

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 732 278**

51 Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)

A61K 31/573 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.09.2007 PCT/DK2007/000418**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.04.2008 WO08037257**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.09.2007 E 07817816 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.04.2019 EP 2081595**

54 Título: **Anti-CD38 más corticosteroides más un agente quimioterapéutico no corticosteroideo para el tratamiento de tumores**

30 Prioridad:

26.09.2006 DK 200601232
26.09.2006 US 847329 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
21.11.2019

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

WINKEL, JAN VAN DE;
PARREN, PAUL;
GRAUS, YVO;
OPRINS, JUDITH;
WEERS, MICHEL DE;
VUGT, MARTINE VAN;
BAADSGAARD, OLE y
LISBY, STEEN

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

Observaciones:

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

ES 2 732 278 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

Anti-CD38 más corticosteroides mas un agente quimioterapéutico no corticosteroideo para el tratamiento de tumores

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere al tratamiento del cáncer utilizando una terapia combinada que comprende un anticuerpo que se une a CD38, un corticosteroide y un agente quimioterapéutico no corticosteroideo.

10 Antecedentes

El mieloma múltiple es una neoplasia maligna de células B caracterizada por la acumulación latente en la médula ósea de células plasmáticas secretoras con un índice de proliferación bajo y una vida útil prolongada. En última instancia, la enfermedad ataca los huesos y la médula ósea, lo que produce múltiples tumores y lesiones en todo el sistema esquelético.

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

Las terapias disponibles actualmente para el mieloma múltiple incluyen quimioterapia, trasplante de células madre, Thalomid® (talidomida), Velcade® (bortezomib), Aredia® (pamidronato) y Zometa® (ácido zoledrónico). Los protocolos de tratamiento actuales, que incluyen una combinación de agentes quimioterapéuticos tales como vincristina, BCNU, melfalán, ciclofosfamida, adriamicina y prednisona o dexametasona, producen una tasa de remisión completa de solo aproximadamente 5%, y la supervivencia media es de aproximadamente 36-48 meses desde el momento del diagnóstico. Los avances recientes en el uso de quimioterapia de dosis altas seguida de trasplante de células mononucleares de médula ósea autóloga o sangre periférica han aumentado la tasa de remisión completa y la duración de la remisión. Sin embargo, la supervivencia general solo se ha prolongado ligeramente y no se ha obtenido evidencia de cura. En última instancia, todos los pacientes con MM recaen, incluso bajo terapia de mantenimiento con interferón alfa (IFN- α) solo o combinado con esteroides.

Si un paciente es candidato o posible candidato para un trasplante autólogo, la terapia de inducción a menudo implica quimioterapia no alquilante, ya que los agentes alquilantes interfieren en la extracción (recogida de células madre). El régimen preferido es VAD, que permite una cosecha posterior (Wu KL, Clin Lymphoma Myeloma 2005; 6:96). Otra modalidad de tratamiento, sometida a prueba en el contexto de la inducción antes del trasplante, incluye la Talidomida combinada con dexametasona (Cavo M Blood 2005; 106:35).

La eficacia de los regímenes de tratamiento quimioterapéutico disponibles para el MM está limitada por la baja tasa de proliferación celular y el desarrollo de resistencia a múltiples fármacos. Para más de 90% de los pacientes con MM, la enfermedad se vuelve quimiorresistente. Como resultado, se están buscando regímenes de tratamiento alternativos destinados a la inmunoterapia adoptiva dirigida a antígenos de superficie en células plasmáticas.

CD38 es un ejemplo de un antígeno expresado sobre tales células plasmáticas malignas, y se expresa en una variedad de enfermedades hematológicas malignas, que incluyen, entre otras, mieloma múltiple, leucemia linfocítica crónica de células B, leucemia linfocítica aguda de células B, macroglobulinemia de Waldenstrom, 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. La expresión de CD38 se ha descrito en células epiteliales/endoteliales de diferente origen, incluyendo el epitelio glandular en la próstata, las células de los islotes en el páncreas, el epitelio ductal en las glándulas, incluida la glándula parótida, las células epiteliales bronquiales, las células en el testículo y el ovario, y el epitelio tumoral en el adenocarcinoma colorrectal. Las enfermedades en las que podría estar implicada la expresión de CD38 incluyen, pero no se limitan a, carcinomas broncoepiteliales de pulmón, cáncer de mama (que evoluciona a partir de la proliferación maligna del revestimiento epitelial en conductos y lóbulos de la mama), tumores pancreáticos que evolucionan a partir de las células b (insulinomas), tumores que evolucionan desde el epitelio en el intestino (p. ej., adenocarcinoma y carcinoma de células escamosas). En el SNC, los neuroblastomas expresan CD38. Otras enfermedades de este tipo incluyen carcinoma en la glándula prostática, seminomas en los testículos y cáncer de ovario.

