{g/ml}$ ) a esta suspensión. La lisis se detectó mediante citometría de flujo (FACScalibur™, Becton Dickinson, San Diego, CA, EE.UU.) midiendo el porcentaje de células muertas (correspondientes a células positivas a PI).

30 La Figura 8 y la Tabla 2 muestran que la lisis de células Daudi-luc se introduce mediante -005 (~60% de lisis máxima) y que la lisis por -003 solo se observa a elevadas concentraciones de anticuerpo. -024 no induce CDC en células Daudi (datos no mostrados). En células CHO-CD38, la lisis se induce tanto por -003, -005, como por -024 (Figura 9 y la Tabla 3). La lisis por -003 se induce a concentraciones mayores. En células tumorales (todas ellas obtenidas del Dr. Lokhosrt y el Dr. Bloem, University Medical Center Utrecht, Países Bajos), obtenidas de diferentes pacientes de MM (A: 3% de células tumorales refractarias, B: 9% de células tumorales refractarias, C: 30-40% de células tumorales, y D: 70% de células tumorales), la lisis mediada por CDC se observa en presencia de -005, pero no en presencia de -003 (Figura 10). -024 también induce lisis en células tumorales de MM (Figura 10E).

**Tabla 3 - Valores de  $CE_{50}$  de anticuerpos específicos para CD38 obtenidos en la CDC**

Anticuerpos específicos para CD38	$CE_{50}$ de Daudi-luc ( $\mu\text{g/ml}$ )	$CE_{50}$ de CD38-CHO (mg/ml)
-003	>90	3,14
-005	0,33	0,14
-024	>90	0,24

## 40 EJEMPLO 7

### Estudios de bloqueo cruzado usando FACS

45 Se incubaron células CHO-CD38 con un exceso de anticuerpo específico para CD38 (4°C, 15 min). Después, las células incubadas con anticuerpos específicos para CD38 marcados con FITC (la concentración se aproxima a la  $CE_{90}$ , 4°C, 45 min). Después de lavar las células con PBS-BSA, se midió la fluorescencia mediante citometría de flujo. La figura 11 muestra que -003 no marcada bloquea la unión de -003 marcado con Fitc, mientras que no se bloquea la unión de FITC-vanil de -005. Asimismo, -005 no marcado bloquea la unión de -005 marcado con FITC, mientras que no se bloquea la unión de FITC-vanil de -003. -003 y -005 se unen a diferentes epitopos, debido a que no compiten por la unión.

## 55 EJEMPLO 8

### Estudios de bloqueo cruzado usando ELISA

60 Se recubre CD38 humano soluble sobre la superficie de una placa de ELISA. El CD38 recubierto se incubaba con un exceso de anticuerpos específicos para CD38 no marcados durante aproximadamente 15 minutos y posteriormente se añaden anticuerpos específicos anti-CD38 (concentración aproximada a la  $CE_{90}$ , TA, 1 hora). Después de lavar tres veces con PBS/Tween, se añade estreptavidina conjugada a peroxidasa de rábano picante y se incubaba la mezcla durante 1 hora a TA. El complejo puede detectarse mediante la adición de una solución de ABTS y la conversión del sustrato mediada por ELISA se mide usando un lector de ELISA a una DO de 405 nm.

**EJEMPLO 9**Estudios de bloqueo cruzado usando ELISA sándwich

5 Los anticuerpos específicos para CD38 se recubren sobre la superficie de una placa de ELISA. Los anticuerpos unidos a la placa se incuban con CD38 soluble biotinilado en presencia de un exceso de anticuerpos específicos para CD38 en fase fluida. Después de lavar con PBS/Tween, el CD38 biotinilado unido se detecta con estreptavidina conjugada a HRP durante 1 h a TA. Este complejo puede detectarse mediante la adición de una solución de ABTS (después de lavar con PBS/Tween) y la conversión del sustrato mediada por ELISA se mide usando un lector de ELISA a una DO de 405 nm.

**EJEMPLO 10**15 Reactividad cruzada con un panel de tejidos humanos y reactividad cruzada con tejido de macaco mediante inmunohistoquímica

Secciones de tejido humano congelado (obtenidas del Dr. H. Niessen, Free University Medical Center, Amsterdam, Países Bajos) o de tejido de mono (Inveresk Research, Glasgow, Escocia) se cortaron a 6 µm y se secaron al aire durante una noche. Estas secciones criogenizadas se fijaron en acetona (TA, 10 min) y se secaron al aire (aprox. 5 min). A continuación, las secciones se incubaron con un tampón de ácido cítrico 1x/fosfato que contiene H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 0,1 % (pH 5,8; Sigma), para bloquear la peroxidasa endógena. Después de 20 min a TA, las secciones se lavaron dos veces con PBS y Tween-20 al 0,05% (PBST, TA, 5 min; Riedel de-Haen, Alemania). Después, las secciones se incubaron con avidina (TA, 15 min; DAKO, Glostrup, Dinamarca), se lavaron dos veces con PBST, y se incubaron con biotina (TA, 15 min; DAKO) para bloquear la biotina endógena. Después de lavar las secciones dos veces con PBST, se preincubaron las secciones con PBST<sup>++</sup> (PBST complementado con suero humano normal al 10% (NHS, CLB, Amsterdam, Países Bajos) y suero de cabra normal al 10% (NGS; DAKO) (TA, 20 min). Después de transferir el suero de pre-incubación, las secciones se incubaron con anticuerpo primario marcado con FITC diluido en PBST<sup>++</sup> al 2% a las concentraciones indicadas (TA, 60 min). A continuación, las secciones se incubaron con anti-FITC de conejo (1:1000; DAKO) en PBST<sup>++</sup> al 2% (TA, 30 min). Después de lavar las secciones con PBST, las secciones se incubaron con anticuerpo de cabra anti-conejo-biotina (1:400; DAKO) en PBST<sup>++</sup> al 2% (TA, 30 min). Después, las secciones se lavaron e incubaron con SABC-HRP (1:100; DAKO) en PBST<sup>++</sup> al 2% (TA, 30 min). Después de lavar las secciones dos veces en PBST, se incubaron (TA, 10 min) con solución de revelado de amino-etil-carbazol (AEC) (tampón acetato 50 mM, pH4.9, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 0,01%; Riedel-de-Haen). Finalmente, las secciones se lavaron en H<sub>2</sub>O Millipore (5 min) u se contratiéron con hematoxilina (DAKO). Mediante el uso de glicergel (37°C), las secciones se fijaron con cubreobjetos, y se estudiaron mediante microscopía óptica (Axiovision-2; Zeiss, Thornwood, NY, EE.UU.).

El epitelio bronquial se tiñe con -003 y -005 (Figuras 12B a 13B) así como el músculo estriado (miocitos, Figuras 12C y 13C), macrófagos, linfocitos y células B plasmáticas (Figuras 12A y 13A). -024 tiene una tinción similar del músculo estriado y del epitelio bronquial, pero la tinción fue menos intensa. No se observó tinción de las células endoteliales, ni con -003 (Fig. 14D), -005 (14E) ni con -024 (datos no mostrados), aunque se observó coloración lineal con los anticuerpos de control positivos contra los marcadores de células endoteliales CD38 (Fig. 14A) y el vWf (14B). Se usó anti-KLH como anticuerpo de control negativo (Fig. 14C). -003 (Figura 12D) y -024 (datos no mostrados) pero no -005 (Figura 13D) reaccionan de manera cruzada con tejido linfóide de macaco.

**EJEMPLO 11**Reactividad cruzada con células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de macaco o rhesus mediante citometría de flujo

50 Se lisaron 5 ml de sangre periférica de macaco (Inveresk Research) añadiendo 4,5 ml de tampón de choque (NH<sub>4</sub>Cl 1,7 mM, EDTA 1 mM), 40 ml de H<sub>2</sub>O y 450 µl de KHCO<sub>3</sub> al 10%. Después de la hemólisis, las células se centrifugaron (1200 rpm, 10 min) y se lavaron tres veces en PBS. Después de contar las células con azul de tripano, las células se resuspendieron en PBS-BSA (1x10<sup>6</sup> células/ml).

55 17,5 ml de sangre periférica de mono rhesus (BPRC, Rijswijk, Países Bajos) se diluyeron a 1:1 con RPMI 1640 y se dispusieron en capas sobre Ficoll (1,077 g/ml; BioWhittaker, n.º de cat. 17-829E, n.º de lote 0148 32). Después de la centrifugación (710 g, TA, 20 min), la interfase se recogió y se lavó dos veces en RPMI. Después del lavado, las células se resuspendieron en RPMI 1640 a una concentración de 1x10<sup>5</sup> células/50 µl.

60 Las células se transfirieron a una placa de 96 pocillos (100.000 PBMC/pocillo), se lavaron en tampón FACS (PBS, BSA al 0,05%, NaN<sub>3</sub> al 0,02%) y se incubaron con los anticuerpos primarios (4°C, 30 min). Después de lavar en PBS-BSA, se añadieron 50 µl de rb-anti-hIgG marcada con FITC (DAKO, Glostrup, Dinamarca) (4°C, 30 min). Finalmente, las células se recogieron en tubos para FACS en un volumen de 150 µl. Las muestras se midieron y analizaron mediante el uso de FACScalibur™ (Becton Dickinson, San Diego, CA, EE.UU.).

65

Con citometría de flujo, se mostró la reactividad cruzada de -003 en linfocitos (Figura 15A) y monocitos (Figura 15B) de macaco, pero no de -005. También en monos rhesus, se observó reactividad cruzada de -003 en células mononucleares, pero no de -005 (Figura 15C).

## 5 EJEMPLO 12

### Experimentos de internalización

Se tiñeron células CHO-CD38 con una concentración saturante de anticuerpos específicos de CD38 marcados con FITC (sobre hielo, 30 min). Después de lavar las células (en RPMI 1640 complementado con FCS al 10%), se calentó una agrupación de células hasta 37°C para permitir la internalización, y la otra agrupación se dejó sobre hielo. En varios intervalos de tiempo (0-120 min), se extrajeron alícuotas de células y se transfirieron a PBS--BSA para detener la interanalización. Después de lavar las muestras dos veces con PBS-BSA, EtBr (diluido en PBS-BSA, concentración final de 2 mg/ml) se añadió a las muestras para inactivar FITC unido a membrana. Se midió la fluorescencia mediante citometría de flujo.

La Figura 16A y 16B muestran que -003 y -005 se internalizan por células CHO-CD38 en 5 minutos a 37°C.

## 20 EJEMPLO 13

### Experimentos de SCID-luciferasa *in vivo*

En este modelo de tumor, las células se transfectan con urocinasa de luciérnaga. Tras la administración de luciferina (Moléculas Probes, Leiden, Países Bajos) las células de ratón marcadas pueden detectarse *in vivo* mediante obtención de imágenes bioluminiscentes usando una cámara CCD altamente sensible, véase, por ejemplo, Wetterwald et al., American Journal of Pathology 160(3), 1143-1153 (2002).

Las células Daudi se transfectaron con gWIZ luciferasa de Gene Therapy Systems (San Diego, CA) y se cultivaron en RPMI con FCS al 10%, Pen/Strep, Piruvato sódico y puromicina 1 mg/ml (Sigma). Las células se analizaron respecto de la expresión de luciferasa (expresada en URL/1 x 10<sup>5</sup> células) en un luminómetro y para la expresión de CD38 mediante FACS. Se inyectaron 2,5 x 10<sup>6</sup> células Daudi transfectadas con luciferasa/ratón por vía i.v. en ratones SCID. Se trató a los ratones con -003, -005, anticuerpo de control de isotipo (HuMab-KLH) o rituximab (anticuerpo anti-CD20). Los anticuerpos se inyectaron por vía intraperitoneal. Se usaron cuatro configuraciones de tratamiento (véase la Tabla 4). En la configuración preventiva, el anticuerpo (100 µg/ratón) y las células se administraron de manera simultánea. En la configuración terapéutica I, el antibody (300 µg/mouse) se administró 7 días antes de administrar las células. En la configuración terapéutica II, el antibody (10 µg/mouse) se administró 14 días antes de administrar las células. En la configuración terapéutica III, el antibody (100 µg/mouse) se administró 7 días antes de administrar las células. Para la obtención de imágenes, se anestesió a los ratones mediante inyección i.p. de una mezcla de ketamina/xilacina/atropina. La D-luciferina sintética (sal sódica, Molecular Probes) se administró i.p. a una dosis de 25 mg/ml. Después se colocó a los ratones en una caja hermética y después de 3 minutos, se inició la obtención de imágenes usando un detector CCD enfriado por nitrógeno líquido VersArray 1300B (Roper Scientific). Los fotones emitidos por la luciferasa se contaron a lo largo de un periodo de exposición de 5 min. Bajo iluminación, se obtuvieron imágenes en blanco y negro por referencia. Se usó el programa informático MetaVue (Universal Imaging Corp) para recogida de datos y análisis de imágenes. La significación estadística de diferencias entre grupos se estableció por análisis de la varianza con una prueba posterior de Newman-Keuls usando la versión 3.02 de GraphPad Prism (Graphpad Software Inc).

**Tabla 4 - Configuraciones de tratamiento para experimentos de luciferasa *in vivo***

Configuración experimental	Tratamiento de anticuerpo (días después de la inoculación celular)	Dosis de anticuerpo (µg/ratón)
Configuración preventiva	0	100
Configuración terapéutica	7	300
Configuración terapéutica II	14	10
Configuración terapéutica III	7	100

Las Figuras 17A y 17B muestran que -003 y -005 inhiben el crecimiento de células tumorales en la configuración preventiva y en la configuración terapéutica I, de manera similar a la inhibición observada para el anticuerpo anti-CD20. Ambos anticuerpos funcionan significativamente mejor que el anticuerpo de control de isotipo. También en la configuración terapéutica II, los anticuerpos anti-CD38 frenan el crecimiento de células tumorales Daudi-luc (Figura 17C). En la configuración terapéutica III, -003 y -024 muestran una clara inhibición del crecimiento de células tumorales Daudi-luc (Figura 17D).

## 50 EJEMPLO 14

### Apoptosis

60

El ensayo de apoptosis se llevó a cabo de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Kit de apoptosis de anexina V, BD Biosciences, Alphen a.d. Rijn, Países Bajos). En pocas palabras, se añadieron mAb para CD38 a  $2,5 \times 10^5$  células (células Daudi transfectadas con luciferasa, en 0,5 ml de RPMI<sup>++</sup> en una placa de 24 pocillos), a una concentración de 5 µg/ml de los anticuerpos -003 o -005 o un anticuerpo anti-CD20 solo o en presencia del anticuerpo con bloqueo cruzado rb-anti-hlgG (50 µg/ml).

Después de la incubación (37°C, CO<sub>2</sub> al 5%, 20 h), las células se recogieron cuidadosamente, y se lavaron con tampón de unión (1200 rmp, 4°C, 5 min, BD Biosciences). El sedimento se resuspendió en 100 µl de tampón de unión. Después, se añadieron 5 µl de Anexina-V-FITC (BD Biosciences) y 10 µl de PI (BD Biosciences) a la suspensión y se incubaron durante 15 minutos a TA. Se añadieron 400 µl de tampón de unión y las muestras se midieron (lectura de PI en FL2). Para el análisis de células apoptóticas, se contaron todas las células positivas a anexina V mediante citometría de flujo usando un citómetro de flujo FACScalibur con el programa CellQuest pro (BD Biosciences). Se recogieron al menos 10.000 eventos para el análisis. Esta población incluye células tanto PI positivas como PI negativas.

La figura 18 muestra que -003 y -005 no inducen apoptosis. Sin embargo, después del sobrecruzamiento, se observa la apoptosis de las células diana. -003 indujo apoptosis después del sobrecruzamiento similar a la apoptosis inducida por un anticuerpo anti-CD20 (rituximab). -005 tuvo menos capacidad para inducir apoptosis después de la reticulación. Se obtuvieron resultados similares con células RAMOS como células diana (datos no mostrados).

## EJEMPLO 15

### Efecto de -005 en células B de injerto de tejido en el modelo de implante de tejido sinovial de ratón RA-SCID

Se alojó a ratones SCID, cepa C.B.-17/IcrCrI-SCID-bg, machos/hembra, de 4-12 semanas, adquiridos a través de Charles River Laboratories Nederland (Maastricht, Países Bajos) en jaulas IVC en condiciones estándar de luz y temperatura, y se les alimentó con pienso de laboratorio y agua a voluntad. Antes del implante, los ratones (tres ratones en cada grupo experimental, día 0) se anestesiaron mediante inyección intraperitoneal de ketamina (NIMATEK, EuroVet) y xilazina (Rompun, Bayer) a una relación 1:1. Se practicó una pequeña incisión en la piel usando tijeras quirúrgicas. Se implantó tejido sinovial inflamado de un paciente con artritis reumatoide que se sometió a cirugía de reemplazo por vía subcutánea en forma de cúmulo de seis fragmentos pequeños (2-3 mm<sup>3</sup> en total) en cada flanco del ratón. La herida se cerró usando pegamento de cianoacrilato Permacol. En el día 1 del experimento, el tejido sinovial restante se analizó respecto de células B en los trasplantes sinoviales inflamados. -005 (12 mg/kg) o el anticuerpo de control (anti-KLH, 30 mg/kg) se inyectó (i.v.), en un volumen de 200 µl en el día 8 del experimento. Al final del experimento (día 14) se sacrificó a los ratones por inhalación de CO<sub>2</sub> y se explantaron los injertos sinoviales. Uno de los injertos se congeló inmediatamente en compuesto OCT (TissueTek, Sacura Finetek Europe) para su análisis inmunohistoquímico posterior, y otro se congeló mediante inmersión en nitrógeno líquido para el análisis de ARN posterior.

### Inmunohistoquímica

Se prepararon portaobjetos con criosecciones de 5 µm en SuperFrost (Menzel GmbH, Braunschweig) usando un criostato LEICA CM1900 y se almacenaron a -80°C. Las secciones descongeladas se fijaron en acetona durante 10 min, se secaron a temperatura ambiente y se lavaron 3 x 5 min en PBS. Todas las etapas se llevaron a cabo a temperatura ambiente. La actividad de peroxidasa endógena se bloqueó mediante incubación con PBS complementado con peróxido de hidrógeno al 0,3% y azida sódica al 0,1 % durante 20 min. Los portaobjetos se lavaron 3 x 5 min en PBS y se incubaron con suero humano normal al 10% (NHS)/suero de conejo normal al 10% (NRbS) en PBS/BSA al 1% durante 30 min. A continuación, el anticuerpo primario (mAb de ratón) diluido en PBS complementado con BSA al 1%/NHS al 10%/NRbS al 10% se incubó durante 60 min. Después de lavados de 3 x 2 min en PBS, el conjugado de HRP (anti-Ig de ratón-HRP de cabra; DAKO P0447) diluido a 1:50 en PBS (complementado con BSA al 1%/NHS al 10%/NRbS al 10%) se añadió durante 30 min. Se potenció la señal de peroxidasa usando el sistema TSA<sup>™</sup> Biotin (Perkin Elmer Life Sciences, NEL700). Los portaobjetos se lavaron 3 x 2 min en PBS y se incubaron con biotiniil tiramida diluida a 1:1600 en tampón de amplificación durante 30 min. Después de lavados durante 3 x 2 min en PBS, se añadió estreptavidina-HRP diluida a 1:400 en PBS (complementado con BSA al 1 %) durante 30 min. Los portaobjetos se lavaron 3 x 2 min en PBS y se incubaron con solución DAB (DAKO Cytomation K3465) durante 5 min. La reacción del color se detuvo con agua destilada. Finalmente, los portaobjetos se contratiñeron con hematoxilina (MERCK), se lavaron con agua corriente y se cubrieron con glicerina de Kaiser y cubreobjetos.

### Puntuación de la intensidad de tinción

La puntuación de los xenoinjertos de tejido sinovial teñidos se llevó con enmascaramiento por dos personas entrenadas. En primer lugar, se seleccionó la sección más fuerte de una serie de secciones y a esta sección de referencia se le dio una puntuación máxima de 8. Entonces se puntuó la intensidad de tinción en las otras secciones en una escala de 0 a 8, en relación a la sección de referencia.

Análisis estadístico

La puntuación de la intensidad de tinción se analizó mediante ANOVA de una vía de Kuskar-Wallis seguido de prueba de comparación múltiple de Dunn usando Graph Pad Prism versión 4.01 (Graph Pad software, Inc., San Diego, CA, EE.UU.).