Normalmente, el CD38 es expresado por células hemopoyéticas y en tejidos sólidos. Con respecto a las células hemopoyéticas, la mayoría de los timocitos medulares son CD38⁺, las células T y B en reposo y en circulación son CD38 y las células activadas son CD38⁺. CD38 también se expresa en aproximadamente 80% de las células NK en reposo y en los monocitos, y en los linfoblastos del centro germinal de los ganglios linfáticos, las células B en plasma y algunas células intrafoliculares. CD38 también puede ser expresado por células dendríticas. Una proporción significativa de células de médula ósea normales, células precursoras particulares, expresan CD38. Además de las células precursoras linfoides, CD38 también se expresa en eritrocitos y en plaquetas.

Con respecto a los tejidos sólidos, CD38 es expresado en el intestino por las células intraepiteliales y linfocitos de la lámina propia, por células de Purkinje y marañas neurofibrilares en el cerebro, por células epiteliales en la próstata, células β en el páncreas, osteoclastos en el hueso, células de la retina del ojo, y sarcolema del músculo liso y estriado.

Las funciones atribuidas a CD38 incluyen tanto la mediación del receptor en los eventos de adhesión y señalización como la actividad (ecto-) enzimática. Como una ectoenzima, CD38 utiliza NAD^+ como sustrato para la formación de ADP-ribosa cíclica (cADPR) y ADPR, pero también de nicotinamida y ácido nicotínico-adenina dinucleótido fosfato (NAADP). Se ha demostrado que cADPR y NAADP actúan como segundos mensajeros para la movilización de Ca^{2+} . Al convertir NAD^+ en cADPR, el CD38 regula la concentración extracelular de NAD^+ y, por tanto, la supervivencia celular mediante la modulación de la muerte celular inducida por NAD^+ (NCID). Además de la señalización vía Ca^{2+} , la señalización de CD38 se produce a través de interferencias con los complejos antígeno-receptor en las células T y B u otros tipos de complejos receptores, p. ej. moléculas del MHC, y de esta manera está implicada en varias respuestas celulares, pero también en el cambio y la secreción de IgG1.

Los anticuerpos anti-CD38 se describen en la bibliografía, por ejemplo, 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) y en el documento WO2005/103083 (Morphosys). CD38 tiene una serie de funciones, que pueden estar activadas o no por una molécula que se une a CD38. Por ejemplo, el anticuerpo anti-CD38 IB4 de ratón tiene propiedades agonísticas en relación con CD38. Se muestra que IB4 induce la activación de células T como se indica mediante la movilización de Ca^{2+} en células Jurkat (Zubiaur M, et al., J Immunol. 159(1), 193-205 (1997), para inducir una proliferación significativa de células mononucleares de sangre periférica (PBMC), para inducir la liberación de niveles significativos de IL-6 y para inducir la liberación de niveles detectables de IFN- γ (Lande, Zubiaur Morra, Ansiello más arriba).

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

Peipp et al., (2005), Blood, 106, página 944A, resumen 3377 se refieren a anticuerpos para CD38 completamente humanos que desencadenan eficazmente la ADCC y la CDC de células de mieloma múltiple y de leucemia de células plasmáticas.

Weers et al., 1^{er} Joint Meeting of the European National Societies of Immunology, septiembre de 2006, se refieren a HuMax-CD38, un nuevo anticuerpo monoclonal para CD38 humano que media eficazmente la destrucción de células de mieloma múltiple y de leucemia de células plasmáticas. El documento WO 2005/103083 describe regiones de unión a antígeno recombinantes y anticuerpos y fragmentos funcionales que contienen tales regiones de unión a antígeno que son específicas para CD38.

El documento WO 2005/044855 describe métodos de terapia para el tratamiento de un sujeto con mieloma múltiple que comprenden administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo antagonista anti-CD40 o un fragmento de unión a antígeno del mismo.

Compendio de la invención

Un objeto de la invención es proporcionar métodos mejorados para el tratamiento de tumores que expresan CD38 que dan como resultado un aumento de la eficacia y/o una supervivencia prolongada.

La presente invención proporciona así:

(1) Un anticuerpo de isotipo IgG1 humano que se une a CD38 para su uso en el tratamiento del cáncer, en donde el anticuerpo es para su administración, o para ser administrado, en terapia combinada con al menos un corticosteroide, en donde dicho al menos un corticosteroide comprende un glucocorticoide, y al menos un agente quimioterapéutico no corticosteroideo, en donde dicho al menos un agente quimioterapéutico no corticosteroideo comprende (i) talidomida o un análogo de talidomida y/o (ii) un inhibidor de proteasoma, y en donde dicho anticuerpo comprende 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 expuesta en SEQ ID NO: 13, una CDR2 de VL que tiene la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 14 y una CDR3 de VL que tiene la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 15, y la región variable de la cadena pesada comprende una CDR1 de VH que tiene la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 18, una CDR2 de VH que tiene la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 19 y una CDR3 de VH que tiene la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 20.

(2) Un anticuerpo para su uso de acuerdo con la reivindicación 1), en donde a dicho tratamiento le sigue un

trasplante autólogo de células madre periféricas o de médula ósea.

(3) El anticuerpo para su uso de acuerdo con la reivindicación (1) o (2), en donde al menos un agente quimioterapéutico no corticosteroideo comprende adicionalmente un agente citotóxico y/o un inhibidor de la angiogénesis.

(4) El anticuerpo para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores1) - (3), en donde dicho al menos un agente quimioterapéutico no corticosteroideo comprende además un agente alquilante.