La figura 19 y la Figura 21 muestran que los números de células plasmáticas positivas anti-CD38 se reducen tras el tratamiento con -005. La tinción de células plasmáticas con anti-CD138 confirma que -005 da como resultado números reducidos de células plasmáticas (Figuras 20 y 22).

**EJEMPLO 16**

Secuenciación de la secuencia codificante de anticuerpos humanos contra preparación de ARN de CD38

El ARN total se preparó a partir de  $5 \times 10^6$  células de las líneas celulares de hibridoma que expresan el anticuerpo monoclonal -003, -005 y -024, respectivamente, con el kit RNeasy (Qiagen, Westburg, Leusden, Países Bajos) de acuerdo con el protocolo del fabricante.

Preparación de ADNc de -003, -005 y -024

Se preparó ADN complementario 5'-RACE (ADNc) de ARN a partir de 100 ng de ARN total, usando el kit SMART RACE cDNA Amplification (Clontech), siguiendo el protocolo del fabricante.

Se sintetizaron cebadores oligonucleotídicos y se cuantificaron por Isogen Biosciences (Maarsse, Países Bajos). Los cebadores se disolvieron en H<sub>2</sub>O a 100 pmol/μl y se almacenaron a -20°C. Se muestra a modo de tabla un resumen de todos los cebadores de la PCR y de secuenciación (Tabla 5). Para la PCR, se usó ADN polimerasa PfuTurbo® Hotstart (Stratagene, Amsterdam, Países Bajos; producto n.º 600322) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Cada mezcla de reacción contenía 200 μM de dNTP mixtos (Roche Diagnostics, Almere, Países Bajos; producto n.º 1814362), 12 pmol del cebador inverso (RACEG1A1 para V<sub>H</sub>3003-005, RACEV<sub>H</sub>Apal para V<sub>H</sub>3003-003 y RACEV<sub>L</sub>BsiWi para V<sub>L</sub>3003-003 y 005), 7,2 pmol de UPM-Mix (UPM-Mix: 2 μM de ShortUPMH3 y 0,4 μM de LongUPMH3), 0,6 μl del molde de ADNc 5'RACE, y 1,5 unidades de ADN polimerasa PfuTurbo® Hotstart en tampón de reacción PCR (suministrado con la polimerasa) en un volumen total de 30 μl. Las reacciones PCR se llevaron a cabo con un TGradient Thermocycler 96 (Whatman Biometra, Goettingen, Alemania; producto n.º 050-801) usando un programa de 35 ciclos: desnaturalización a 95°C durante 2 min; 35 ciclos de 95°C durante 30 s, a 55°C durante 30 s, y 72°C durante 1,5 min; extensión final a 72°C durante 10 min. En caso adecuado, las mezclas de la PCR se almacenaron a 4°C hasta su análisis o procesamiento posterior.

**Tabla 5 - Cebadores**

Nombre	Secuencia
ShortUPMH3	TGAAAGCTTCTAATACGACTCACTATAGGGC
RACEV <sub>L</sub> BsiWi	GAAGATGAAGACAGATGGTGCAGCCACCGTACG
RACEV <sub>H</sub> Apal	GGAGGGTGCCAGGGGGAAGACCGATGGGCCCTT
RACEG1A1	GGGAGTAGAGTCCTGAGGACTG
M 13reverso	GGATAACAATTTACACAGG
LongUPMH3	TGAAAGCTTCTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGG TATCAACGCAGAGT
HCseq5	GGTCAGGGCGCCTGAGTTCCACG
VH3003-003for	GATAAGCTTGCCGCCACCATGGACTGGACCTGGAGGTTCC CTC
VH3003-5for	GATAAGCTTGCCGCCACCATGGAGTTTGGGCTGAGCTGG CTT
VL3003-5exfor	GATAAGCTTGCCGCCACCATGGAAGCCCCAGCTCAGCTT CTC
VL3003-003for	GATAAGCTTGCCGCCACCATGAGGGTCCTCGCTCAGCTC CTG

Nombre	Secuencia
VH300324exfor	GATAAGCTTGCCGCCACCATGGGGTCAACCGCCATCCTC GCC
VL3003-24-5exfor	GATAAGCTTGCCGCCACCATGGAAGCCCCAGCTCAGCTT CTC

Clonación de -003-2F5 V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> y -005 V<sub>L</sub> y -024 V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> en el sistema de vector II pGEMTn

5 Los productos de reacción se separaron mediante electroforesis en un gel de agarosa TAE al 1% y se tiñó con bromuro de etidio. Se cortaron las bandas del tamaño correcto de los geles y el ADN se aisló frente a la unidad de agarosa usando el kit de extracción de gel QiaexII (Qiagen, n.º de cat. 20021).

10 Los fragmentos de la PCR aislados del gel tenían una cola A debido a una incubación de 10 min a 72°C con dATP 200 µM y 2,5 unidades de Amplitaq (Perkin Elmer) y se purificaron usando columnas minielute (Qiagen). Los fragmentos de PCR con cola de A se clonaron en el vector pGEMTeasy (Promega) usando el kit de sistema de vector pGEMT easy II y su protocolo (LJ270, página 3/4). Se transformaron 2 µl de la mezcla de ligadura en *E. coli* OneShot DH5αT1R competentes (Invitrogen) y se emplacaron en placas LB/Amp/IPTG/Xgal.

Secuenciación

15 Las regiones V<sub>H</sub> -003 y -024 y la región V<sub>L</sub> de -005 se secuenciaron por AGOWA (Berlin, Alemania) después de tomar, respectivamente, 20 (V<sub>H</sub>-003), 16 (V<sub>L</sub>-003), 15 (V<sub>L</sub>-005) y 6 (V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> -024) colonias de color blanco, aislando el plásmido y secuenciando con el cebador inverso M13. La región V<sub>H</sub> de -005 se secuenció directamente en el producto de la PCR usando el cebador HCseq5. Las secuencias se analizaron usando el paquete informático Vector NIT advanced (Invitrogen).

Generación de vectores de expresión para el anticuerpo -003, -005, -024 y el anticuerpo 3079 de Morphosys

25 La región codificante de V<sub>H</sub> de -003 se amplificó mediante la PCR a partir de un clon de plásmido pGemT que contiene la región V<sub>H</sub> de -003, usando los cebadores VH3003-003for y RACEVHApal, introduciendo sitios de restricción adecuados (HindIII y Apal) para clonarlo en pConG1f0.4 (Lonza Biologics, Slough, UK) y una secuencia de Koz (GCCGCCACC). El vector pConG1f0.4 contiene la región constante de cadena pesada de IgG1 humana. Se insertó el fragmento de la PCR de V<sub>H</sub>, en fase, en el vector pConG1f0.4 usando HindIII y Apal. La construcción se comprobó mediante análisis de secuencia.

30 La región codificante de V<sub>H</sub> de -005 se amplificó mediante la PCR a partir de un clon de plásmido pGemT que contiene la región V<sub>H</sub> de -005, usando los cebadores VH3003-5for y RACEVHApal, introduciendo sitios de restricción adecuados (HindIII and Apal) for cloning into pConG1f0.4 y una secuencia Kozak ideal. Se insertó el fragmento de la PCR de V<sub>H</sub>, en fase, en el vector pConG1f0.4 usando HindIII y Apal. La construcción se comprobó mediante análisis de secuencia.

40 La región codificante de V<sub>H</sub> de -024 se amplificó mediante la PCR a partir de un clon de plásmido pGemT que contiene la región V<sub>H</sub> de -024, usando los cebadores VH300324exfor y RACEVHApal, introduciendo sitios de restricción adecuados (HindIII and Apal) for cloning into pConG1f0.4 y una secuencia Kozak ideal. Se insertó el fragmento de la PCR de V<sub>H</sub>, en fase, en el vector pConG1f0.4 usando HindIII y Apal. La construcción se comprobó mediante análisis de secuencia.

45 La región codificante de V<sub>H</sub> del anticuerpo Morphosys 3079 se sintetizó por GeneArt (Regensburg, Alemania), basándose en los datos publicados en la Patente WO 2005/103083 A2. La secuencia codificante se optimizó por codones para la expresión en células HEK para potenciar los niveles de expresión y los sitios de restricción adecuados (HindIII y APAL) para clonarlos en pConG1f0.4 y se introdujo una secuencia Kozak ideal. El plásmido que contenía la región VH sintética se digirió con Apal y HindIII y el fragmento VH se insertó, en fase, en el vector pConG1f0.4.

50 La región codificante de V<sub>L</sub> de -005 se amplificó mediante la PCR a partir de un clon de plásmido pGemT que contiene la región V<sub>L</sub> de -005, usando los cebadores VL3003-5exfor y RACEVLBsiWI, introduciendo sitios de restricción adecuados (HindIII and Pfl23II) para clonación en pConKappa0.4 (Lonza Biologies) y una secuencia Kozak ideal. El vector pConKappa0.4 contiene la región constante ligera kappa. Se insertó el fragmento de la PCR de V<sub>L</sub>, en fase, en el vector pConKappa0.4 usando HindIII y Pfl23II. La construcción se comprobó mediante análisis de secuencia.

55 La región codificante de V<sub>L</sub> de -003 se amplificó mediante la PCR a partir de un clon de plásmido pGemT que contiene la región V<sub>L</sub> de -003, usando los cebadores VL3003-003for y RACEVLBsiWI, introduciendo sitios de restricción adecuados (HindIII y Pfl23II) para clonación en pConKappa0.4 y una secuencia Kozak ideal. Se insertó el

fragmento de la PCR de  $V_L$ , en fase, en el vector pConKappa0.4 usando HindIII y Pfl23II. La construcción se comprobó mediante análisis de secuencia.

5 La región codificante de  $V_L$  de -024 se amplificó mediante la PCR a partir de un clon de plásmido pGemT que contiene la región  $V_L$  de -024, usando los cebadores VL3003-24-5exfor y RACEVLBSiWI, introduciendo sitios de restricción adecuados (HindIII and Pfl23II) para clonación en pConKappa0.4 y una secuencia Kozak ideal. Se insertó el fragmento de la PCR de  $V_L$ , en fase, en el vector pConKappa0.4 usando HindIII y Pfl23II. La construcción se comprobó mediante análisis de secuencia.

10 La región codificante de  $V_L$  del anticuerpo Morphosys 3079 se sintetizó por GeneArt, basándose en los datos publicados en el documento WO 2005/103083. La región codificante se optimizó por codones para expresión en células HEK; para potenciar los niveles de expresión y sitios de restricción adecuados (HindIII y Pfl23II) para clonar en pConKappa0.4 y se introdujo una secuencia Kozak ideal. El plásmido, que contenía la región  $V_L$  sintética, se dirigió con Pfl23II y HindIII y se insertó el fragmento VH, en fase, en el vector pConKappa0.4.

15 Los anticuerpos se expresaron transitoriamente en células HEK-293F, tal como se describe en el Ejemplo 17, cotransfectando sus vectores de cadena pesada y cadena ligera.

#### Generación de líneas celulares estables en células CHO-K1SV

20 Para la generación de líneas celulares estables, se combinaron los vectores de cadena pesada y ligera de -003 o -005 en un solo vector génico doble mediante técnicas de colonización convencionales.

25 Los vectores génicos dobles de -003 o -005 se linealizaron y transfectaron en células CHO-K1SV (Lonza Biologies), esencialmente tal como se describe por el fabricante. Se seleccionaron las líneas celulares estables mediante selección con L-metionina sulfoximina (MSX) 25  $\mu$ M tal como se describe por Lonza Biologics. Los clones con mejor producción se seleccionaron y propagaron en medio CD-CHO (Invitrogen) y se purificaron los anticuerpos del sobrenadante del cultivo celular, tal como se describe en el ejemplo 3.

### 30 **EJEMPLO 17**

#### Mapeo de epítomos usando mutagénesis de sitio dirigido

35 Se sintetizaron cebadores oligonucleotídicos y se cuantificaron por Isogen Biosciences (Maarssen, Países Bajos). Los cebadores se disolvieron en  $H_2O$  a 100 pmol/ $\mu$ l y se almacenaron a  $-20^\circ C$ . Se muestra un resumen de todos los cebadores de la PCR y de secuenciación en la Tabla 6. Para la PCR, se usó ADN polimerasa PfuTurbo® Hotstart (Stratagene, Amsterdam, Países Bajos) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Cada mezcla de reacción contenía 200  $\mu$ M de dNTP mixtos (Roche Diagnostics, Almere, Países Bajos), 10 pmol de los cebadores tanto directo como inverso, 100 ng de ADN genómico o 1 ng de ADN plasmídico y 1 unidad de ADN polimerasa PfuTurbo® Hotstart en tampón de reacción de PCR (suministrado con polimerasa) en un volumen total de 20  $\mu$ l. Las reacciones PCR se llevaron a cabo con un TGradient Thermocycler 96 (Whatman Biometra, Goettingen, Alemania) usando un programa de 32 ciclos: desnaturalización a  $95^\circ C$  durante 2 min; 30 ciclos de  $95^\circ C$  durante 30 s, un gradiente de  $60-70^\circ C$  (u otra temperatura de hibridación específica) durante 30 s, y  $72^\circ C$  durante 3 min; extensión final a  $72^\circ C$  durante 10 min. En caso adecuado, las mezclas de la PCR se almacenaron a  $4^\circ C$  hasta su análisis o procesamiento posterior.

50 Se efectuó electroforesis en gel de agarosa de acuerdo con Sambrook (Sambrook, Russell et al. 2000) usando geles de 50 ml, en tampón 1 x Tris Acetato EDTA. El ADN se visualizó mediante la inclusión de bromuro de etidio en el gel y observación bajo luz UV. Las imágenes del gel se registraron mediante una cámara CCD y un sistema de análisis de imágenes (GeneGnome; Syngene, via Westburg B.V., Leusden, Países Bajos).

55 La purificación de los fragmentos de la PCR deseados se llevó a cabo usando el kit de purificación MinElute PCR (Qiagen, via Westburg, Leusden, Países Bajos; producto n.º 28006), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El ADN aislado se cuantificó mediante espectroscopía UV (véase más adelante) y se determinó la cantidad mediante electroforesis de gel de agarosa.

60 Como alternativa, los productos de la PCR o de digestión se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa (por ejemplo, cuando había presentes múltiples fragmentos) usando un gel de agarosa de Tris acetato EDTA al 1%. El fragmento deseado se cortó del gel y se recuperó usando el kit de extracción de gel QIAEX II (Qiagen; producto n.º 20051), de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

65 La densidad óptica de los ácidos nucleicos se determinó usando un espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 (Isogen Life Science, Maarssen, Países Bajos) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La concentración de ADN se midió mediante análisis de la densidad óptica (DO) a 260 nm (una unidad de  $DO_{260nm} = 50 \mu g/ml$ ). Para todas las muestras, se usó como referencia el tampón en el que se disolvieron los ácidos nucleicos.

Se obtuvieron enzimas de restricción y complementos de New England Biolabs (Beverly, MA, EE.UU.) o Fernetas (Vilnius, Lituania) y se usaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El ADN (100 ng) se dirigió con 5 unidades de enzima en el tampón adecuado en un volumen final de 10 µl (los volúmenes de reacción se escalaron según fuese adecuado). Las digestiones se incubaron a la temperatura recomendada durante un mínimo de 60 min.

5 Para los fragmentos que requerían digestiones dobles con enzimas de restricción que implican tampones o necesidades de temperatura incompatibles, las digestiones se efectuaron de manera secuencial. En caso necesario, los productos de digestión se purificaron mediante electroforesis en gel de agarosa y extracción de gel.

10 Los ligamientos de fragmentos de ADN se llevaron a cabo con el kit Quick Ligation (New England Biolabs) según las instrucciones del fabricante. Para cada ligamiento, el ADN del vector se mezcló con un exceso aproximadamente tres molar de ADN insertado.

15 El ADN de plásmido (1-5 µl de solución de ADN, típicamente 2 µl de mezcla de ligamiento de ADN) se transformó en las células de *E. coli* One Shot DH5α-T1<sup>R</sup> (Invitrogen, Breda, Países Bajos; n.º de producto 12297-016) usando el método de choque térmico, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. A continuación, las células se emplacaron en placas de agar Luria-Bertani (LB) que contenían 50 µg/ml de ampicilina. Las placas se incubaron durante 16-18 h a 37°C hasta que las colonias bacterianas se hicieron evidentes.

20 Las colonias bacterianas se exploraron respecto de la presencia de vectores que contenían las secuencias deseadas mediante PCR de colonias usando la mezcla maestra para PCR ThermoStart (Abgene, via Wetsburg, Leusden, Países Bajos; n.º de producto AB-938-DC15/b) y los cebadores pConG1seq1 y pEE13.4seqrev2 (Tabla 6). Las colonias seleccionadas se tocaron ligeramente con una punta de pipeta de 20 µl y se tocaron brevemente en 2 ml de LB para cultivo a pequeña escala, y después se resuspendieron en la mezcla de PCR. La PCR se llevó a cabo con un TGradient Thermocycler 96 usando un programa de 35 ciclos: desnaturalización a 95°C durante 15 min; 35 ciclos de 94°C durante 30 s, 55°C durante 30 s y 72°C durante 2 min; seguido de una etapa de extensión final de 10 min a 72°C. En caso de que fuese adecuado, las mezclas de la PCR se almacenaron a 4°C hasta su análisis mediante electroforesis en gel de agarosa.

30 El ADN plasmídico se aisló de cultivos de *E. coli* usando los siguientes kits de Qiagen (via Westburg, Leusden, Países Bajos), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Para la preparación de plásmido en bruto (50-150 ml de cultivo), se usó un kit HiSpeed Plasmid Maxi (n.º de producto 12663) o un kit HiSpeed Plasmid Midi (n.º de producto 12643). Para la preparación de plásmido a pequeña escala (± 2 ml de cultivo) se usó un kit Qiaprep Spin Miniprep (n.º de producto 27106) y el ADN se eluyó en 50 µl de tampón de elución (suministrado con el kit).

### 35 Construcción del vector de expresión de HA-CD38 pEE13.4HACD38

Se amplificó el dominio extracelular de CD38 humano a partir del plásmido pClpuroCD38 (obtenido del Prof. M. Glennie, Tenovus Research Laboratory, Southampton General Hospital, Southampton, UK) usando los cebadores cd38forha y cd38exrev. Mediante esta reacción PCR se introdujo un marcador de HA. Este producto PCR se usó como molde para una segunda reacción PCR con los cebadores SPHMM38ex y cd38exrev. Mediante esa reacción PCR, el péptido de señal, SPHMM, los sitios de restricción y una secuencia Kozak ideal (GCCGCCACC) para una expresión óptima se introdujeron. Después de la purificación, se clonó este fragmento de la PCR en el vector de expresión pEE13.4 (Lonza Biologies) y se confirmó la secuencia codificante completa mediante secuenciación con los cebadores pConKseq1, pEE13.4seqrev, cd38seq1for y cd38seq2rev (Tabla 6). Esta construcción se denominó pEE13.4HACD38.

### Mutagénesis de sitio dirigido

50 Se construyeron tres proteínas mutantes individuales de huCD38, en las que T se mutó a A en la posición 237 (T237A, SEQ ID NO: 32), Q se mutó a R en la posición 272 (Q272R, SEQ ID NO: 33), o S se mutó a F en la posición 274 (S274F, SEQ ID NO: 34). Se llevó a cabo la mutagénesis de sitio dirigido usando el kit de mutagénesis de sitio dirigido QuickChange II XL (Stratagene, Amsterdam, Países Bajos) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Este método incluyó la introducción de un sitio de restricción silente adicional o la pérdida de un sitio de restricción para explorar respecto de mutagénesis satisfactoras (sitio adicional de *Xba*1 para el mutante T237A, sitio adicional de *Bcg*1 para el mutante Q272R y la pérdida del sitio de *Ssp*1 para el mutante S274F). En resumen, 5 µl de tampón de reacción 10x, 1 µl de oligonucleótido HACD38T237Afor2, HACD38Q272Rfor o HACD38S274Ffor (100 pmol/µl), 1 µl de oligonucleótido HACD38T237Arev2, HACD38Q272Rrev o HACD38S274Frev (100 pmol/µl), 1 µl de mezcla de dNTP, 3 µl de solución Quick, 1 µl de plásmido pEE13.4HACD38 (50 ng/µl) y 1 µl de ADN polimerasa PfuUltra HF se mezclaron en un volumen total de 50 µl y se amplificaron con un TGradient Thermocycler 96 (Whatman Biometra, Goettingen, Alemania; producto n.º 050-801) usando un programa de 18 ciclos: desnaturalización a 95°C durante 1 min; 18 ciclos de 95°C durante 50 s, 60°C durante 50 s, y 68°C durante 10 min. Las mezclas PCR se almacenaron a 4°C hasta su procesamiento posterior. A continuación, las mezclas de la PCR se incubaron con 1 µl de *Dpn*I durante 60 min a 37°C para digerir el vector pEE13.4HACD38 WT y se almacenaron a 4°C hasta su procesamiento posterior. La mezcla de reacción se precipitó con 5 µl de NaAc 3 M y 125 µl de etanol, se incubó durante 20 minutos a -20°C y se centrifugó durante 20 minutos a 4°C a 14000xg. El sedimento de ADN se lavó con etanol al 70%, se secó y se disolvió en 4 µl de agua. El volumen de reacción total de 4 µl se transformó en células de *E. coli* One Shot Top

10DH5 $\alpha$  T1<sup>R</sup> competentes (Invitrogen, Breda, Países Bajos) de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Invitrogen). A continuación, las células se emplacaron en placas de agar Luria-Bertani (LB) que contenían 50  $\mu$ g/ml de ampicilina. Las placas se incubaron durante 16-18 h a 37°C hasta que las colonias bacterianas se hicieron evidentes. Las colonias se exploraron mediante PCR de colonias usando los cebadores pConG1seq1 y pEE13.4seqrev2 (Tabla 5) y se digirieron con enzimas de restricción relevantes para explorar respecto de la incorporación del oligonucleótido mutagénico. Se cultivaron 2 clones positivos para cada mutante y se aisló el ADN plasmídico. La secuencia codificante completa de HACD38 se determinó usando los cebadores cd38seq1for, pConG1seq1 y pEE13.4seqrev2 para confirmar la presencia de las mutaciones y la ausencia de mutaciones no deseadas adicionales.