(5) El anticuerpo para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores1) - (4), en donde dicho al menos un agente quimioterapéutico no corticosteroideo comprende adicionalmente uno o más agentes seleccionados del grupo que consiste en: melfalán, mecloretamina, tioepa, clorambucilo, carmustina, lomustina, ciclofosfamida, busulfán, dibromomanitol, estreptozotocina, dacarbazina, procarbazona, mitomicina C, cisplatino y otros derivados de platino.

(6) El anticuerpo para su uso de acuerdo con la reivindicación 5), en donde el derivado de platino es carboplatino.

(7) El anticuerpo para su uso de acuerdo con uno cualquiera de (1) - (6), en donde dicho al menos un agente quimioterapéutico no corticosteroideo comprende un análogo de talidomida que es lenalidomida o CC4047.

(8) El anticuerpo su para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores1) - (7), en donde dicho al menos un agente quimioterapéutico no corticosteroideo comprende un inhibidor de proteasoma que es bortezomib.

(9) El anticuerpo para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores1) - (8), en donde dicho al menos un agente quimioterapéutico no corticosteroideo comprende adicionalmente un alcaloide de vinca.

(10) El anticuerpo para su uso de acuerdo con la reivindicación 9), en donde dicho alcaloide de vinca es vincristina.

(11) El anticuerpo para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores1) - (10), en donde dicho al menos un agente quimioterapéutico no corticosteroideo comprende adicionalmente una antraciclina.

(12) El anticuerpo para su uso de acuerdo con la reivindicación 11), en donde dicha antraciclina es doxorubicina.

(13) El anticuerpo para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores1) - (12), en donde dicho al menos un corticosteroide comprende prednisona.

(14) El anticuerpo para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores1) - (13), en donde:

(a) dicho al menos un corticosteroide comprende prednisona y dicho al menos un agente quimioterapéutico no corticosteroideo comprende talidomida;

(b) dicho al menos un corticosteroide comprende prednisona y dicho al menos un agente quimioterapéutico no corticosteroideo comprende bortezomib; o

(c) dicho al menos un corticosteroide comprende prednisona y dicho al menos un agente quimioterapéutico no corticosteroideo comprende bortezomib y adicionalmente comprende melfalán.

(15) El anticuerpo para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores1) - (14), en donde dicho al menos un corticosteroide comprende prednisona y dicho al menos un agente quimioterapéutico no corticosteroideo comprende melfalán y talidomida.

(16) El anticuerpo para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores1) - (15), en donde dicho al menos un corticosteroide comprende dexametasona.

(17) El anticuerpo para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores1) - (16), en donde:

(a) dicho al menos un corticosteroide comprende dexametasona y dicho al menos un agente quimioterapéutico no corticosteroideo comprende talidomida y/o lenalidomida;

(b) dicho al menos un corticosteroide comprende dexametasona y dicho al menos un agente quimioterapéutico no corticosteroideo CC4047;

(c) dicho al menos un corticosteroide comprende dexametasona y dicho al menos un agente quimioterapéutico no corticosteroideo comprende bortezomib

(d) dicho al menos un corticosteroide comprende dexametasona y dicho al menos un agente quimioterapéutico no corticosteroideo comprende lenalidomida y adicionalmente comprende bortezomib; o

(e) dicho al menos un corticosteroide comprende dexametasona y dicho al menos un agente quimioterapéutico no corticosteroideo comprende talidomida y adicionalmente comprende bortezomib.

(18) El anticuerpo para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores1) - (17), en donde dicho anticuerpo es un anticuerpo que comprende una región VL que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 12 y una región VH que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 17.

(19) El anticuerpo para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores1) - (18), en donde dicho cáncer es mieloma múltiple o leucemia linfocítica crónica.

(20) El anticuerpo para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores1) - (19), en donde dicho cáncer es recurrente o refractario.

(21) El anticuerpo para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores1) - (20), en donde dicho individuo no ha sido sometido a un tratamiento previo contra el cáncer para el mismo cáncer.

(22) El anticuerpo para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores1) - (20), en donde dicho individuo no ha respondido a un tratamiento anterior contra el cáncer para el mismo cáncer.

(23) El anticuerpo para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores1) - (22), en donde el anticuerpo, al menos un corticosteroide y al menos un agente quimioterapéutico no corticosteroideo se administran por separado.

(24) El anticuerpo para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores1) - (23), en donde:

(a) dicho al menos un corticosteroide comprende dexametasona, dicho al menos un agente quimioterapéutico no corticosteroideo comprende bortezomib y el anticuerpo comprende una región VL que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 12 y una región VH que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 17;

(b) dicho al menos un corticosteroide comprende dexametasona, dicho al menos un agente quimioterapéutico no corticosteroideo comprende lenalidomida y el anticuerpo comprende una región VL que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 12 y una región VH que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 17;

(c) dicho al menos un corticosteroide comprende dexametasona, dicho al menos un agente quimioterapéutico no corticosteroideo comprende lenalidomida y adicionalmente comprende bortezomib y el anticuerpo comprende una región VL que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 12 y una región VH que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 17;

(d) dicho al menos un corticosteroide comprende dexametasona, dicho al menos un agente quimioterapéutico no corticosteroideo comprende talidomida y adicionalmente comprende bortezomib y el anticuerpo comprende una región VL que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 12 y una VH región que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 17;

(e) dicho al menos un corticosteroide comprende dexametasona, dicho al menos un agente quimioterapéutico no corticosteroideo comprende CC4047 y el anticuerpo comprende una región VL que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 12 y una región VH que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 17; o

(f) dicho al menos un corticosteroide comprende prednisona, dicho al menos un quimioterapéutico no corticosteroideo comprende bortezomib y adicionalmente comprende melfalán y el anticuerpo comprende una región VL que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 12 y una región VH que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 17.