#### Secuenciación de ADN

Las muestras de ADN plasmídico se enviaron a AGOWA (Berlín, Alemania) para el análisis de secuencia. Las secuencias se analizaron usando el programa informático Vector NTI advanced (Informax, Oxford, R.U.).

#### Expresión transitoria en células HEK-293F

Se obtuvieron células Freestyle™ 293-F (un subclon de HEK-293 adaptado para crecimiento en suspensión y medio Freestyle químicamente definido, (HEK-293F)) a través de Invitrogen y se transfectaron con pEE13.4HACD38 y con las tres construcciones que portan las mutaciones T237A, Q272R y S274F, según el protocolo del fabricante usando 293fectina (Invitrogen). Los sobrenadantes de cultivo de las células transfectadas se usaron en ELISA para estudios de unión anti-CD38.

#### Unión de anticuerpos anti-CD38

Las placas de ELISA (Greiner, n.º 655092) se recubrieron O/N a 4°C con 1  $\mu$ g de anticuerpo anti-HA (Sigma, n.º H-9658) y posteriormente se bloqueó con suero de pollo al 2%. Se diluyeron los sobrenadantes de cultivo de las células HEK293F transfectadas, se aplicaron a las placas de ELISA y se incubaron durante 1 h a TA. Después de lavar, se añadieron diluciones seriadas de los HuMab -003 y -005 y se incubaron durante 1 h a TA. Los anticuerpos unidos se detectaron con anticuerpos de cabra anti-IgG humana conjugados a HRP. El ensayo se reveló con ABTS (Roche, n.º 1112597) y se midió la absorbancia a 405 nm usando un espectrofotómetro.

Tal como puede observarse a partir de las Figuras 23A-23C, tanto -003 como -005 se unen a CD38 humano ts. La unión de -003 no se vio afectada por la introducción de las mutaciones T237A (Figura 23A), Q272R (Figura 23B) o S274F (Figura 23C). -005 fue capaz de unirse a CD38 que portaba la mutación T237A (Figura 23A). La unión de -005 a CD38 con la mutación Q272R se vio gravemente afectada (Figura 23B), tanto respecto de su CE<sub>50</sub> como en su capacidad de unión máxima. -005 no fue capaz de unirse a CD38 humano mutante en donde la serina en la posición 274 se reemplazó con fenilalanina (Figura 23C).

Estos datos demuestran que -003 y -005 se unen a diferentes epítomos. Además, estos estudios revelaron que la unión de -005 a CD38 es sensible a las mutaciones en las posiciones 272 y 274. En particular, S274 es esencial para la unión de -005 a CD38.

Tabla 6 - Cebadores

Nombre	Secuencia
cd38forha	CTGCTGTGGCCCATGGTGTGGGCCTACCCTTACGACGTGC
cd38exrev	CTGACTACGCCAGGTGGCGCCAGACGTGGAGC
SPHMM38ex	AGGTCAGGTACCTCAGATCTCAGATGTGCAAG
	TATAGCCCGGGGCCGCCACCATGTGGTGGCGCCTGTGGTG
	GCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGTGGCCCATGGTGTGG
	GCC
pConG1seq1	GAAGACTTAAGGCAGCGGCAGAA
pConKseq1	GTAGTCTGAGCAGTACTCGTTGC
pEE13.4seqrev	TGCATTCAATTTATGTTTCAGGT
pEE13.4seqrev2	TGGACATCTCATGACTTTCTTT
cd38seq1for	AGGACACGCTGCTAGGCTACCTT
cd38seq2rev	GTCCTTTCTCCAGTCTGGGCAAG
HACD38T237Arev2	TCCACCATGTATCACCCAGGCCTCTAGAGCCTGAACCTTCT
	CTGGTTG
HACD38T237Afor2	CAACCAGAGAAGGTTTCAGGCTCTAGAGGCCTGGGTGATACA
	TGGTGG
HACD38Q272Rrev	GATATTCTTGCAGGAAAATCGAATATTCCTTTTGCTTAT
HACD38Q272Rfor	ATAAGCAAAGGAATATTCGATTTTCCTGCAAGAATATC
HACD38S274Frev	TCTGTAGATATTCTTGCAGAAAATTGAATGTTCTTTTGCTT
	ATA

**Nombre**  
HACD38S274Ffor

**Secuencia**  
TATAAGCAAAAGGAACATTCAATTTTTCTGCAAGAATATCTAC  
AGA

### EJEMPLO 18

#### Inducción de la proliferación de PBMC

5 -003, -005 y -024 se probaron en un ensayo esencialmente como se describe en Ausiello et al., Tissue antigens 56, 538-547 (2000). En resumen, Se cultivaron PBMC de donantes sanos a  $1 \times 10^5$  células/pocillo en placas de 96 pocillos de fondo plano en presencia de anticuerpos (concentración final: 1,1 - 3,3 - 10 - 30  $\mu\text{g/ml}$ ) en 200  $\mu\text{l}$  de RPMI<sup>++</sup>. La estimulación de las células con IL-15 (a 333 ng/ml; Amgen Inc., Thousand Oaks, CA, EE.UU.) se usó como contro positivo. Después de una incubación de 4 días a 37°C, se añadieron 30  $\mu\text{l}$  de <sup>3</sup>H-thmidina (16,7  $\mu\text{Ci/ml}$ ), y se continuó cultivado O/N. Se evaluó la incorporación de <sup>3</sup>H-timidina usando un contador gamma Packard Cobra (Packard Instruments, Meriden, DT, EE.UU.), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los datos mostrados son las cpm ( $\pm$  EEM) de las PBMC obtenidas de 10 donantes. Los resultados demuestran que -003 y -005 no inducen una proliferación significativa de los PBMC (Figure 24A). Asimismo, -024 no indujo una proliferación significativa de los PBMC (datos no mostrados).

### EJEMPLO 19

#### Inducción de IL-6

20 -003, -005 y -024 se probaron en un ensayo como se describe en Ausiello et al., Tissue antigens 56, 538-547 (2000). En resumen, Los PBMC se cultivaron a  $1 \times 10^6$  células/pocillo en placas de 48 pocillos en presencia de 20  $\mu\text{g/ml}$  de anticuerpos y 10 ng/ml de LPS (Sigma-Aldrich Chemie, Zwijndrecht, Países Bajos) en 500  $\mu\text{l}$  de RPMI<sup>++</sup>. Después de una incubación O/N a 37°C, se recogió el sobrenadante y se almacenó a -20°C. La concentración de IL-6 se evaluó mediante ELISA (kit de ELISA de IL-6, U-CyTech Biosciences, Utrecht, Países Bajos) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los datos mostrados significan concentración en pg/ml ( $\pm$  EEM) de 7 donantes. Los resultados demuestran que -003 y -005 no inducen liberación de niveles significativos de IL-6 (Figura 24B). Asimismo, -024 no indujo la liberación de niveles significativos de IL-6 (datos no mostrados).

### EJEMPLO 20

#### Inducción de la liberación de IFN- $\gamma$

35 -003, -005 y -024 se probaron en un ensayo como se describe en Ausiello et al., Tissue antigens 56, 538-547 (2000). En resumen, Los PBMC se cultivaron a  $1 \times 10^6$  células/pocillo en placas de 48 pocillos en presencia de 20  $\mu\text{g/ml}$  de anticuerpos y 1  $\mu\text{g/ml}$  de OKT-3 (Sanquin, Amsterdam, Países Bajos) en 500  $\mu\text{l}$  de RPMI<sup>++</sup>. Después de una incubación O/N a 37°C, se recogió el sobrenadante y se almacenó a -20°C. La concentración de IFN- $\gamma$  se evaluó mediante ELISA (kit de ELISA de IFN- $\gamma$ , U-CyTech Biosciences, Utrecht, Países Bajos) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los datos mostrados significan concentración en pg/ml ( $\pm$  EEM) de 9 donantes. Los resultados demuestran que -003 y -005 no inducen liberación de niveles detectables de IFN- $\gamma$  (Figura 24C). Asimismo, -024 no indujo la liberación de niveles significativos de IFN- $\gamma$  (datos no mostrados).

### EJEMPLO 21

#### Afinidad de unión de -003 y -005 a CD38 recombinante

50 La unión de -003 y -005 a CD38 se evaluó usando resonancia de plasmón superficial. En resumen, se inmovilizaron anticuerpos purificados en una microplaca sensora CM-5 (Biacore, Uppsala, Suecia) mediante acoplamiento de amina. Se hizo fluir CD38 marcado con HA (véase el ejemplo 3), y se detectó la unión de un antígeno a un mAb mediante un cambio en el índice refractivo en la superficie de la microplaca usando un Biacore 3000 (Biacore). Las constantes de asociación y de velocidad para -003 (Tabla 7) y -005 (Tabla 8) se resumen a continuación, media de 3 experimentos  $\pm$  DT, y muestran que tanto -003 como -005 tienen alta afinidad por CD38.

**Tabla 7 - Constantes de asociación y velocidad a 25°C**

<b>-003</b>	
$k_a$ (1/Ms)	$2,17 \times 10^5 \pm 2,65 \times 10^4$
$k_d$ (1/s)	$1,9 \times 10^{-4} \pm 4,51 \times 10^{-6}$
$K_A$ (1/M)	$1,14 \times 10^9 \pm 1,58 \times 10^8$
$K_D$ (M)	$8,85 \times 10^{-10} \pm 1,2 \times 10^{-10}$

**Tabla 8 - Constantes de asociación y velocidad a 25°C**

<b>-005</b>	
$k_a$ (1/Ms)	$8,88 \times 10^4 \pm 1,95 \times 10^4$
$k_d$ (1/s)	$5,22 \times 10^{-4} \pm 1,16 \times 10^{-5}$

$$K_A (1/M) \quad 1,7 \times 10^8 \pm 3,68 \times 10^7$$

$$K_D (M) \quad 6,06 \times 10^{-9} \pm 1,21 \times 10^{-9}$$

## EJEMPLO 22

### Mapeo de epítomos

5

#### Mapeo de epítomos usando el método PEPSCAN

De acuerdo con procedimiento conocidos (Geysen et al., 1984. Use of peptide synthesis to probe viral antigens for epitopes to a resolution of a single amino acid. Proc Natl Acad Sci USA 81:3998; Slootstra et al. 1996. Structural aspects of antibody-antigen interaction revealed through small random peptide libraries. Mol Divers 1:87; Puijk et al. 2001. Segment synthesis. En *PCT*, Países Bajos, p.1.), se sintetizaron péptidos 20-meros lineales y 15-meros ciclados solapantes que abarcan 138 aminoácidos en el extremo C-terminal de CD38 humano. Además, basándose en la secuencia en el extremo C-terminal, se produjeron péptidos de un solo bucle de diferente tamaño que cubrían la región KNIYRPDKFLQCVKNPEDSSCTSEI, la región CVHNLQPEKVQTLEAWVIHGG, y la región CLESIISKRNIQFSACKNIYRC. Además, se diseñaron conjuntos adicionales para reconstruir regiones de doble bucle que estaban compuestas de SKRNIQFSCCKNIYR y EKVQTLEAWVIHGG. Las cisteínas nativas se reemplazaron por alaninas. Los péptidos se exploraron en un ensayo ELISA usando tarjetas mini-PEPSCAN con el tamaño de una tarjeta de crédito.

#### 20 Síntesis de péptidos

Los péptidos se sintetizaron usando química de Fmoc convencional y se desprotegieron usando TFA con secuestrantes. Posteriormente, los péptidos desprotegidos se hicieron reaccionar en la micromatriz con una solución 0,5 mM de 2,6-bis(bromometil)piridina o 2,4,6-tris(bromometil)mesitileno en bicarbonato de amonio (20 mM, pH 7,9), complementado con acetonitrilo (1:1 [volumen/volumen]). Las micromatrices se agitaron suavemente en la solución durante 30-60 min, mientras que estaban completamente cubiertas en la solución. Finalmente, se lavaron exhaustivamente las micromatrices con exceso de H<sub>2</sub>O Millipore y se sonicaron en tampón de disrupción que contenía dodecilsulfato de sodio al 1%, 3-mercaptoetanol al 0,1%, en PBS (pH 7,2) a 70°C durante 30 min, seguido de sonicación en H<sub>2</sub>O Millipore durante otros 45 min.

30

#### Ensayo ELISA PEPSCAN

Las tarjetas de polietileno en formato de tarjeta de crédito de 455 pocillos, que contenían los péptidos unidos covalentemente, se incubaron con suero (por ejemplo, diluido a 1:1000 en solución de bloque que contiene un 5% de suero de caballo [volumen/volumen] y un 5% de ovoalbúmina [peso/volumen]) (4°C, durante una noche). Después de lavar, los péptidos se incubaron con anti-Ig humana de conejo-peroxidasa (dilución 1:1000, 25 °C, 1 hora), y después de lavar el sustrato de peroxidasa, se añadió sulfonato de (2,2'-azino-di-3-etilbenzotiazolina y 2 µl/ml 3% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Después de una hora, se midió el revelado de color con una cámara CCD y un sistema de procesamiento de imágenes. El sistema consiste en una cámara CCD con una lente de 55 mm (Sony CCD Video Camera XC-77RR, Nikon micro-nikkor 55 mm f/2.8 lens), un adaptador de cámara (Sony Camera adaptor DC-77RR) y el paquete informático para procesamiento de imágenes Optimas, versión 6.5 (Media Cybernetics, Silver Spring, MD 20910, EE.UU.; Optimas funciona en un sistema informático pentium II).

#### 45 Método para la representación de epítomos

Los aminoácidos individuales se identificaron mediante motivos de dipéptido que representan las unidades únicas más pequeñas en la secuencia de aminoácidos humana de CD38. Todos los motivos de dipéptido presentes en cada uno de los 1164 péptidos ensayados obtuvieron el valor de ELISA obtenido para el péptido completo respectivo. Para clasificar los motivos de dipéptidos respecto de unión fuerte o débil, se calculó una señal relativa dividiendo el valor de ELISA obtenido para cada motivo individual entre el valor promedio de ELISA para todos los 1164 péptidos lineales y ciclados, y estos se clasificaron en orden de valor decreciente. De este modo, se tomaron en consideración las contribuciones de aminoácidos a los epítomos conformacionales. Para cada uno de los mAb ensayados, se seleccionaron todos los motivos de dipéptido con puntuaciones por encima de 2,5 (es decir, los valores de ELISA de péptidos que contienen estos motivos eran al menos 2,5 veces el valor promedio de ELISA de aquellos obtenidos con todos los 1164 péptidos). Los datos se desconvolucionaron en contribuciones de aminoácidos individuales representadas sobre la secuencia lineal de CD38 mediante un sistema de puntuación. Al avanzar a lo largo de la secuencia lineal de CD38 y mediante el uso de las unidades de dipéptido únicas como punto de referencia, se concedió un punto cada vez que estaba presente un aminoácido de CD38 en este conjunto de péptidos de alta puntuación.

60

Se observó que -003, 005 y -024 se unen a las regiones SKRNIQFSCCKNIYR y EKVQTLEAWVIHGG de CD38 humano. -003 reconoce especialmente los motivos RNIQF y WVIH, -005 reconoce especialmente los motivos KRN y VQTL.

**EJEMPLO 23**Actividad enzimática

5 Se midió la actividad enzimática de CD38 humano en un ensayo esencialmente como el descrito en Graeff et al., J. Biol. Chem. 269, 30260-30267 (1994). En resumen, se incubó el sustrato NGD<sup>+</sup> (80 µM) con CD38 (0,6 µg/ml de dominio extracelular marcado con His de CD38 humano, véase el Ejemplo 3 en lo referente a la purificación de His-CD38) en un tampón que contenía Tris-HCl 20 mM, pH 7,0. Puede controlarse la producción de cGDPR espectrofotométricamente en la longitud de onda de emisión de 410 nm (excitación a 300 nm). En este ejemplo, se usó un filtro de excitación de 340 ± 60 nm y un filtro de emisión de 430 ± 8 nm.

10 Para probar el efecto de -003, -005 y -024 en la actividad enzimática de CD38, la proteína His-CD38 recombinante se pre-incubó durante 15 min a temperatura ambiente con diversas concentraciones (30, 3, 0,3 y 0,03 µg/ml) de los diferentes anticuerpos antes de añadir el sustrato NGD<sup>+</sup>. La producción de GDP-ribosa cíclica (cGDPR) se registró en diferentes instantes después de la adición de anticuerpos (3, 6, 9, 12, 30, 45, 60, 75 y 90 min).

15 La Fig 25B muestra que -005 tiene un efecto inhibitor pronunciado en la producción de cGDPR. Después de 90 minutos, la adición de 30 y 3 µg/ml de -005 dio como resultado una producción reducida en un 32% y un 34% de cGDPR (Tabla 9). Se observaron resultados similares en experimentos independientes usando diferentes lotes de -005.

No se observó un efecto inhibitor en la producción de cGDPR después de la adición de -003 (Figura 25B, Tabla 9), -024 (Figura 25D, Tabla 9) o anti-KLH (Figura 25A, Tabla 9).

25 Basándose en estos hallazgos, se espera que -005 también inhiba la síntesis de ADP-ribosa cíclica (cADPR) a partir del NAD<sup>+</sup>. La inhibición de la síntesis de cADPR puede determinarse según el método de HPLC descrito en Munshi et al., J. Biol. Chem. 275, 21566-21571 (2000).

**Tabla 9. Producción de cGDP ribosa en presencia de anticuerpos específicos para CD38 o anti-KLH.**

	Producción (% de control de NGD)			
	30 µg/ml	3 µg/ml	0,3 µg/ml	0,03 µg/ml
KLH	110	99	108	111
-003	99	100	107	107
-005	68	66	98	102
-024	99	100	104	105

30

**EJEMPLO 24**Comparación de -003 y -005 con el anticuerpo Morphosys 3079.

35 Se comparó funcionalmente los anticuerpos -003 y -005 con el anticuerpo Morphosys 3079 (TH-3079). Los métodos para clonar y expresar el anticuerpo Morphosys TH 3079 se describen en el ejemplo 16. Los métodos para la CDC se describen en el ejemplo 6. Los métodos para la ADCC se describen en el ejemplo 5. La figura 26A muestra que -005 y -003 y TH-3079 inducen lisis mediada por CDC de células CHO transfectadas con CD38, con lisis máxima similar. Cuando se comparan los valores de CE<sub>50</sub>, -005 es mejor que TH3079 para inducir la lisis de células CHO-CD38, con una CE<sub>50</sub> dos veces menor (véase la Tabla 10).

40

La Figura 26B muestra que -005 es superior a TH-3079 para inducir lisis mediada por CDC de células Daudi-luciferasa, siendo la lisis máxima de -005 2-3 veces mayor que la de TH3079. Cuando se comparan los valores de CE<sub>50</sub>, el anticuerpo -005 es similar a TH-3079 para inducir la lisis de células Daudi-luciferasa (véase la Tabla 10). -003 no induce una lisis mediada por CDC significativa de células Daudi-luciferasa.