(25) El uso de un anticuerpo de isotipo IgG1 humano que se une a CD38 en la fabricación de un medicamento para el tratamiento del cáncer, en donde el medicamento es su para administración, o para ser administrado, en terapia combinada con al menos un corticosteroide, en donde dicho al menos un corticosteroide comprende un glucocorticoide y al menos un agente quimioterapéutico no corticosteroideo, en donde dicho al menos un agente quimioterapéutico no corticosteroideo comprende (i) talidomida o un análogo de talidomida y/o (ii) un inhibidor de proteasoma, y en donde dicho anticuerpo comprende 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 expuesta en SEQ ID NO: 13, una CDR2 de VL que tiene la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 14 y una CDR3 de VL que tiene la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 15, y la región variable de la cadena pesada comprende una CDR1 de VH que tiene la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 18, una CDR2 de VH que tiene la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 19 y una CDR3 de VH con la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 20.

Los anticuerpos no agonísticos -005, -003 o -024 que se unen a CD38 se describen en la presente memoria. Estos anticuerpos han sido descritos previamente en la solicitud de patente publicada posteriormente PCT/DK2006/000166 (WO 2006099875) (Genmab).

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), según se mide mediante citometría de flujo. La configuración experimental se describe en el Ejemplo 4.

La Figura 1B muestra la unión de -024 y HuMab-KLH a células CHO transfectadas con CD38 (CHO-CD38), según se mide 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 de Daudi según se mide mediante citometría de flujo. La configuración experimental se describe en el Ejemplo 4.

La Figura 2B muestra la unión de -024 y HuMab-KLH a las células de Daudi, según se mide 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 de Daudi por ADCC en comparación con rituximab y HuMab-KLH. La configuración experimental se describe en el Ejemplo 5.

La Figura 4B muestra la capacidad de -024 para inducir la lisis de células de Daudi por 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 por ADCC en comparación con HuMab-KLH. La configuración experimental se describe en el Ejemplo 5.

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) por ADCC en comparación con HuMab-KLH. La configuración experimental se describe en el Ejemplo 5.

La Figura 7 muestra la capacidad de -003 y -005 para inducir la lisis de AMO-1 (una línea celular de mieloma múltiple) por 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 de Daudi-luc inducida por -003 y -005 en comparación con HuMab-KLH. La configuración experimental se describe en el Ejemplo 6.

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.

La Figura 10A muestra la lisis mediada por CDC de células tumorales refractarias al 3% 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 de células tumorales refractarias al 9% en presencia de -003, -005 y HuMab-KLH. La configuración experimental se describe en el Ejemplo 6.

La Figura 10C muestra la lisis mediada por CDC de 30-40% de 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 de 70% de 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.

La Figura 11 muestra que -003 y -005 no bloquean la unión a CD38. La configuración experimental se describe en el Ejemplo 7.

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

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 los miocitos con -003. La configuración experimental se describe en el Ejemplo 10.

La Figura 12D muestra la tinción inmunohistológica de tejido linfóide de cinomolgo con -003. La configuración experimental se describe en el Ejemplo 10.

La Figura 13A muestra la tinción inmunohistológica de macrófagos, linfocitos y células plasmáticas B 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 los miocitos con -005. La configuración experimental se describe en el Ejemplo 10.

La Figura 13D muestra la tinción inmunohistológica de tejido linfóide de cinomolgo con -005. La configuración experimental se describe en el Ejemplo 10.

La Figura 14A muestra la tinción inmunohistológica del endotelio hepático con CD31. La configuración experimental se describe en el Ejemplo 10.

La Figura 14B muestra la tinción inmunohistológica del endotelio hepático con vWF. La configuración experimental se describe en el Ejemplo 10.

La Figura 14C muestra la tinción inmunohistológica del endotelio hepático con anti-KLH. La configuración experimental se describe en el Ejemplo 10.

La Figura 14D muestra la tinción inmunohistológica del endotelio hepático con -003. La configuración experimental se describe en el Ejemplo 10.

La Figura 14E muestra la tinción inmunohistológica del endotelio hepático 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 cinomolgo, medida por 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 cinomolgo, medida por 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 por citometría de flujo. La configuración experimental se describe en el Ejemplo 11.

La Figura 16A muestra la internalización de -003 medida por la extinción de EtBr. La configuración experimental se describe en el Ejemplo 12.

La Figura 16B muestra la internalización de -005 medida por la extinción 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 un entorno preventivo según lo medido por imágenes de luciferasa SCID *in vivo*. 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 el entorno terapéutico I, según lo medido por imágenes de luciferasa SCID *in vivo*. 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 el entorno terapéutico II según lo medido por imágenes de luciferasa SCID *in vivo*. La configuración experimental se describe en el Ejemplo 13.

La Figura 17D muestra la inhibición del crecimiento de células tumorales en -003 y -024 en comparación con HuMab-KLH en el entorno terapéutico III según lo medido por imágenes de luciferasa SCID *in vivo*. La configuración experimental se describe en el Ejemplo 13.

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

La Figura 19 muestra la puntuación histológica para las células positivas para CD38 en xenoinjertos de ratón RA-SCID implantados 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 las células positivas para CD138 en xenoinjertos de ratón RA-SCID implantados 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 con CD38 de células B en xenoinjertos antes de la implantación (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 con CD138 de células B en xenoinjertos antes de la implantación (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 salvaje y mutante según lo medido por ELISA. 23A: unión de -003 y -005 a CD38 humano mutante T237A. 23B: Unión de -003 y -005 a CD38 humano mutante Q272R. 23C: Unión de -003 y -005 a CD38 humano mutante S274F. Los métodos se describen en el Ejemplo 17.

La Figura 24 muestra el efecto de -003 y -005 en comparación con HuMab-KLH sobre la proliferación (A), la producción de IL-6 (B) y la producción de IFN- γ (C) de PBMC humanas. Los métodos se describen en los Ejemplos 18, 19 y 20, respectivamente.

La Figura 25 muestra la producción enzimática de cGDPribosa en presencia de diversas 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 CDC de células CHO-CD38 (26A), CDC de células de Daudi (26B) y ADCC de células de Daudi (26C). Los métodos se describen en el Ejemplo 24.

La Figura 27 muestra la unión de -005 y el anticuerpo de control de isotipo HuMab-KLH a células B de chimpancé transformadas con EBV, según lo medido por citometría de flujo. La configuración experimental se describe en el Ejemplo 26.

La Figura 28 muestra la capacidad de -005 solo y combinado con otros compuestos (Dexametasona (Dex) y Bortezomib (Bor)) para inducir la muerte celular de la línea celular de mieloma múltiple UM6 *in vitro*.

La Figura 29 muestra una lista de secuencias de las secuencias de la invención.

SEQ ID NO: 1 es la secuencia de nucleótidos de la región V_L del anticuerpo -003.

SEQ ID NO: 2 es la secuencia de aminoácidos de la región V_L del anticuerpo -003.

SEQ ID NO: 3 es la secuencia de aminoácidos de la CDR1 de V_L del anticuerpo -003 que comprende los aa 24-34 de SEQ ID NO: 2.

SEQ ID NO: 4 es la secuencia de aminoácidos de la CDR2 de V_L del anticuerpo -003 que comprende los aa 50-56 de SEQ ID NO: 2.

SEQ ID NO: 5 es la secuencia de aminoácidos de la CDR3 de V_L del anticuerpo -003 que comprende los aa 89-97 de SEQ ID NO: 2.

SEQ ID NO: 6 es la secuencia de nucleótidos de la región V_H del anticuerpo -003.

SEQ ID NO: 7 es la secuencia de aminoácidos de la región V_H del anticuerpo -003.

SEQ ID NO: 8 es la secuencia de aminoácidos de la CDR1 de V_H del anticuerpo -003 que comprende los aa 31-35 de SEQ ID NO: 7.

SEQ ID NO: 9 es la secuencia de aminoácidos de la CDR2 de V_H del anticuerpo -003 que comprende los aa 50-66 de SEQ ID NO: 7.

SEQ ID NO: 10 es la secuencia de aminoácidos de la CDR3 de V_H del anticuerpo -003 que comprende los aa 99-109 de SEQ ID NO: 7.

SEQ ID NO: 11 es la secuencia de nucleótidos de la región V_L del anticuerpo -005.