45

La Figura 26C muestra que en este experimento, -005, -003 y TH-3079 median la lisis de células diana Daudi mediante ADCC. No se halló una diferencia en la CE<sub>50</sub> (log) y lisis máxima (Tabla 11, n=5).

50

**Tabla 10. Lisis máxima y valores de CE<sub>50</sub> de anticuerpos específicos de CD38 en la CDC.**

	Células CHO-CD38 (n=2)		Células Daudi-luc (n=2)	
	CE <sub>50</sub> µg/ml	% Lisis.Máx.	CE <sub>50</sub> µg/ml	% Lisis.Máx.
-005	0,15 ± 0,007	76,5 ± 3,54	0,39 ± 0,00	70,5 ± 7,78
TH-3079-003	0,31 ± 0,021 4,5 ± 0,933	81,5 ± 7,78 62,0 ± 16,79	0,34 ± 0,26 nc	25,5 ± 12,02 12 ± 8,49

**Tabla 11. Lisis máxima y valores de CE<sub>50</sub> de anticuerpos específicos para CD38 en ADCC.**

	Log de CE50	STD log de CE50	Lisis máxima (%)	Lisis máx. STD
-005	0,76	0,18	49,2	12,8
-003	1,17	0,23	64	14,2
TH3079	0,96	0,10	43,8	12,0

5 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Genmata A/S

10 <120> Anticuerpos contra CD38 para el tratamiento de mieloma múltiple

<130> N402226EP-A

<160> 34

15 <170> PatentIn versión 3.2

<210> 1

<211> 321

<212> ADN

20 <213> *homo sapiens*

<400> 1

```

gacatccaga tgaccagtc tccatcctca ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc      60
atcacttgtc gggcgagtc gggattagc agctggtag cctggtatca gcagaaacca      120
gagaaagccc ctaagtcct gatctatgct gcttccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca      180
aggttcagcg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct      240
gaagattttg caacttatta ctgccaacag tataatagtt accctcggac gttcggccaa      300
gggaccaagg tggaaatcaa a                                              321
    
```

25 <210> 2

<211> 107

<212> PRT

<213> *homo sapiens*

30 <400> 2

ES 2 716 874 T3

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp  
 20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile  
 35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60

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

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

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

5 <210> 3  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> *homo sapiens*

10 <400> 3

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp Leu Ala  
 1 5 10

15 <210> 4  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> *homo sapiens*

20 <400> 4

Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser  
 1 5

25 <210> 5  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> *homo sapiens*

<400> 5

30 Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Arg Thr  
 1 5

35 <210> 6  
 <211> 360  
 <212> ADN  
 <213> *homo sapiens*

ES 2 716 874 T3

<400> 6

```

caggtccagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctgggtcctc ggtgaaggtc      60
tcctgcaagg cttctggagg caccttcagc agctatgctt tcagctgggt gcgacaggcc      120
cctggacaag gacttgagtg gatgggaagg gtcatcccctt tccttggtat agcaaactcc      180
gcacagaaat tccagggcag agtcacaatt accgcggaca aatccacgag cacagcctac      240
atggacctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtat attactgtgc gagagatgat      300
atagcagcac ttggtccttt tgactactgg ggccagggaa ccctggtcac cgtctcctca      360
    
```

5 <210> 7  
 <211> 120  
 <212> PRT  
 <213> *homo sapiens*

10 <400> 7

```

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

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

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

Gly Arg Val Ile Pro Phe Leu Gly Ile Ala Asn Ser Ala Gln Lys Phe
          50          55          60

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

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

Ala Arg Asp Asp Ile Ala Ala Leu Gly Pro Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
          100          105          110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
          115          120
    
```

15 <210> 8  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> *homo sapiens*

20 <400> 8

```

Ser Tyr Ala Phe Ser
1          5
    
```

ES 2 716 874 T3

<210> 9  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> *homo sapiens*

5  
 <400> 9

Arg Val Ile Pro Phe Leu Gly Ile Ala Asn Ser Ala Gln Lys Phe Gln  
 1 5 10 15

Gly

10  
 <210> 10  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> *homo sapiens*

15  
 <400> 10

Asp Asp Ile Ala Ala Leu Gly Pro Phe Asp Tyr  
 1 5 10

20  
 <210> 11  
 <211> 321  
 <212> ADN  
 <213> *homo sapiens*

25  
 <400> 11

gaaattgtgt tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60  
 ctctcctgca gggccagtca gagtgtagc agctaacttag cctggtacca acagaaacct 120  
 ggccaggctc ccaggctcct catctatgat gcatccaaca gggccactgg catcccagcc 180  
 aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagac ttcactctca ccatcagcag cctagagcct 240  
 gaagattttg cagtttatta ctgtcagcag cgtagcaact ggcctccgac gttcggccaa 300  
 gggaccaagg tggaaatcaa a 321

30  
 <210> 12  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> *homo sapiens*

<400> 12

ES 2 716 874 T3

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

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

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

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

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

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

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

5 <210> 13  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> *homo sapiens*

<400> 13

10 Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala  
 1 5 10

15 <210> 14  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> *homo sapiens*

<400> 14

20 Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr  
 1 5

25 <210> 15  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> *homo sapiens*

<400> 15

30 Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Pro Thr  
 1 5

35 <210> 16  
 <211> 366  
 <212> ADN  
 <213> *homo sapiens*

<400> 16

ES 2 716 874 T3

gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgagactc 60  
 tcatgtgcag tctctggatt cacctttaac agctttgccca tgagctgggt ccgccaggt 120  
 ccaggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggta gtggtggtgg cacatactac 180  
 gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240  
 ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat atttctgtgc gaaagataag 300  
 attctctggt tcggggagcc cgtctttgac tactggggcc agggaaccct ggtcaccgtc 360  
 tcctca 366

<210> 17  
 <211> 122  
 <212> PRT  
 <213> *homo sapiens*

<400> 17

5

10

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Phe Thr Phe Asn Ser Phe  
 20 25 30  
 Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
 Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Gly Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60  
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
 65 70 75 80  
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys  
 85 90 95  
 Ala Lys Asp Lys Ile Leu Trp Phe Gly Glu Pro Val Phe Asp Tyr Trp  
 100 105 110  
 Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

<210> 18  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> *homo sapiens*

<400> 18

15

20

Ser Phe Ala Met Ser  
 1 5

<210> 19

ES 2 716 874 T3

<211> 17  
 <212> PRT  
 <213> *homo sapiens*

5 <400> 19

Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Gly Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
 1 5 10 15

Gly

10 <210> 20  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> *homo sapiens*

15 <400> 20

Asp Lys Ile Leu Trp Phe Gly Glu Pro Val Phe Asp Tyr  
 1 5 10

20 <210> 21  
 <211> 321  
 <212> ADN  
 <213> *homo sapiens*

<400> 21

gaaattgtgt tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60  
 ctctcctgca gggccagtca gagtgttagc agctacttag cctggtacca acagaaacct 120  
 ggccaggctc cggggctcct catctatgat gcttccaaca gggcctctgg catcccagcc 180  
 aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagac ttcactctca ccatcagcag cctagagcct 240  
 gaagatthttg cagthttatta ctgtcagcag cgtagcaact ggcctctcac tttcggcgga 300  
 gggaccaagg tggagatcaa a 321

25 <210> 22  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> *homo sapiens*

<400> 22

ES 2 716 874 T3

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

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

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

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

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

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

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

5 <210> 23  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> *homo sapiens*

<400> 23

10 Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala  
 1 5 10

15 <210> 24  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> *homo sapiens*

<400> 24

20 Asp Ala Ser Asn Arg Ala Ser  
 1 5

25 <210> 25  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> *homo sapiens*

<400> 25

30 Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Leu Thr  
 1 5

35 <210> 26  
 <211> 366  
 <212> DKA  
 <213> *homo sapiens*

<400> 26

ES 2 716 874 T3

gaggtgcagc tgggtgcagtc tggagcagag gtgaaaaagc ccggggagtc tctgaagatc 60  
 tcctgtaagg gttctggata cagcttttcc aactactgga tcggctgggt ggcagatg 120  
 cccgggaaag gcoctggagtg gatggggatc atctatcctc atgactctga tgccagatac 180  
 agcccgtcct tccaaggcca ggtcaccttc tcagccgaca agtccatcag caccgcctac 240  
 ctgcagtgga gcagcctgaa ggcctcggac accgccatgt attactgtgc gagacatgta 300  
 ggggtgggat cgcgggtactg gtacttcgat ctctggggcc gtggcaccct ggtcactgtc 360  
 tcctca 366

<210> 27  
 <211> 122  
 <212> PRT  
 <213> *homo sapiens*

<400> 27

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

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Ser Asn Tyr  
 20 25 30

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

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

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

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

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

Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

<210> 28  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> *homo sapiens*

<400> 28

Asn Tyr Trp Ile Gly  
 1 5

ES 2 716 874 T3

<210> 29  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> *homo sapiens*

5  
<400> 29

Ile Ile Tyr Pro His Asp Ser Asp Ala Arg Tyr Ser Pro Ser Phe Gln  
1 5 10 15

Gly

10  
<210> 30  
<211> 13  
<212> PRT  
<213> *homo sapiens*

15  
<400> 30

His Val Gly Trp Gly Ser Arg Tyr Trp Tyr Phe Asp Leu  
1 5 10

20  
<210> 31  
<211> 300  
<212> PRT  
<213> *homo sapiens*

25  
<400> 31

ES 2 716 874 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 716 874 T3

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

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

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

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

<210> 32  
 <211> 300  
 <212> PRT  
 <213> *homo sapiens*

5

<400> 32

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

10

ES 2 716 874 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 33  
 <211> 300  
 5 <212> PRT  
 <213> *homo sapiens*  
 <400> 33

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

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

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

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

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

10

ES 2 716 874 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 34  
<211> 300  
<212> PRT  
<213> *homo sapiens*

5

<400> 34

ES 2 716 874 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 716 874 T3

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

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

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

**REIVINDICACIONES**

1. Un anticuerpo que se une a CD38 humano, en donde dicho anticuerpo
  - 5 (a) se une específicamente a los motivos RNIQF y WVIH de CD38 humano (SEQ ID NO:31), o
  - (b) comprende las regiones variables de cadena ligera humana y de cadena pesada humana, en donde la región variable de la cadena ligera comprende una CDR1 de  $V_L$  que tiene la secuencia tal como se expone en la SEQ ID NO:3, una CDR2 de  $V_L$  que tiene la secuencia tal como se expone en la SEQ ID NO:4 y una CDR3 de  $V_L$  que tiene la secuencia tal como se expone en la SEQ ID NO:5, y la región variable de cadena pesada comprende
    - 10 una CDR1 de  $V_H$  que tiene la secuencia tal como se expone en la SEQ ID NO:8, una CDR2 de  $V_H$  que tiene la secuencia tal como se expone en la SEQ ID NO:9, y una CDR3 de  $V_H$  que tiene la secuencia tal como se expone en la SEQ ID NO:10.
2. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1 codificado por
  - 15 (i) ácidos nucleicos de cadena ligera humana que comprenden secuencias de nucleótidos en sus regiones variables tal como se describen en la SEQ ID NO:1; y
  - (ii) ácidos nucleicos de cadena pesada que comprenden secuencias de nucleótidos en sus regiones variables tal como se describen en la SEQ ID NO:6
3. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende una región de  $V_L$  que tiene a secuencia de aminoácidos tal como se describe en la SEQ ID NO:2 o que comprende una región de  $V_L$  que tiene al menos aproximadamente el 90 %, tal como al menos aproximadamente el 95 % de identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia tal como se describe en la SEQ ID NO:2.
4. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 3, que comprende una región de  $V_H$  que tiene la secuencia de aminoácidos tal como se describe en la SEQ ID NO:7 o que comprende una región de  $V_H$  que tiene al menos aproximadamente el 90 %, tal como al menos aproximadamente el 95 % de identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia tal como se describe en la SEQ ID NO:7.
5. El anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende una región de  $V_L$  según la reivindicación 3 y una región  $V_H$  según la reivindicación 4.
6. El anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que comprende una región de  $V_H$  que comprende la secuencia de aminoácidos que abarca la región de CDR1 de  $V_H$  – CDR3 de  $V_H$  de la SEQ ID NO:7.
7. El anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado por que** es un anticuerpo IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgD, IgA, IgE o IgM de longitud completa.
8. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 7, que es un anticuerpo IgG1, opcionalmente un anticuerpo IgG1,k.
9. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 7 que es un anticuerpo IgM, opcionalmente un anticuerpo IgM,k.
10. Un anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que es un fragmento de anticuerpo o un anticuerpo monocatenario.
11. Un anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que está en forma sustancialmente aislada.
12. Un anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende adicionalmente un enlazador quelante para acoplar un radioisótopo.
13. Un ácido nucleico aislado que codifica un anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10.
14. Un vector de expresión que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10.
15. Un vector de expresión que comprende una secuencia de nucleótidos de  $V_L$  de la SEQ ID NO:1 y una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO:6.
16. Un transfectoma que produce un anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, y en donde el anticuerpo es un anticuerpo humano.
17. Una célula hospedadora eucariota o procariota que produce un anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10.

18. Un inmunocombinado que comprende un anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 unido a un agente citotóxico, a un radioisótopo o a un fármaco.
- 5 19. Una molécula biespecífica o multiespecífica que comprende un anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 y una especificidad de unión por una célula efectora humana, o un anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 y una especificidad de unión por CD3, CD4, CD138, IL-15R, TNF- $\alpha$  unido a membrana o unido a receptor, un receptor Fc humano, o IL-15 unida a membrana o a receptor.
- 10 20. Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, o un inmunocombinado de acuerdo con la reivindicación 18, o una molécula biespecífica o multiespecífica de acuerdo con la reivindicación 19, un vehículo farmacéuticamente aceptable y opcionalmente uno o más agentes terapéuticos adicionales.
- 15 21. Un anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, un inmunocombinado de acuerdo con la reivindicación 18, una molécula biespecífica o multiespecífica de acuerdo con la reivindicación 19, una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 20, o un vector de expresión de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 14 o 15, para su uso como un medicamento.
- 20 22. Un anticuerpo de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 12, un inmunocombinado de acuerdo con la reivindicación 18, una molécula biespecífica o multiespecífica de acuerdo con la reivindicación 19, una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 20, o un vector de expresión de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 14 o 15, para su uso en un método de tratamiento o prevención de una enfermedad o trastorno que implica células que expresan CD38 en donde la enfermedad o el trastorno se selecciona del grupo que consiste en
- 25 linfoma/leucemias de células B, incluyendo leucemia/linfoma linfoblástico de células B precursoras, y linfomas no Hodgkin de células B; leucemia linfoblástica aguda; neoplasias de células B maduras, incluyendo leucemia linfocítica crónica de células B (CLL)/linfoma linfocítico pequeño (SLL); leucemia linfocítica aguda de células B; leucemia prolinfocítica de células B; linfoma linfoplasmácítico; linfoma de células del manto (MCL); linfoma folicular (FL), incluyendo FL de grado bajo, de grado intermedio y de grado alto; linfoma cutáneo del centro folicular; linfoma de células B de la zona marginal, incluyendo de tipo MALT, de tipo nodal y de tipo esplénico; tricoleucemia; linfoma difuso de células B grandes; linfoma de Burkitt; plasmacitoma; mieloma de células plasmáticas; leucemia de células plasmáticas; trastorno linfoproliferativo post-trasplante; macroglobulinemia de Waldenström; leucemias de células plasmáticas; linfoma anaplásico de células grandes (ALCL); mieloma múltiple; linfoma de Hodgkin; neoplasias de células T y células NK maduras, incluyendo leucemia prolinfocítica de células T; leucemia linfocítica granular de células T grandes; leucemia agresiva de células NK; leucemia/linfoma de células T adultas; linfoma extranodal de células NK/T; linfoma de células T de tipo enteropático de tipo nasal; linfoma hepatoesplénico de células T; linfoma subcutáneo de células T similar a la paniculitis; linfoma blástico de células NK; micosis fungoide/síndrome de Sezary; trastornos linfoproliferativos cutáneos primarios de células T positivas a CD30, incluyendo linfoma anaplásico de células grandes cutáneo C-ALCL, papulosis linfomatoide y lesiones en el borde; linfoma angioinmunoblástico de
- 30 células T, linfoma inespecífico periférico de células T; linfoma anaplásico de células grandes; leucemia mieloides aguda, incluyendo leucemia promielocítica aguda; y enfermedades mieloproliferativas crónicas, incluyendo leucemia mieloides crónica.
- 35 23. El anticuerpo, inmunocombinado, molécula biespecífica o multiespecífica, composición farmacéutica o vector de expresión para su uso de acuerdo con la reivindicación 22, en donde el linfoma no Hodgkin de células B se selecciona entre el grupo que consiste en granulomatosis linfomatoide; linfoma de efusión primario; linfoma intravascular de células B grandes; linfoma mediastinal de células B grandes; enfermedades de la cadena pesada, incluyendo enfermedad de  $\gamma$ ,  $\mu$  y  $\alpha$ ; linfomas inducidos por terapia con agentes inmunosupresores, incluyendo linfoma inducido por ciclosporina; y linfoma inducido por metotrexato.
- 40 45 50 24. El anticuerpo, inmunocombinado, molécula biespecífica o multiespecífica, composición farmacéutica o vector de expresión para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 21 a 23, en donde el método comprende la administración de uno o más agentes terapéuticos adicionales al sujeto.
- 55 25. El anticuerpo, inmunocombinado, molécula biespecífica o multiespecífica, composición farmacéutica o vector de expresión para su uso de acuerdo con la reivindicación 24, en donde los uno o más agentes terapéuticos adicionales se seleccionan entre un agente quimioterapéutico, un agente antiinflamatorio, o un agente inmunosupresor y/o inmunomodulador.
- 60 65 26. El anticuerpo, inmunocombinado, molécula biespecífica o multiespecífica, composición farmacéutica o vector de expresión para su uso de acuerdo con la reivindicación 25, los uno o más agentes terapéuticos se seleccionan entre el grupo que consiste en cisplatino, gefitinib, cetuximab, rituximab, bevacizumab, erlotinib, bortezomib, talidomida, pamidronato, ácido zoledrónico, clodronato, risendronato, ibandronato, etidronato, alendronato, tiludronato, trióxido de arsénico, lenalidomida, filgrastim, pegfilgrastim, sargramostim, ácido suberoilánilida hidroxámico, y SCIO-469.
27. Un método *in vitro* para detectar la presencia de un antígeno CD38, o de una célula que expresa CD38, en una

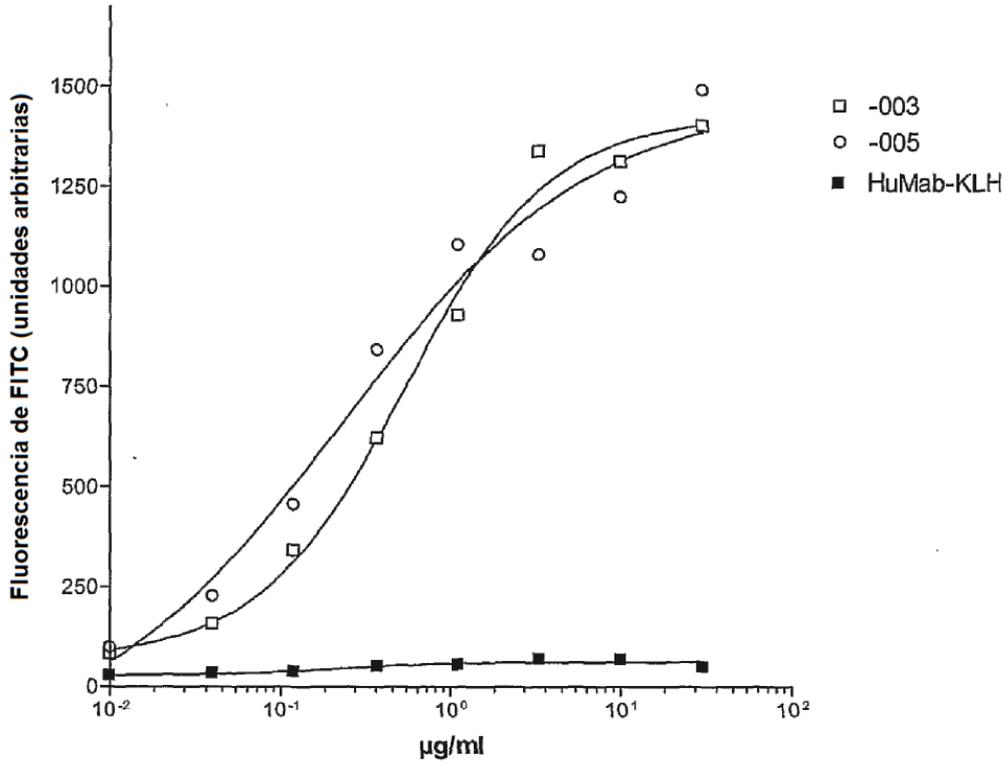
muestra que comprende:

- a) poner en contacto la muestra con un anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 en condiciones que permitan la formación de un complejo entre el anticuerpo y CD38; y
- b) detectar la formación de un complejo.

5

FIGURA 1

A:



B:

Unión de -024 en células CHO-CD38.

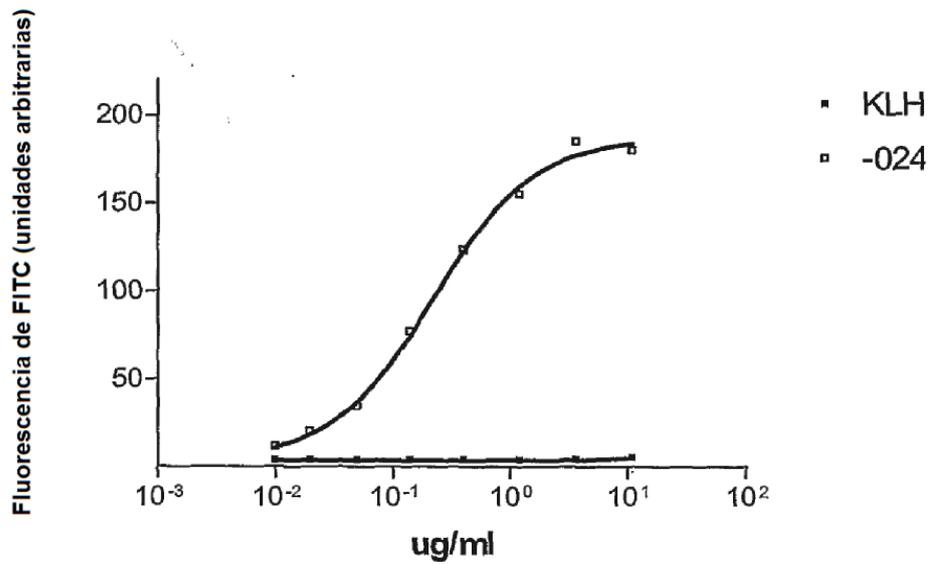
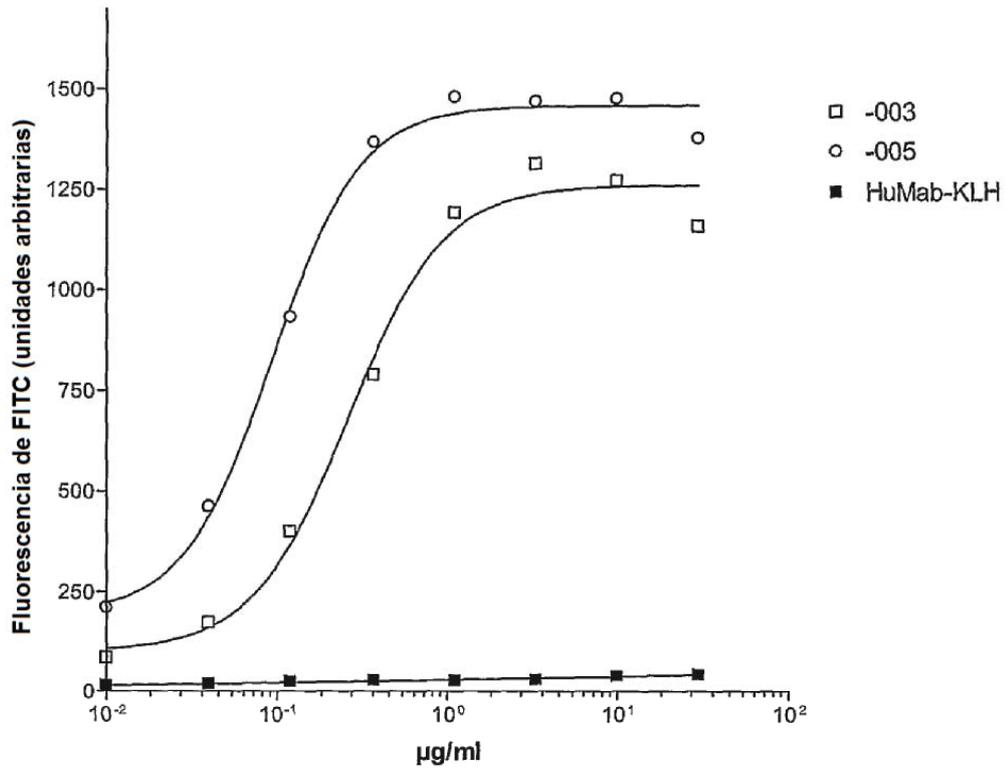


FIGURA 2

A:



B:

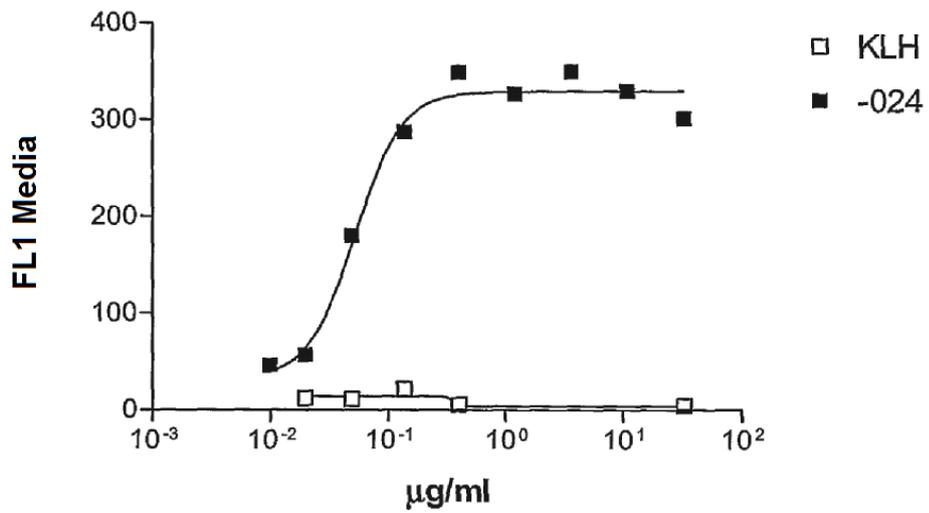


FIGURA 3

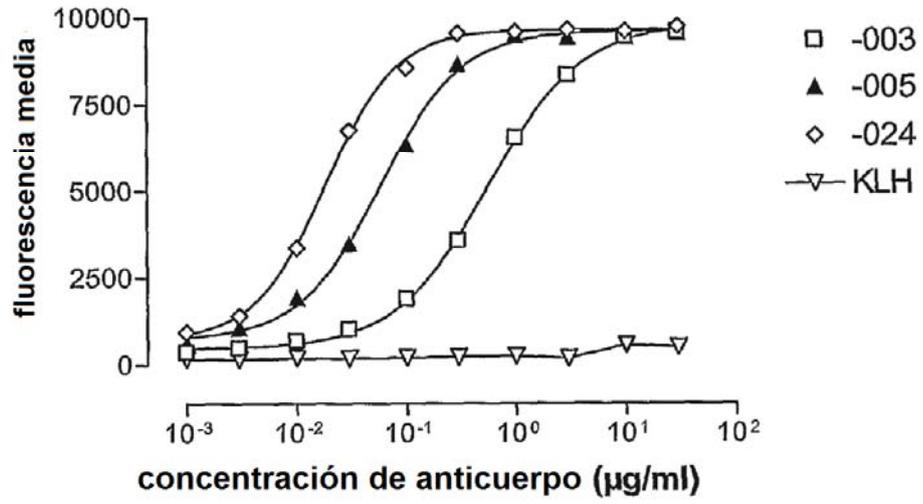


FIGURA 4

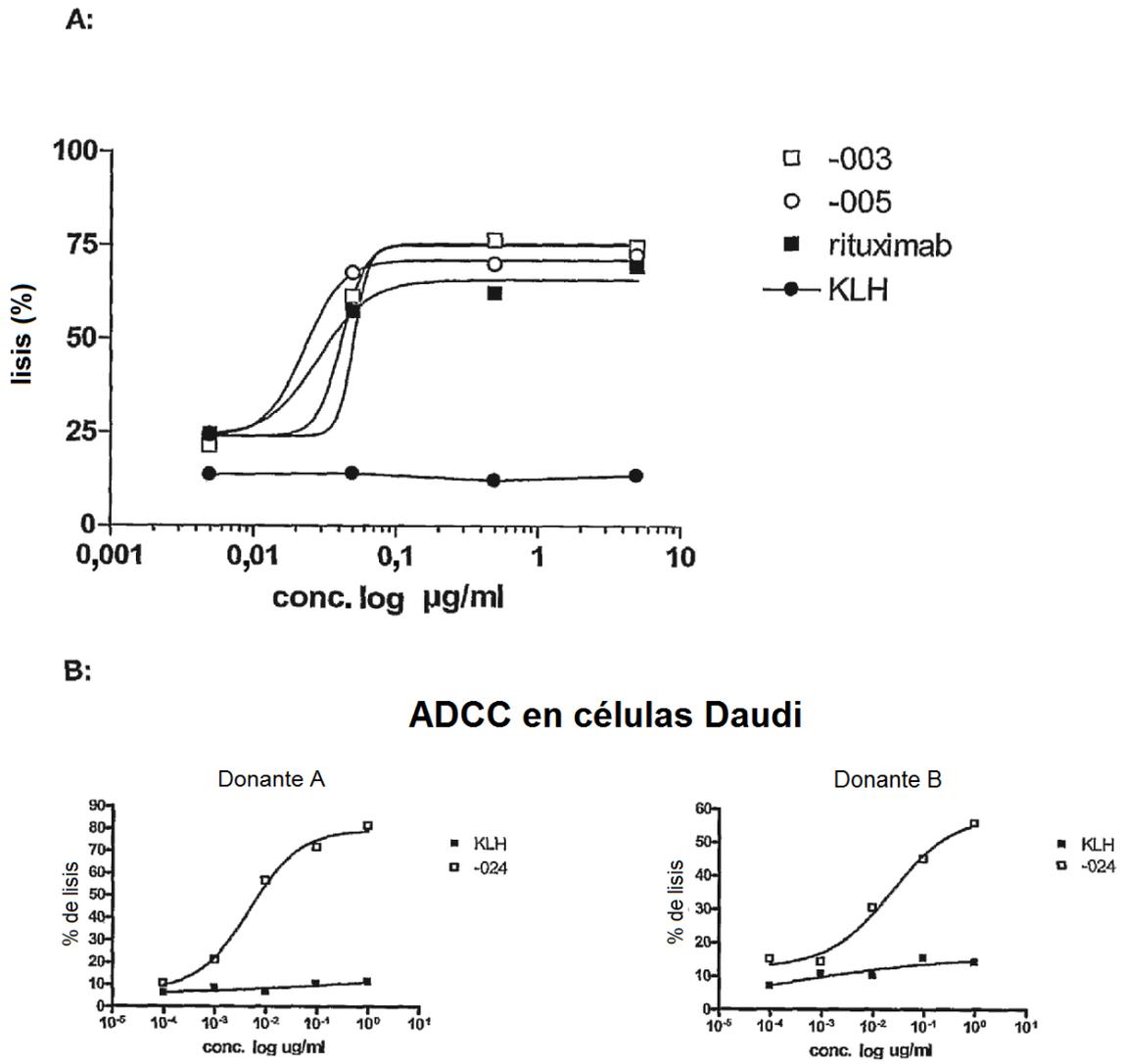
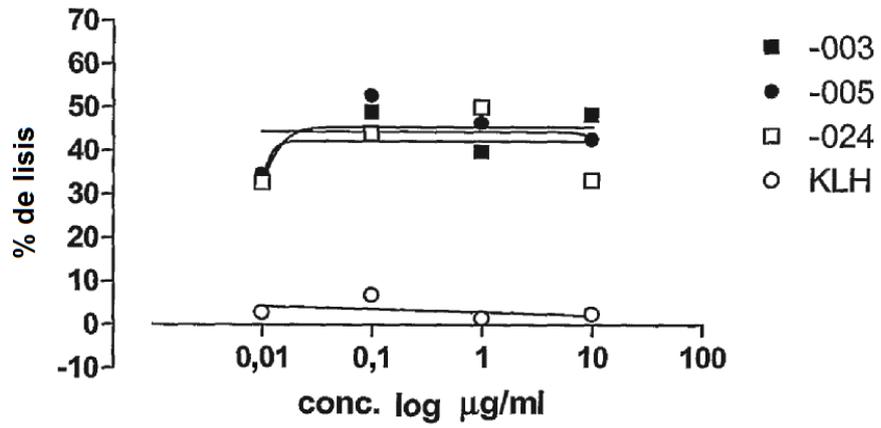


FIGURA 5 (1/2)

A:



B:

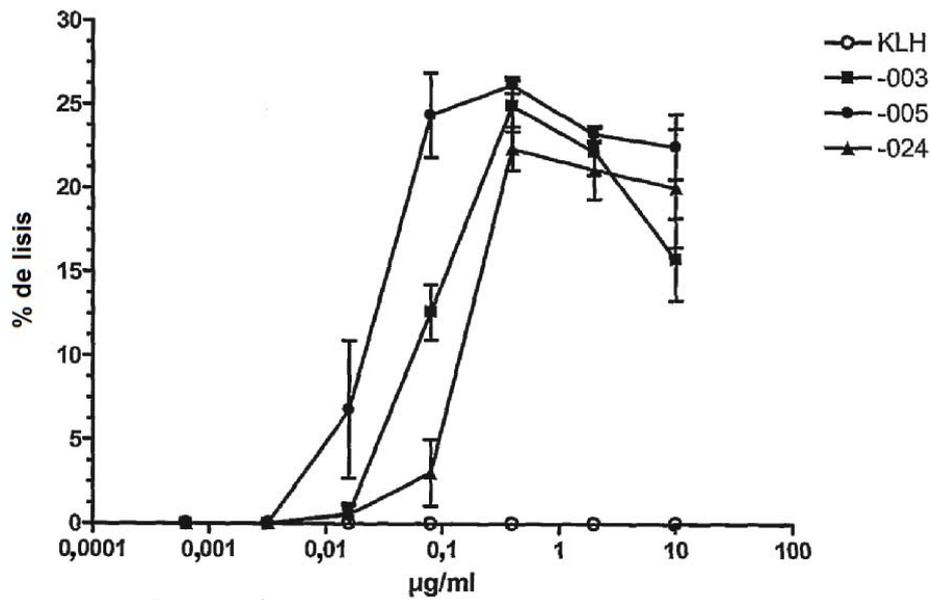


FIGURA 6

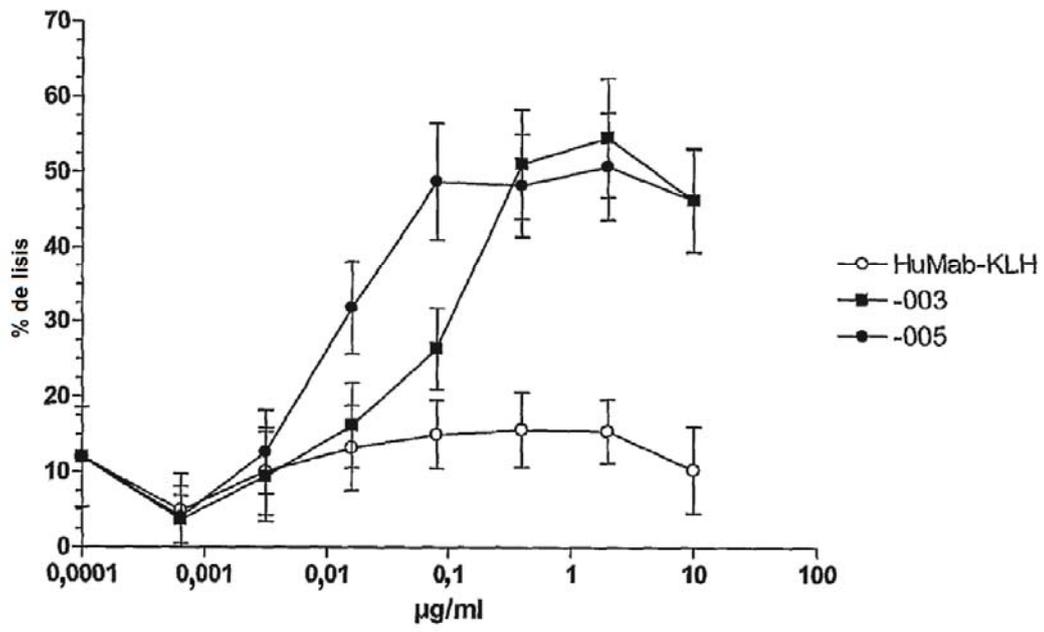


FIGURA 7

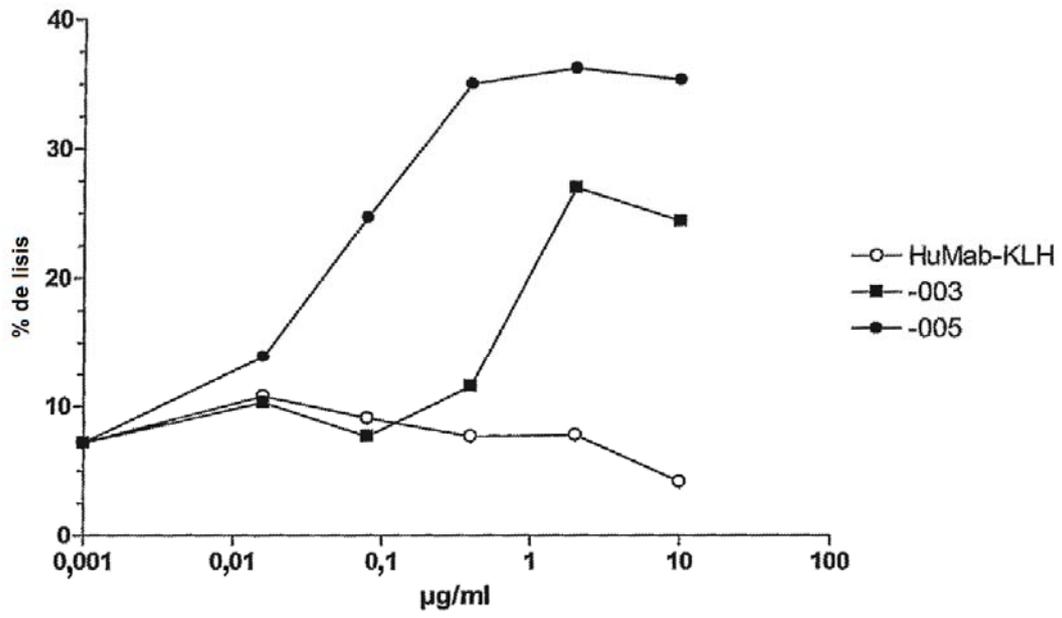


FIGURA 8

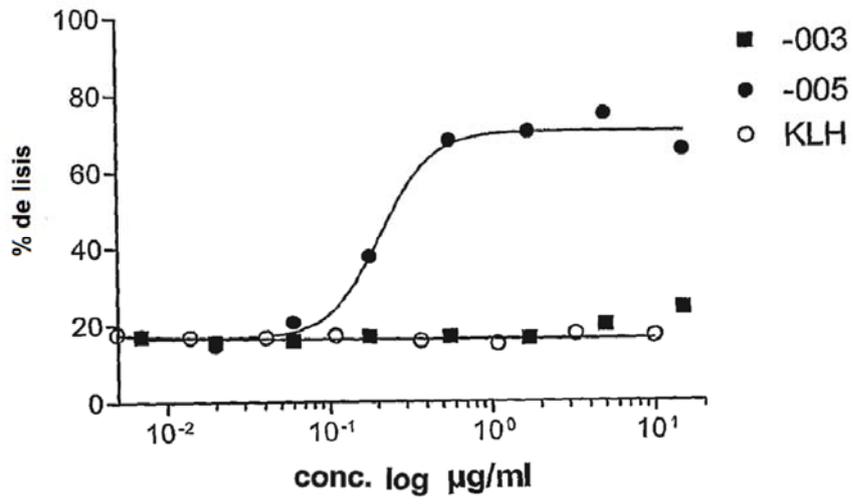
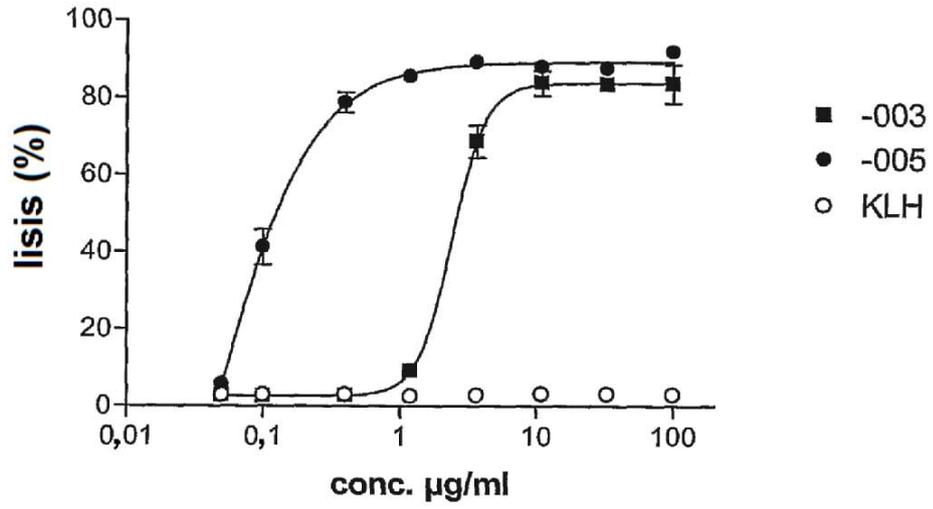