SEQ ID NO: 12 es la secuencia de aminoácidos de la región V_L del anticuerpo -005.
 SEQ ID NO: 13 es la secuencia de aminoácidos de la CDR1 de V_L del anticuerpo -005 que comprende los aa 24-34 de SEQ ID NO: 12.
 SEQ ID NO: 14 es la secuencia de aminoácidos de la CDR2 de V_L del anticuerpo -005 que comprende los aa 50-56 de SEQ ID NO: 12.
 SEQ ID NO: 15 es la secuencia de aminoácidos de la CDR3 de V_L del anticuerpo -005 que comprende los aa 89-97 de SEQ ID NO: 12.
 SEQ ID NO: 16 es la secuencia de nucleótidos de la región V_H del anticuerpo -005.
 SEQ ID NO: 17 es la secuencia de aminoácidos de la región V_H del anticuerpo -005.
 SEQ ID NO: 18 es la secuencia de aminoácidos de la CDR1 de V_H del anticuerpo -005 que comprende los aa 31-35 de SEQ ID NO: 17.
 SEQ ID NO: 19 es la secuencia de aminoácidos de la CDR2 de V_H del anticuerpo -005 que comprende los aa 50-66 de SEQ ID NO: 17.
 SEQ ID NO: 20 es la secuencia de aminoácidos de la CDR3 de V_H del anticuerpo -005 que comprende los aa 99-111 de SEQ ID NO: 17.
 SEQ ID NO: 21 es la secuencia de nucleótidos de la región V_L del anticuerpo -024.
 SEQ ID NO: 22 es la secuencia de aminoácidos de la región V_L del anticuerpo -024.
 SEQ ID NO: 23 es la secuencia de aminoácidos de la CDR1 de V_L del anticuerpo -024 que comprende los aa 24-34 de SEQ ID NO: 22.
 SEQ ID NO: 24 es la secuencia de aminoácidos de la CDR2 de V_L del anticuerpo -024 que comprende los aa 50-56 de SEQ ID NO: 22.
 SEQ ID NO: 25 es la secuencia de aminoácidos de la CDR3 de V_L del anticuerpo -024 que comprende los aa 89-97 de SEQ ID NO: 22.
 SEQ ID NO: 26 es la secuencia de nucleótidos de la región V_H del anticuerpo -024.
 SEQ ID NO: 27 es la secuencia de aminoácidos de la región V_H del anticuerpo -024.
 SEQ ID NO: 28 es la secuencia de aminoácidos de la CDR1 de V_H del anticuerpo -024 que comprende los aa 31-35 de SEQ ID NO: 27.
 SEQ ID NO: 29 es la secuencia de aminoácidos de la CDR2 de V_H del anticuerpo -024 que comprende los aa 50-66 de SEQ ID NO: 27.
 SEQ ID NO: 30 es la secuencia de aminoácidos de la CDR3 de V_H del anticuerpo -024 que comprende los aa 99-111 de 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 por un residuo de alanina.
 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 por 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 por un residuo de fenilalanina.

40 Descripción detallada de la invención

Definiciones

Un "anticuerpo no agonístico que se une a CD38" o "anticuerpo anti-CD38" cuando se utilizan en la presente memoria se refieren a un anticuerpo que al unirse a CD38 no induce una proliferación significativa de células mononucleares de sangre periférica cuando se compara con la proliferación inducida por un anticuerpo de control de isotipo o medio solo (tal como se analiza, p. ej., como se describe a continuación en el Ejemplo 18). En una realización, un anticuerpo anti-CD38 utilizado en la invención no solo es un no-agonista, sino que es incluso un antagonista de CD38.

Los términos "CD38" y "antígeno CD38" se utilizan indistintamente en la presente memoria, e incluyen cualquier variante, isoforma y homólogos de especie de CD38 humano, que son expresados de forma natural por las células o son expresados en células transfectadas con el gen de CD38. Los sinónimos de CD38, como se reconoce en la técnica, incluyen ADP ribosil ciclasa 1, cADPr hidrolasa 1, Cd38-rs1, ADP-ribosa hidrolasa 1 cíclica, 1-19, antígeno NIM-R5.

El término "inmunoglobulina" se refiere a una clase de glicoproteínas relacionadas estructuralmente que consisten en dos pares de cadenas polipeptídicas, 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 ha sido bien caracterizada. Véase por ejemplo Fundamental Immunology cap. 7 (Paul, W., ed., 2ª ed. Raven Press, N.Y. (1989)). Brevemente, cada cadena pesada típicamente comprende una región variable de cadena pesada (abreviada en la presente memoria como V_H) y una región constante de cadena pesada. La región constante de la cadena pesada típicamente se compone de tres dominios, C_{H1}, C_{H2}, y C_{H3}. Cada cadena ligera típicamente está compuesta por una región variable de cadena ligera (abreviada en la presente memoria como V_L) y una región constante de cadena

5 ligera. La región constante de la cadena ligera típicamente se compone de un dominio, C_L. Las regiones V_H y V_L se pueden subdividir en regiones de hipervariabilidad (o regiones hipervariables que pueden tener secuencias y/o formas de bucles estructuralmente definidos hipervariables), también denominadas regiones determinantes de la complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que son más conservadas, denominadas regiones marco (FR).

10 Cada V_H y V_L normalmente se compone de 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 los residuos de aminoácidos en esta región se realiza mediante el método descrito en Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª ed. Servicio de Salud Pública, Institutos Nacionales de Salud, Bethesda, MD. (1991) (frases tales como la numeración de residuos del dominio variable como en Kabat o según Kabat en la presente memoria se refieren a este sistema de numeración para dominios variables de cadena pesada o dominios variables de cadena ligera). Utilizando este sistema de numeración, la secuencia de aminoácidos lineal real de un péptido puede contener menos aminoácidos o aminoácidos adicionales correspondientes a un acortamiento o una inserción en una FR o CDR del dominio variable. Por ejemplo, un dominio variable de cadena pesada puede incluir un inserto de un único aminoácido (residuo 52a según Kabat) después del residuo 52 de la CDR2 de V_H y residuos insertados (por ejemplo, residuos 82a, 82b y 82c, etc. según Kabat) después del residuo 82 de FR de la cadena pesada. Se puede determinar la numeración de residuos de Kabat para un anticuerpo dado mediante alineamiento en regiones de homología de la secuencia del anticuerpo con una secuencia numerada de Kabat "patrón".