FIGURA 9

A:



B:

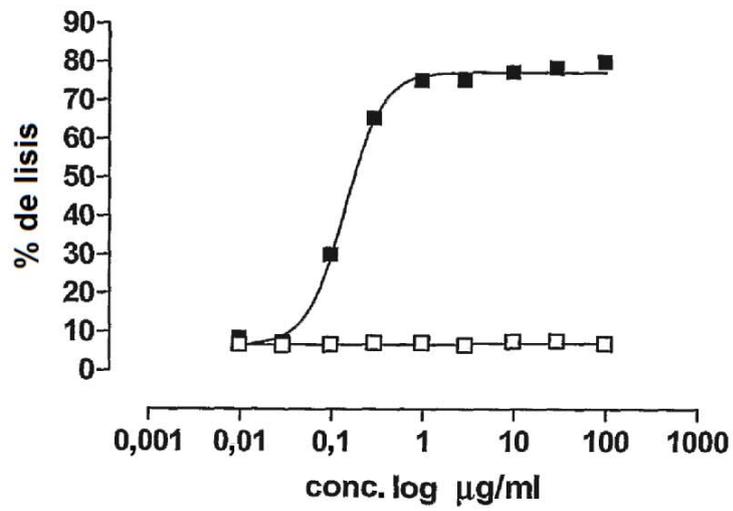
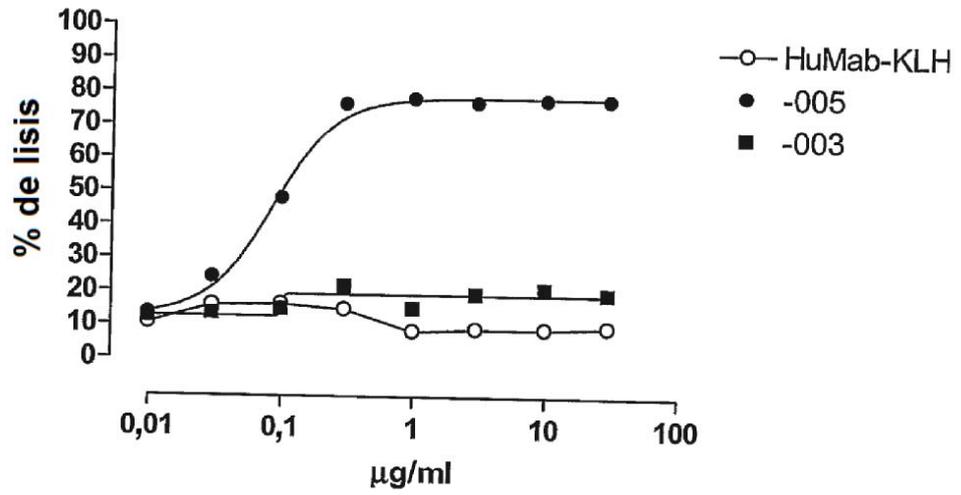


FIGURA 10 (1/3)

A:



B:

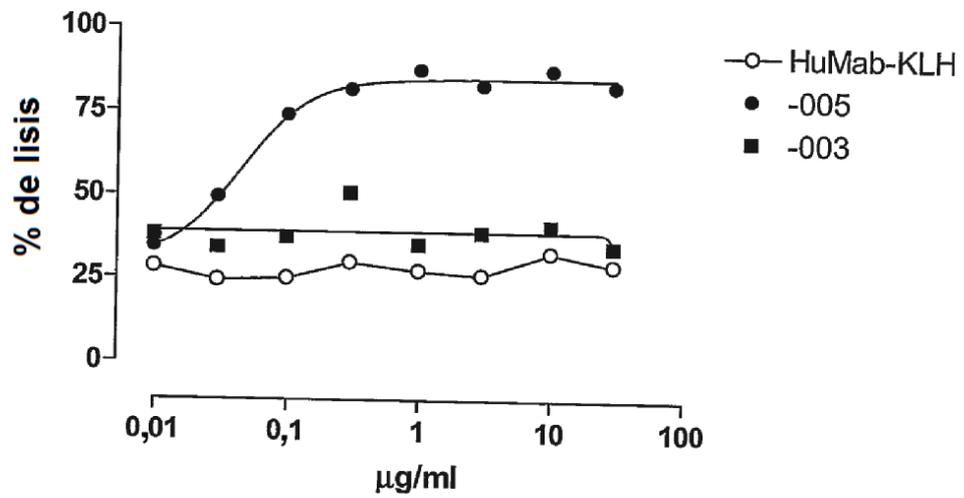
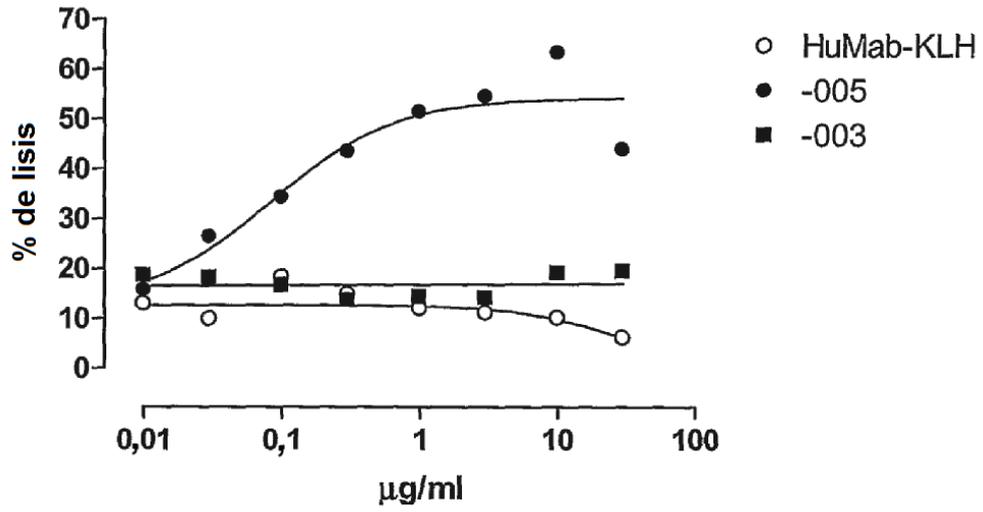


FIGURA 10 (2/3)

C:



D:

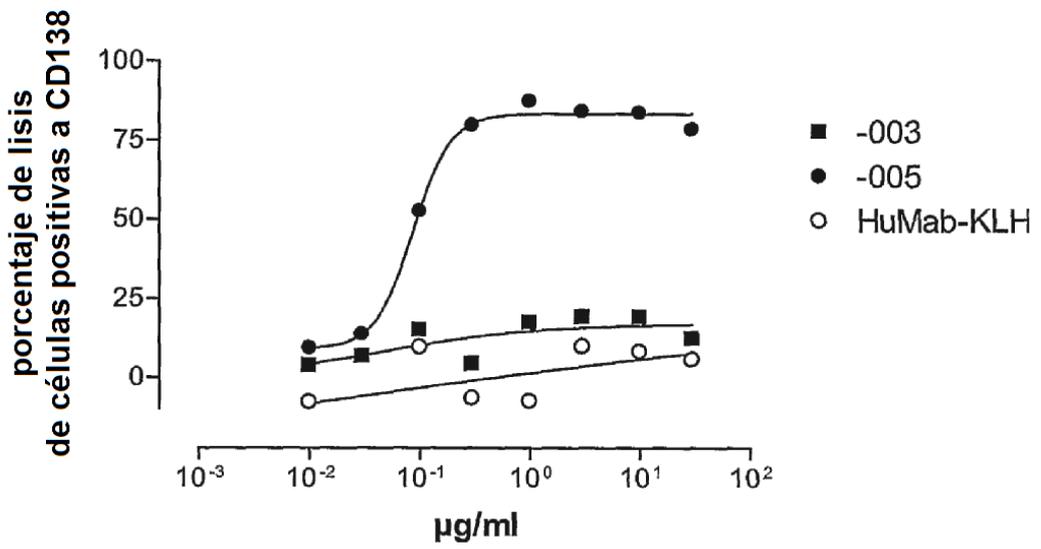


FIGURA 10 (3/3)

E:

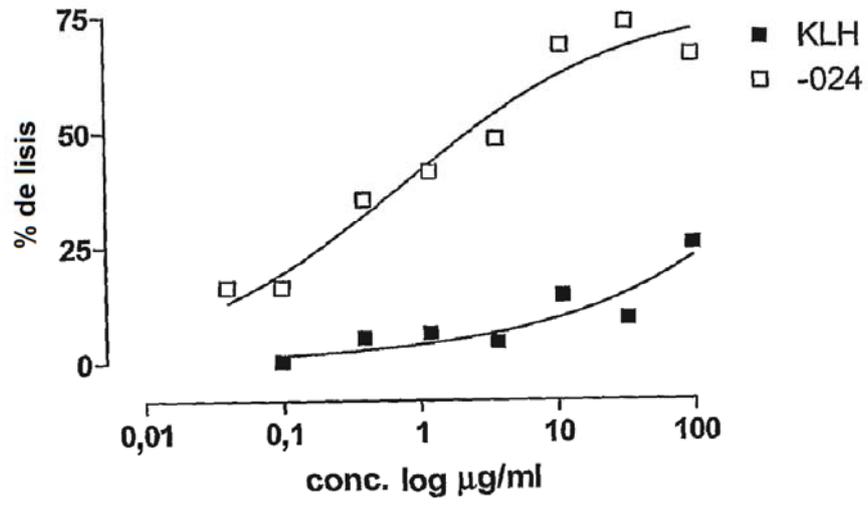
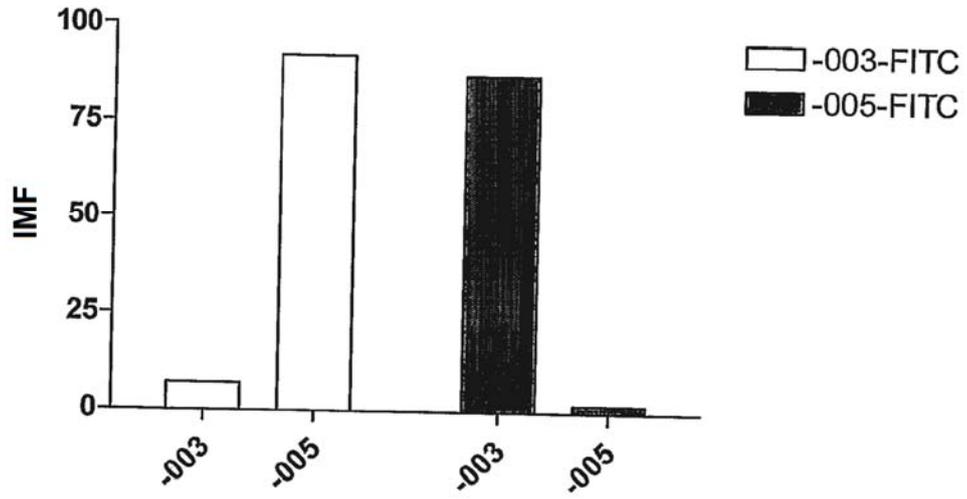
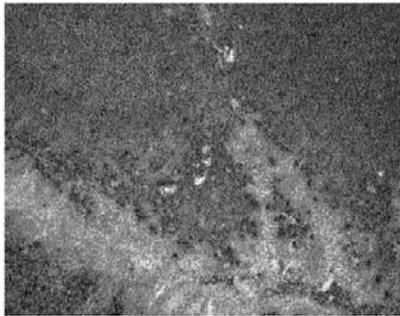


FIGURA 11

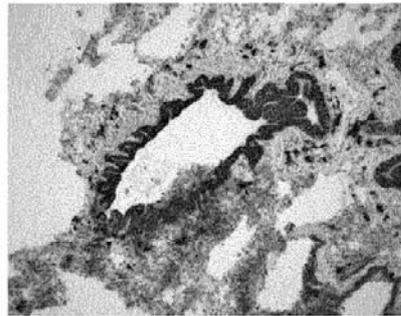


**FIGURA 12**

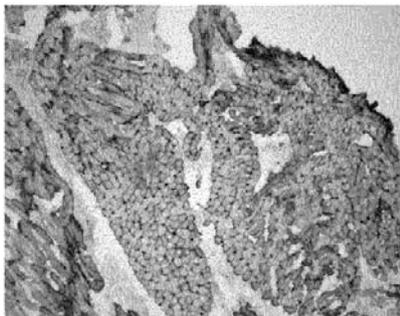
**FIGURA 12A**



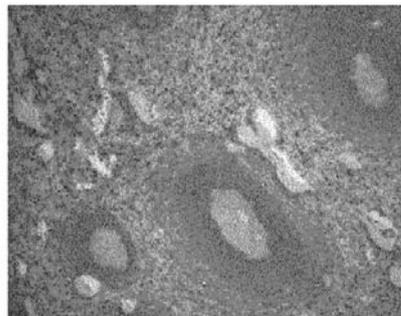
**FIGURA 12B**



**FIGURA 12C**

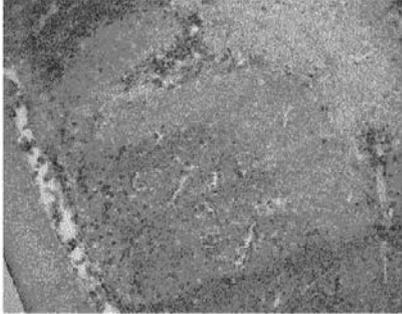


**FIGURA 12D**

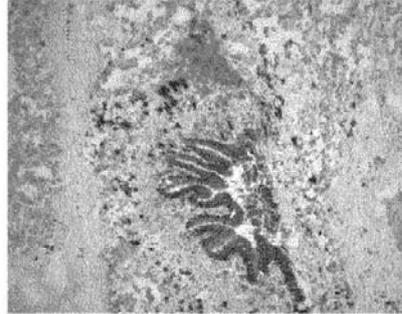


**FIGURA 13**

**FIGURA 13A**



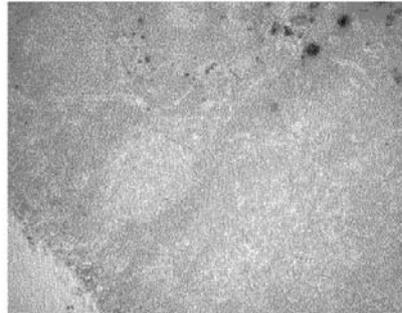
**FIGURA 13B**



**FIGURA 13C**



**FIGURA 13D**



**FIGURA 14**

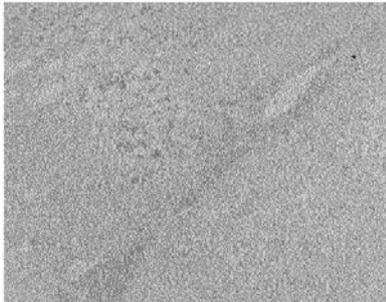
**14A**



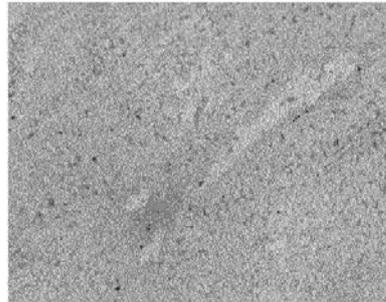
**14B**



**14C**



**14D**



**14E**

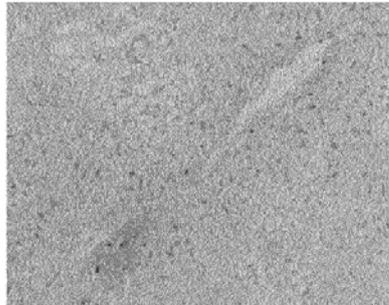


FIGURA 15 (1/2)

FIGURA 15A

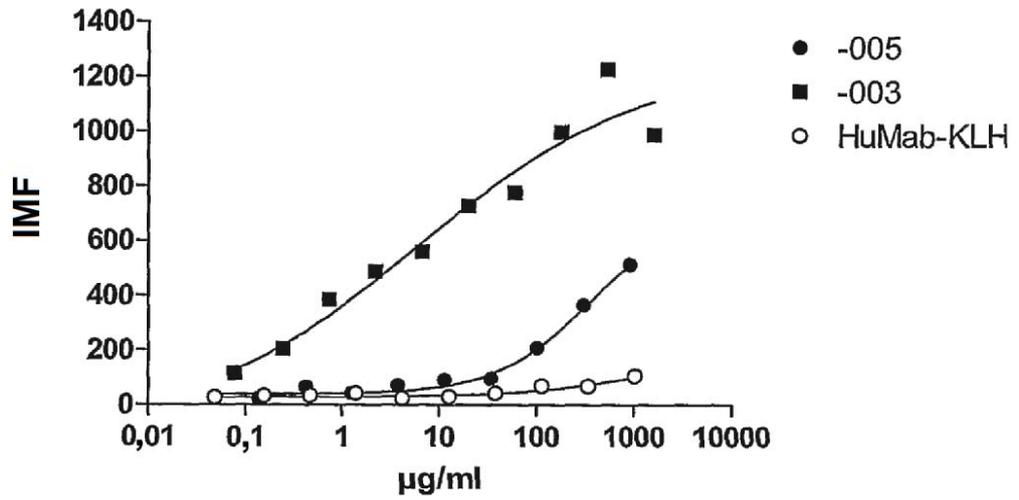


FIGURA 15B

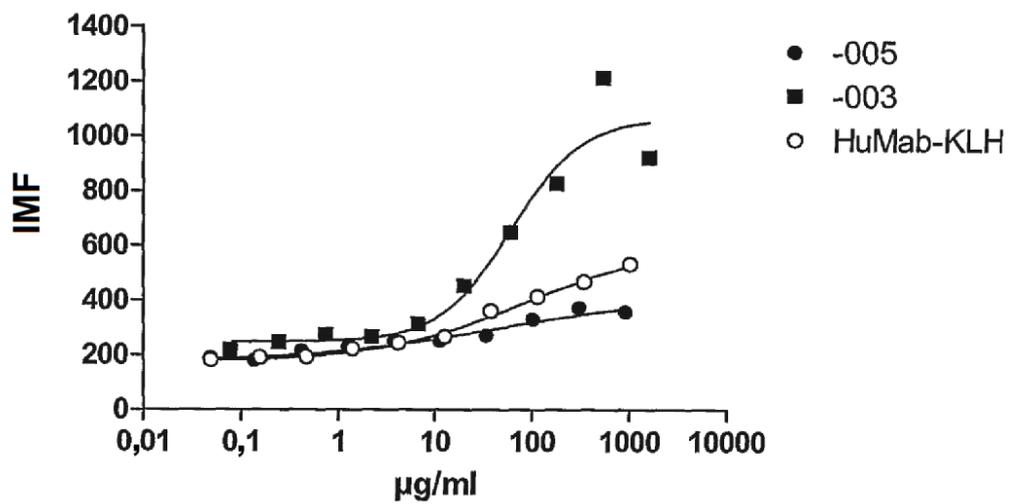


FIGURA 15 (2/2)

FIGURA 15C

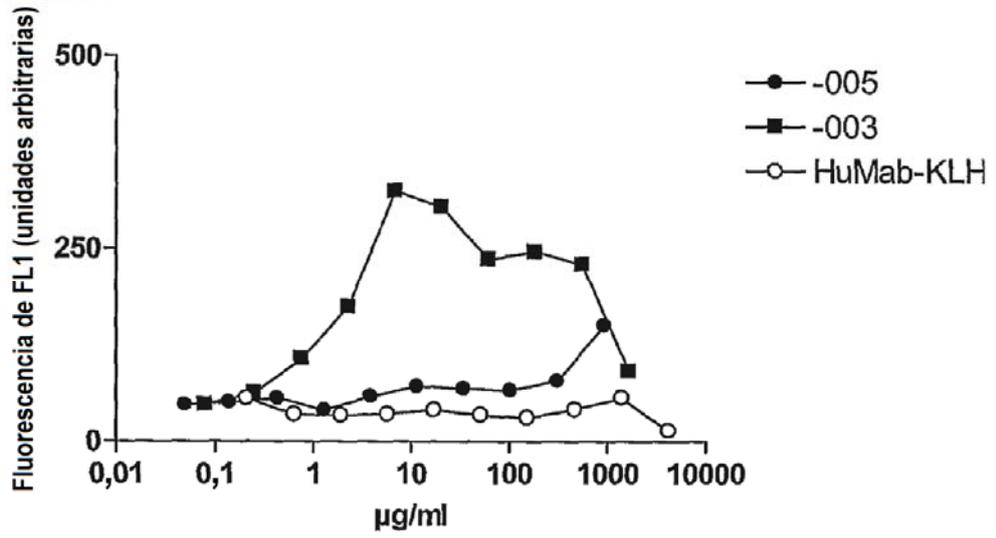


FIGURA 16

FIGURA 16A

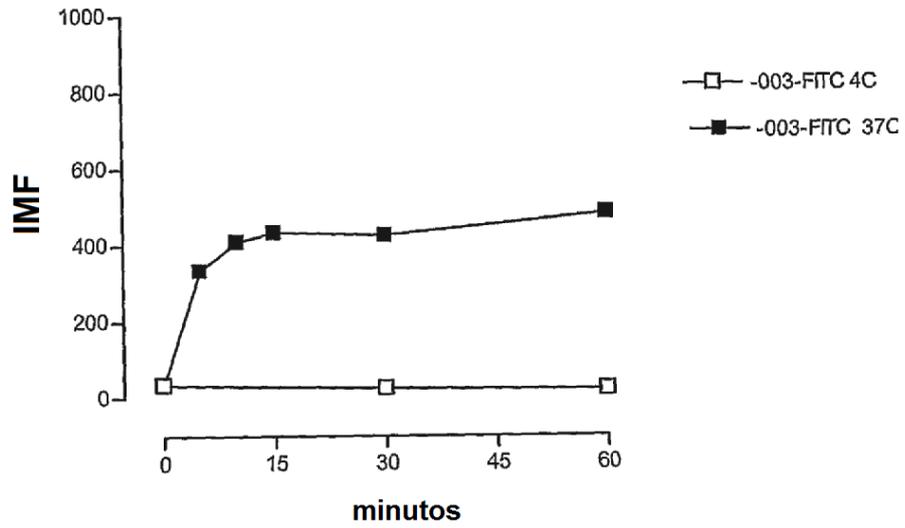


FIGURA 16B

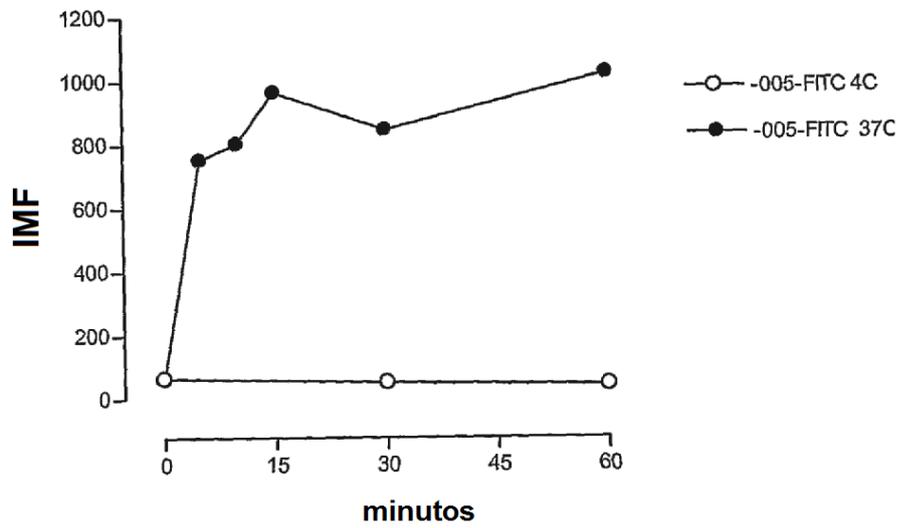


FIGURA 17 (1/2)

FIGURA 17A

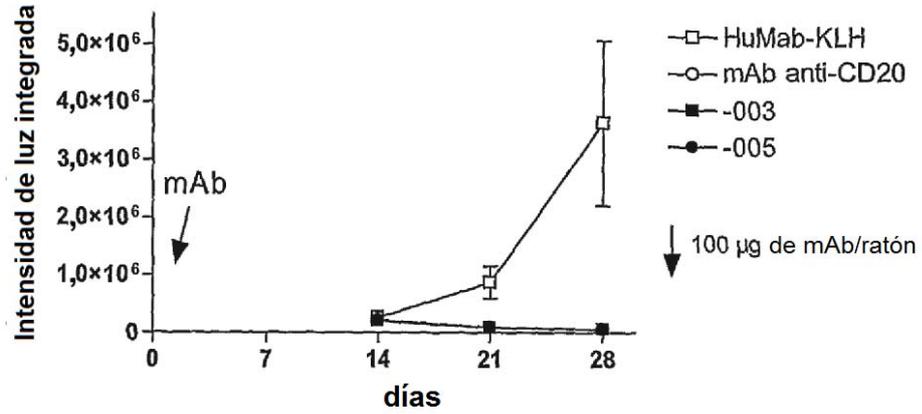


FIGURA 17B

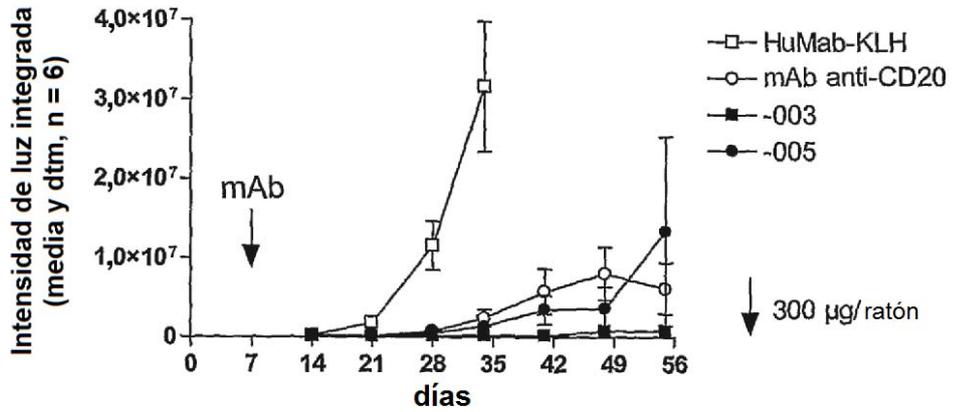


FIGURA 17 (2/2)

FIGURA 17C

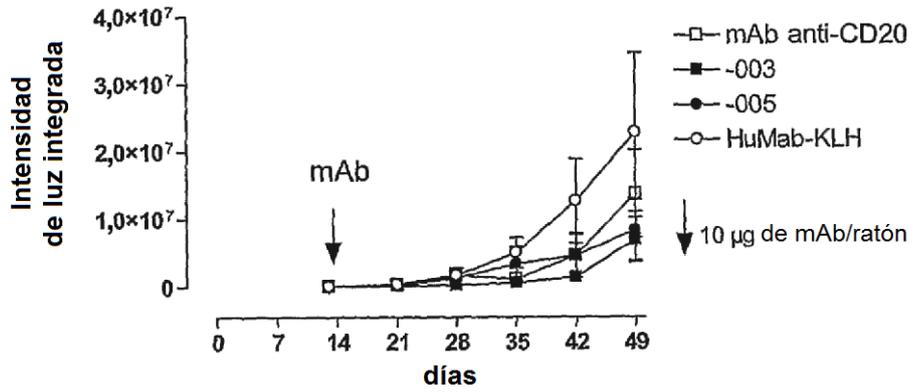


FIGURA 17D

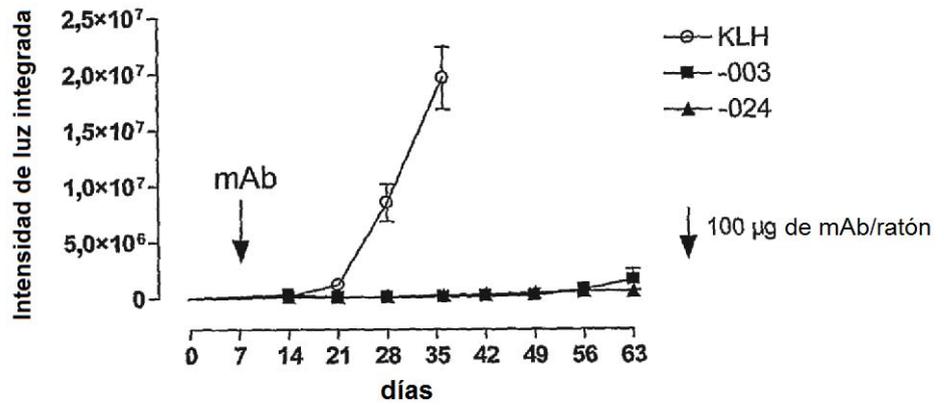


FIGURA 18

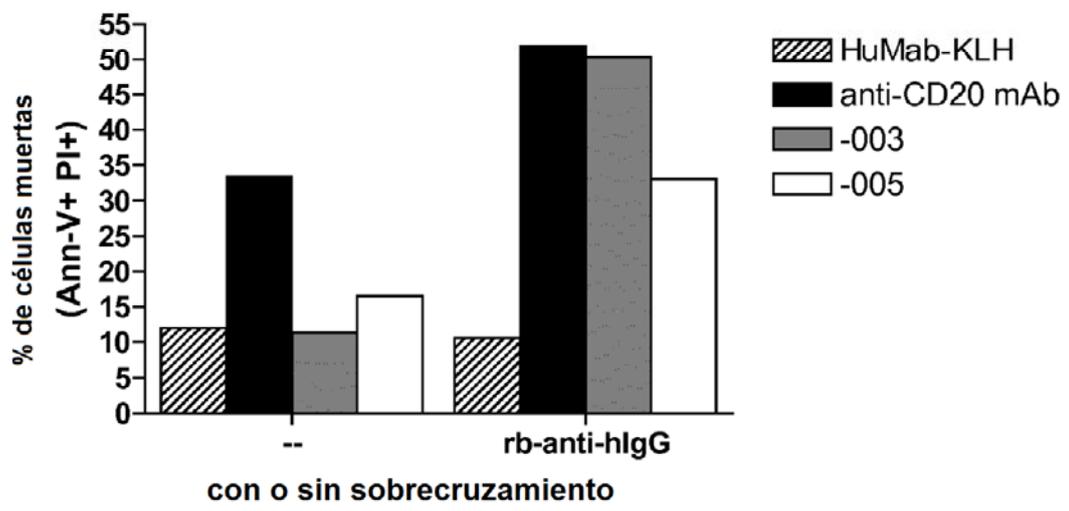


FIGURA 19

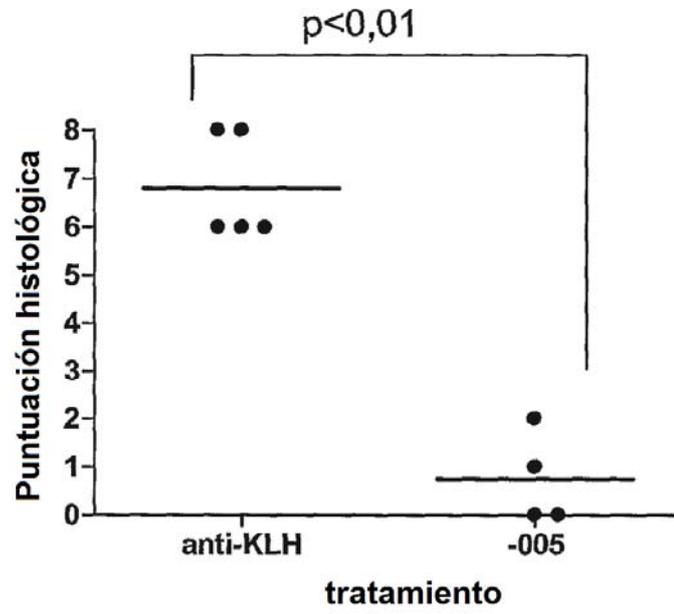
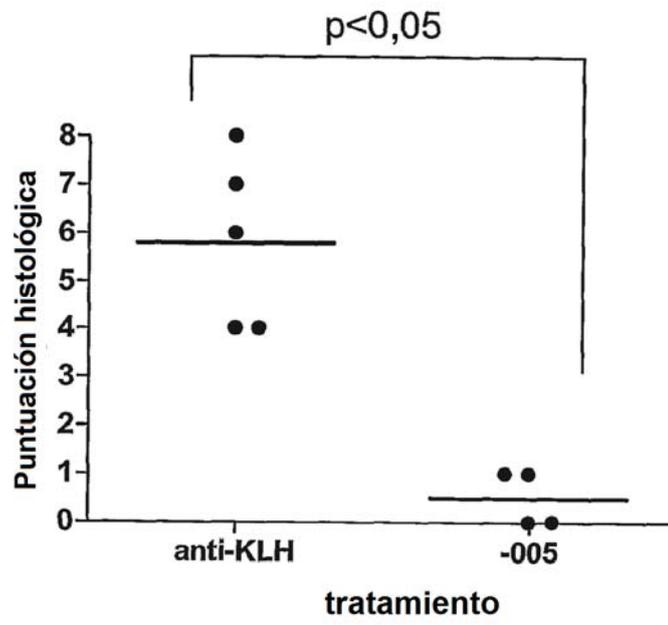
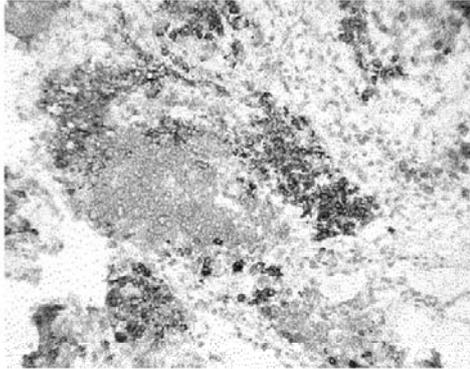


FIGURA 20

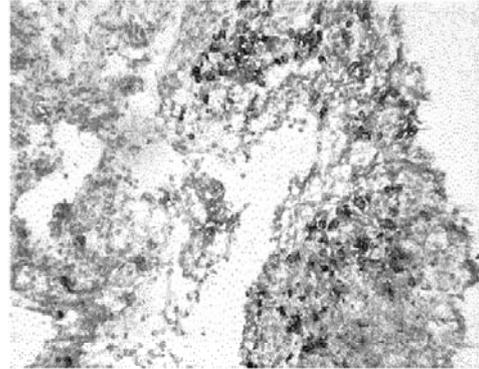


**FIGURA 21**

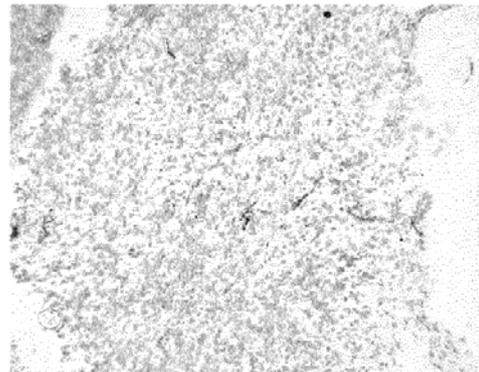
**A**



**B**

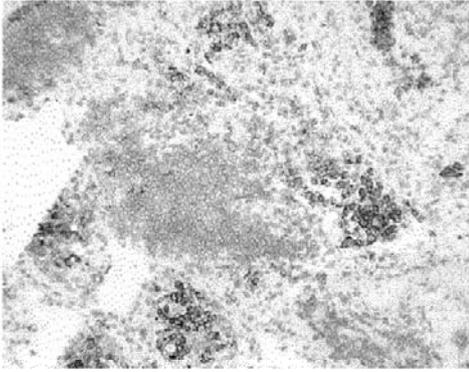


**C**

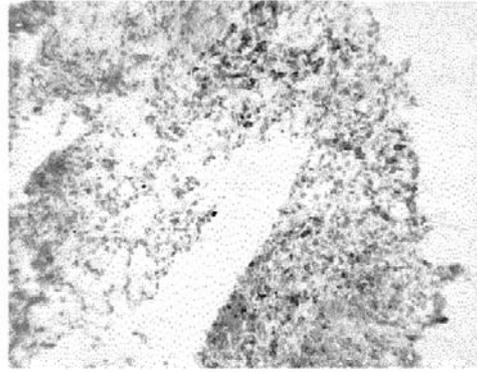


**FIGURA 22**

**A**



**B**



**C**

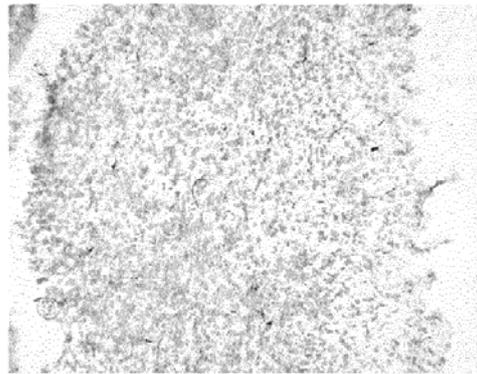


FIGURA 23

A:

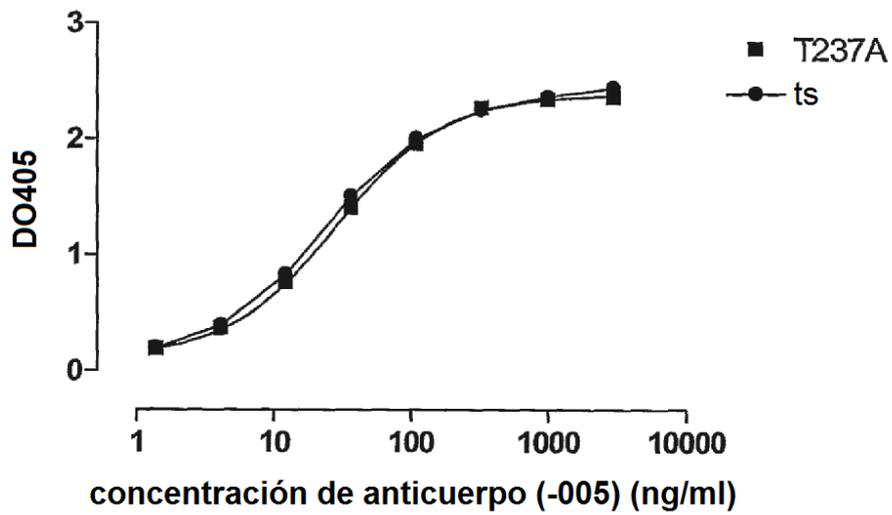
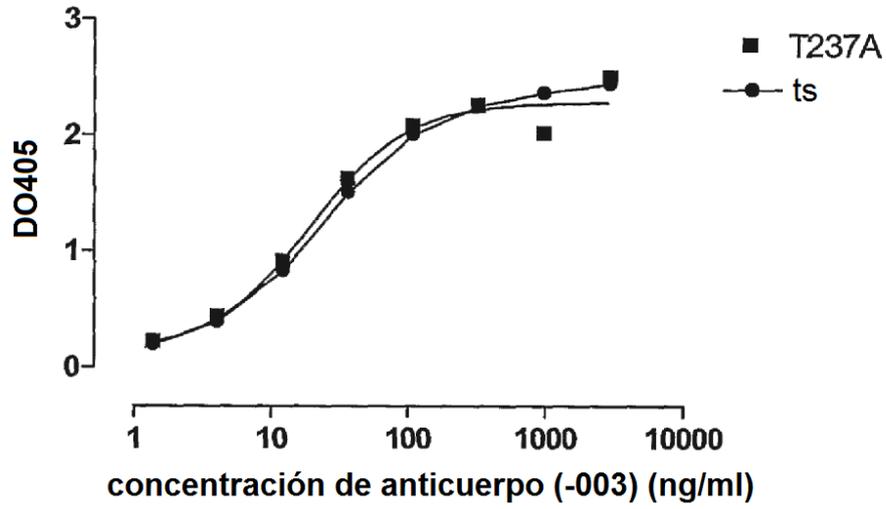