20 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 ellos, que tiene la capacidad de unirse específicamente a un antígeno en condiciones fisiológicas típicas durante períodos 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 período relevante definido funcionalmente (tal como un tiempo suficiente para inducir, promover, mejorar y/o modular una respuesta fisiológica asociada con la unión del anticuerpo al antígeno).

30 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 en la unión de la inmunoglobulina a los tejidos o factores del anfitrión, incluyendo varias células del sistema inmunitario (tales como las células efectoras) y el primer componente (C1q) del sistema del complemento clásico.

35 Un anticuerpo anti-CD38 puede ser un anticuerpo biespecífico, un diacuerpo o una molécula similar (véase, por ejemplo, PNAS USA 90(14), 6444-8 (1993) para una descripción de diacuerpos). De hecho, los anticuerpos biespecíficos, diacuerpos y similares, proporcionados por la presente invención se pueden unir a cualquier diana adecuada además de a una porción de CD38.

40 Como se indicó anteriormente, el término anticuerpo en la presente memoria, a menos que se indique lo contrario o se desmienta claramente por el contexto, incluye fragmentos de un anticuerpo que conservan la capacidad de unirse específicamente a un antígeno. Se ha demostrado que la función de unión a antígeno de un anticuerpo se puede realizar mediante fragmentos de un anticuerpo de longitud completa. Los ejemplos de fragmentos de unión abarcados dentro del 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 (vii) una combinación de dos o más CDR aisladas que se pueden unir opcionalmente mediante un conector sintético. Además, aunque los dos dominios del fragmento Fv, V_L y V_H, están codificados por genes separados, se pueden unir, utilizando métodos recombinantes, por medio de un conector sintético que permite fabricarlos como una cadena de proteína única en la que las regiones V_L y V_H se emparejan para formar moléculas monovalentes (conocidas como anticuerpos de cadena sencilla o Fv de cadena sencilla (scFv), véanse por ejemplo Bird et al., Science 242, 423-426 (1988) y Huston et al., PNAS USA 85, 5879-5883 (1988)). Tales anticuerpos de cadena sencilla se incluyen dentro del término anticuerpo, a menos que se indique lo contrario o esté claramente indicado por el contexto. Otras formas de anticuerpos de cadena sencilla, tales como los diacuerpos, se incluyen dentro del término anticuerpo. Aunque tales fragmentos se incluyen generalmente dentro del significado de anticuerpo, colectivamente y cada uno independientemente son características únicas de la presente invención, que muestran diferentes propiedades biológicas y utilidades. Estos y otros fragmentos de anticuerpos útiles se comentan adicionalmente en la presente memoria.

También se debe entender que el término anticuerpo también incluye generalmente anticuerpos policlonales,

anticuerpos monoclonales (mAb), polipéptidos similares a anticuerpos, tales como anticuerpos quiméricos y anticuerpos humanizados, anticuerpos antiidiotípicos (anti-Id) para anticuerpos y fragmentos de anticuerpos que conservan la capacidad de unirse específicamente al antígeno (fragmentos de unión a antígeno) proporcionados por cualquier técnica conocida, tal como la escisión enzimática, la síntesis de péptidos y las técnicas recombinantes. Un anticuerpo generado puede poseer cualquier isotipo.

El término "epítipo" significa un determinante proteico capaz de unirse específicamente a un anticuerpo. Los epítipos generalmente consisten en agrupamientos de moléculas químicamente activas en la superficie tales como aminoácidos o cadenas laterales de azúcares y generalmente tienen características estructurales tridimensionales específicas, así como características de carga específicas. Los epítipos conformacionales y no conformistas se distinguen porque la unión a los primeros, pero no los últimos, se pierde en presencia de disolventes desnaturizantes. El epítipo puede comprender residuos de aminoácidos directamente implicados en la unión (también denominado componente inmunodominante del epítipo) y otros residuos de aminoácidos, que no están directamente implicados en la unión, tales como los residuos de aminoácidos que están eficazmente bloqueados por el péptido que se une al antígeno de manera específica (en otras palabras, el residuo de aminoácido está dentro de la huella del péptido que se une al antígeno específicamente).

Se pretende que el término "molécula biespecífica" incluya cualquier agente, tal como una proteína, un péptido o un complejo de proteínas o péptidos, que tenga dos especificidades de unión diferentes. Por ejemplo, la molécula se puede unir a, o interactuar con, (a) un antígeno de la superficie celular y (b) un receptor de Fc sobre la superficie de una célula efectora. Se pretende que el término "molécula multiespecífica" incluya cualquier agente, por ejemplo, una proteína, un péptido o un complejo de proteínas o péptidos, que tenga más de dos especificidades de unión diferentes. Por ejemplo, la molécula se puede unir 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. En consecuencia, la presente invención incluye, pero no se limita a, moléculas biespecíficas, trispecíficas, tetraspecíficas y otras multiespecíficas que están dirigidas a CD38, y a otros antígenos o dianas de la superficie celular, tales como receptores de Fc sobre células efectoras.