FIGURA 23

B:

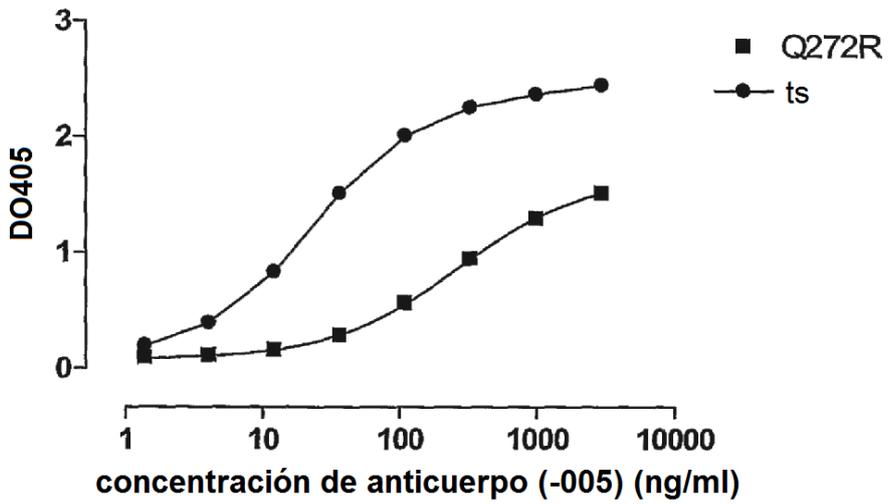
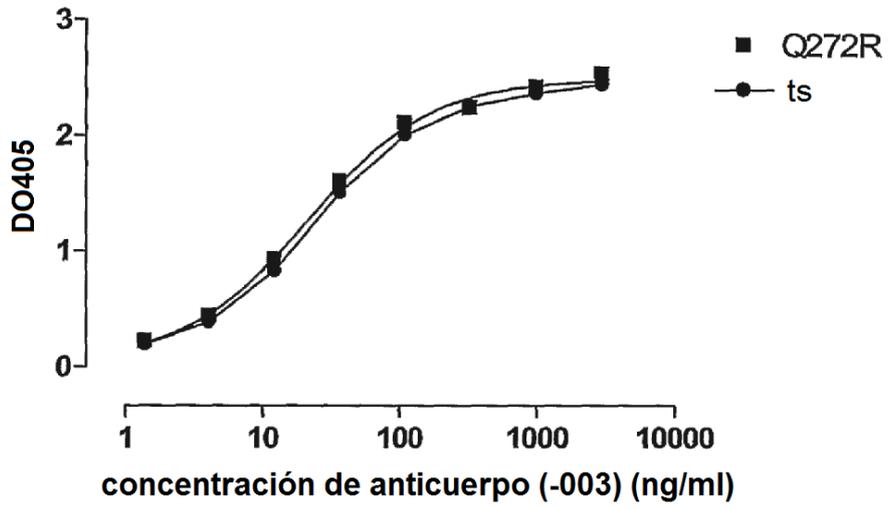


FIGURA 23

C:

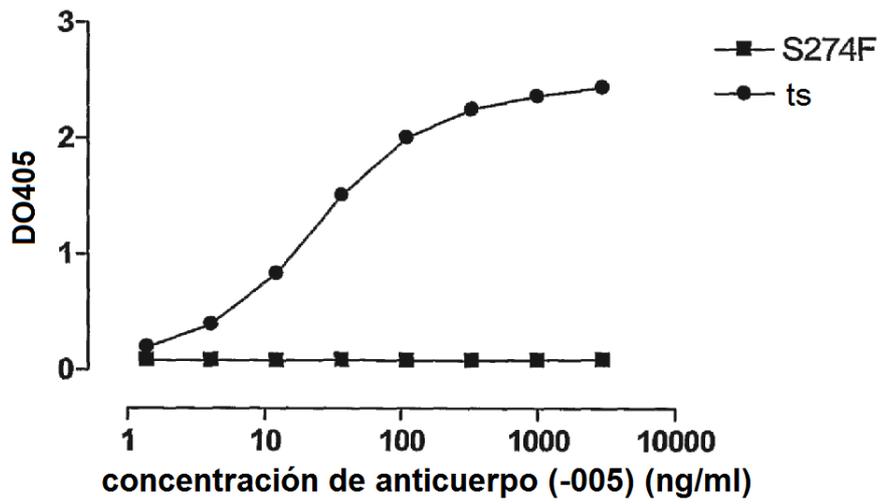
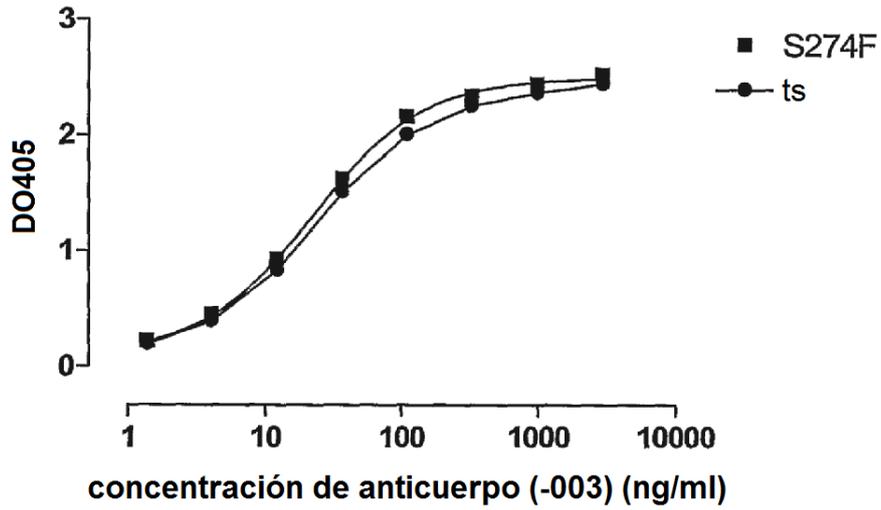
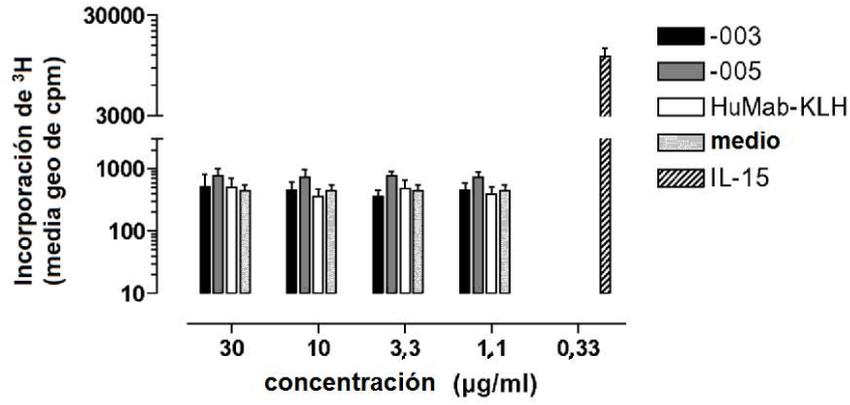
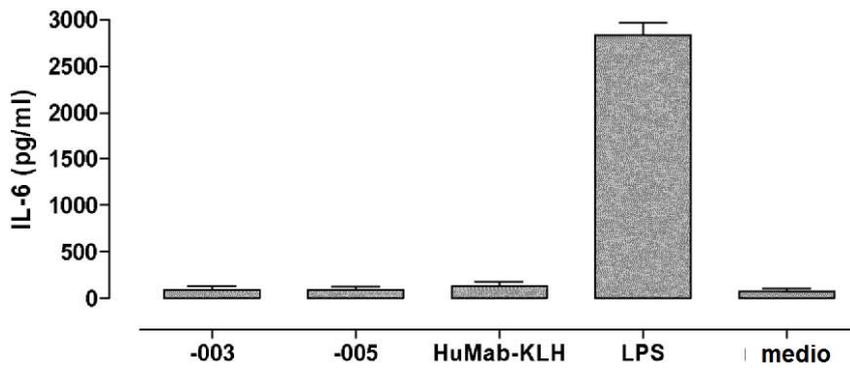


FIGURA 24

A:



B:



C:

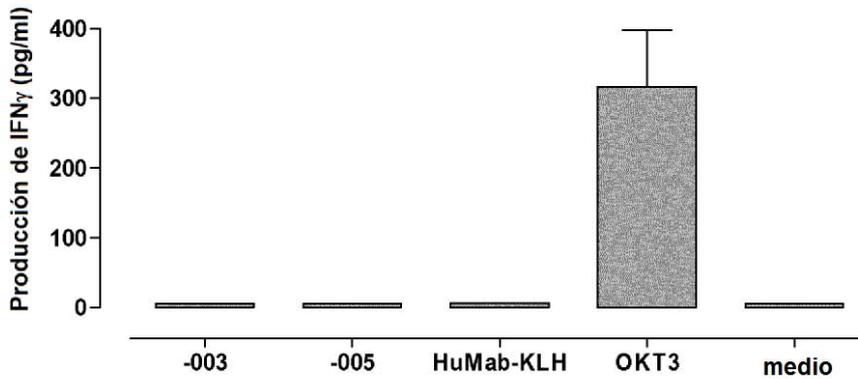
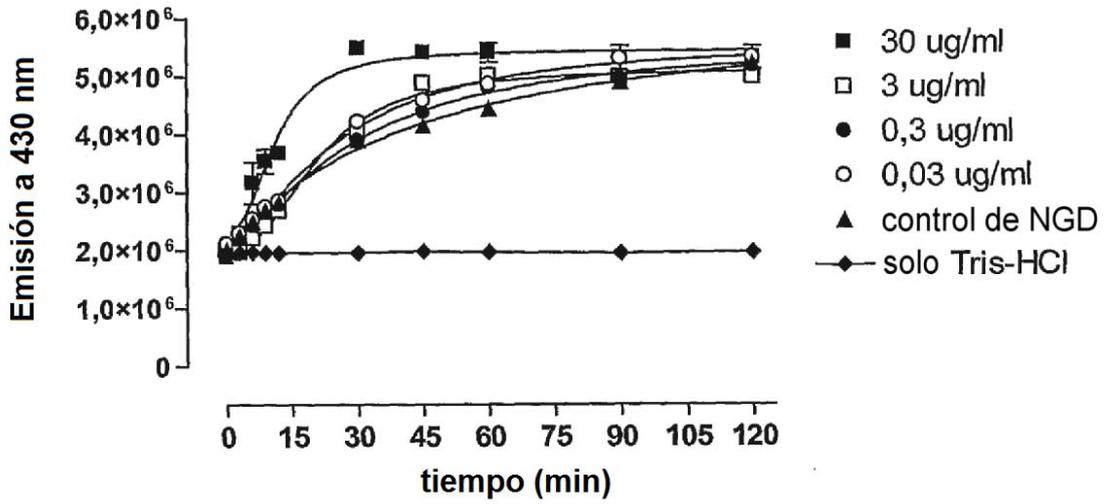


FIGURA 25 (1/2)

A



B

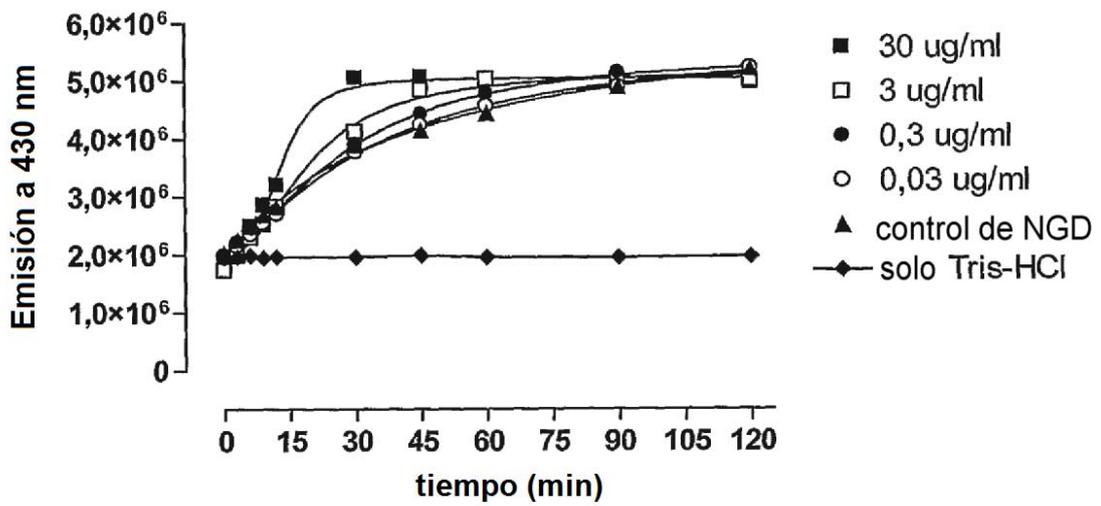
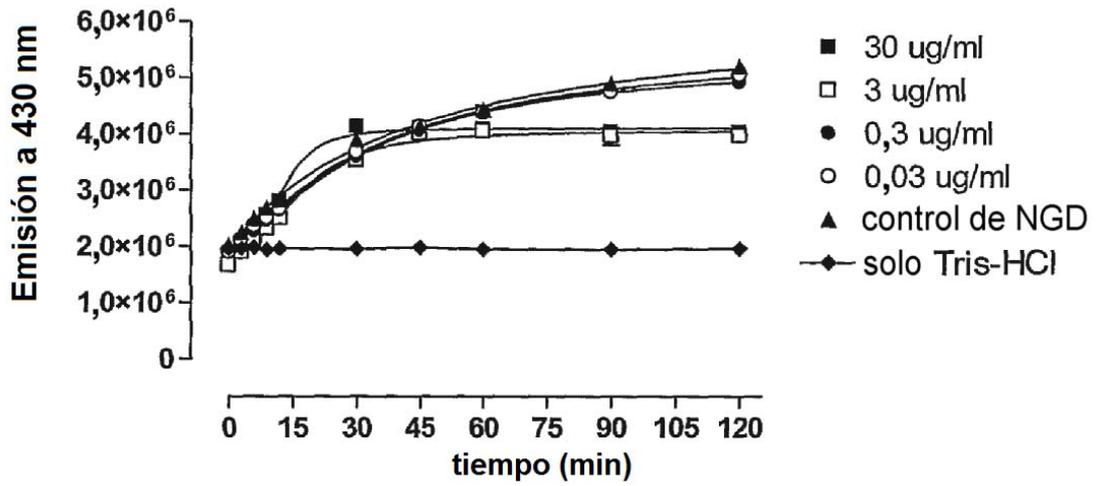


FIGURA 25 (2/2)

C



D

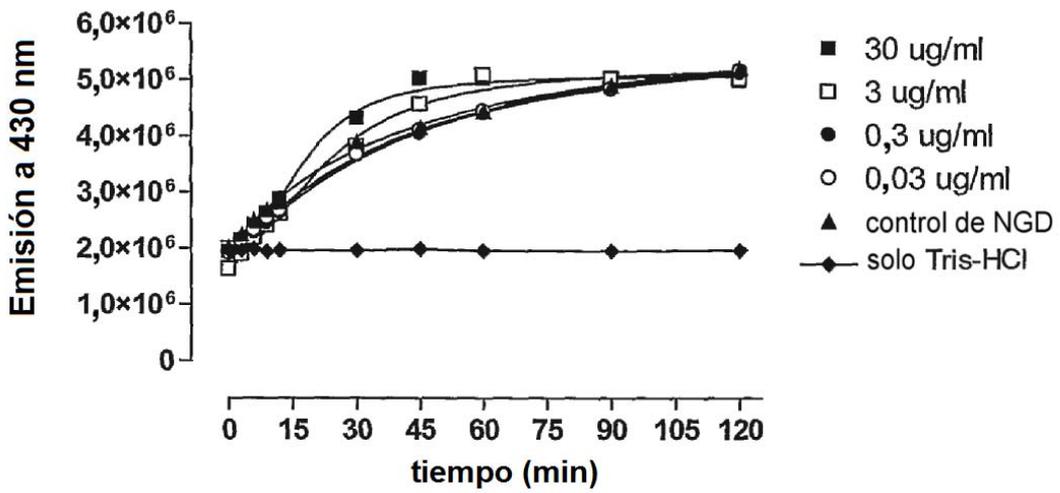
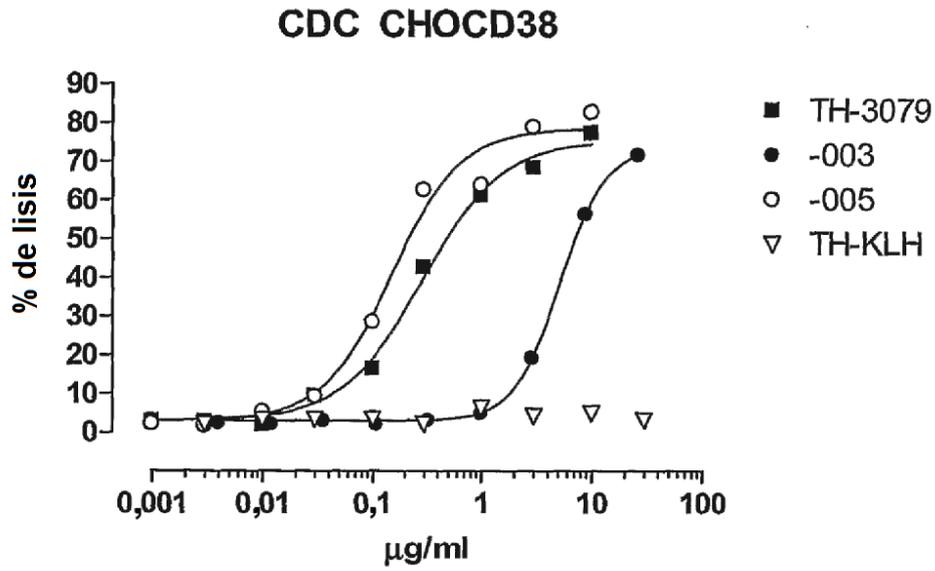


FIGURA 26 (1/2)

A



B

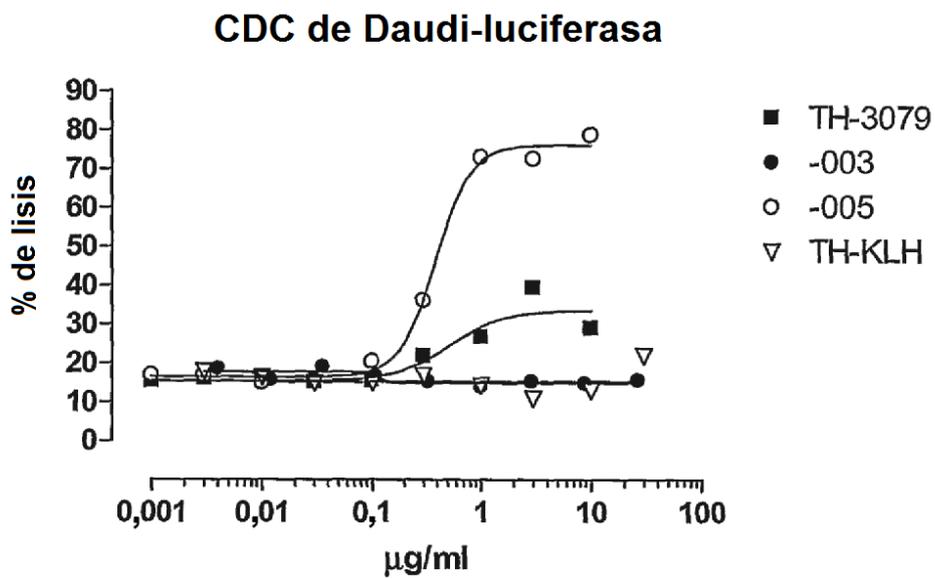


FIGURA 26 (2/2)

C

Donante B de células Daudi