Se pretende que el término "anticuerpos biespecíficos" incluya cualquier anticuerpo anti-CD38, que sea una molécula biespecífica. El término "anticuerpos biespecíficos" también incluye diacuerpos. Los diacuerpos son anticuerpos bivalentes, biespecíficos en los que los dominios V_H y V_L se expresan sobre una sola cadena polipeptídica, pero utilizando un conector que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios sobre la misma cadena, lo que obliga a los dominios a emparejarse con dominios complementarios de otra cadena y crea dos sitios de unión al antígeno (véanse por ejemplo Holliger, P. et al., PNAS USA 90, 6444-6448 (1993), Poljak, R.J. et al., Structure 2, 1121-1123 (1994)).

Como se emplea en la presente memoria, el término "célula efectora" se refiere a una célula inmunitaria que está implicada en la fase efectora de una respuesta inmunitaria, en oposición a las fases cognitiva y de activación de una respuesta inmunitaria. Las células inmunitarias ilustrativas incluyen una célula de origen mieloide o linfoide, por ejemplo, linfocitos (tales como las células B y las células T, incluyendo las células T citotóxicas (CTL)), células asesinas, células asesinas naturales, macrófagos, monocitos, eosinófilos, neutrófilos, células polimorfonucleares, granulocitos, mastocitos y basófilos. Algunas células efectoras expresan receptores de Fc específicos y llevan a cabo funciones inmunitarias específicas. En algunas realizaciones, una célula efectora es capaz de inducir citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC), tal como un neutrófilo capaz de inducir ADCC. Por ejemplo, los monocitos, macrófagos, que expresan FcR están implicados en la destrucción específica de las células diana y en la presentación de antígenos a otros componentes del sistema inmunológico, 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 las citoquinas. Por ejemplo, se ha encontrado que la expresión de FcγRI está regulada por incremento por el interferón γ (IFN-γ) y/o el G-CSF. Esta expresión mejorada aumenta la actividad citotóxica de las células portadoras de FcγRI contra las dianas. Una célula efectora puede fagocitar o lisar un antígeno diana o una célula diana.

El término "anticuerpo humano", como se emplea en la presente memoria, pretende incluir anticuerpos que tienen regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana. Los anticuerpos humanos de la presente invención pueden incluir residuos de aminoácidos no codificados por secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana (por ejemplo, mutaciones introducidas por mutagénesis al azar o específica del sitio *in vitro* o por mutación somática *in vivo*). Sin embargo, no se pretende que el término "anticuerpo humano", como se emplea en la presente memoria, incluya anticuerpos en los cuales las secuencias de CDR derivadas de la línea germinal de otra especie de mamífero, tal como un ratón, se hayan injertado sobre secuencias marco humanas.

Como se emplea en la presente memoria, un anticuerpo humano "deriva de" una secuencia de línea germinal particular si el anticuerpo se obtiene de un sistema que usa secuencias de inmunoglobulina humana, por ejemplo

- 5 inmunizando un ratón transgénico portador de genes de inmunoglobulina humana o seleccionando una biblioteca de genes de inmunoglobulina humana, y en donde el anticuerpo humano seleccionado tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 90%, tal como al menos 95%, por ejemplo al menos 96%, tal como al menos 97%, por ejemplo al menos 98%, o tal como al menos 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos codificada por el segmento génico de la región variable VH o VL de la línea germinal. Típicamente, un anticuerpo humano derivado de una secuencia del segmento génico de la región variable VH o VL de la línea germinal humana no mostrará más de 10 diferencias de aminoácidos, por ejemplo no más de 5, por ejemplo, no más de 4, 3, 2 o 1 diferencias de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos codificada por el gen de inmunoglobulina de la línea germinal.
- 10 Un anticuerpo "quimérico" es un anticuerpo que contiene una o más regiones de un anticuerpo y una o más regiones de uno o más anticuerpos diferentes derivados de otra especie. Un anticuerpo quimérico monovalente es un dímero (HL) formado por una cadena H quimérica asociada a través de puentes disulfuro con una cadena L quimérica. Un anticuerpo quimérico divalente es un tetrámero (H₂L₂) formado por dos dímeros HL asociados a través de al menos un puente disulfuro. También se puede producir un anticuerpo quimérico polivalente, por ejemplo, empleando una región CH que oligomeriza (por ejemplo, a partir de una cadena H de IgM, o una cadena μ). Típicamente, un anticuerpo quimérico se refiere a un anticuerpo en el que una porción de la cadena pesada y/o ligera es idéntica o homóloga a las secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de una especie particular o pertenecientes a una clase o subclase de anticuerpos particular, mientras que el resto de las cadenas son idénticas o homólogas a las secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de otra especie o pertenecientes a otra clase o subclase de anticuerpos, así como a fragmentos de tales anticuerpos, siempre que muestren la actividad biológica deseada (véanse 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 (véanse, 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), documento EP125023, Neuberger et al., Nature 314, 268-270 (1985), documentos EP171496, EP173494, WO86/01533, EP184187, Sahagan et al., J. Immunol. 137, 1066-1074 (1986), documento 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)).
- 15 20 25 30 Un anticuerpo "humanizado" es un anticuerpo derivado de una especie no humana, en el que ciertos aminoácidos en el marco y los dominios constantes de las cadenas pesada y ligera se han mutado para evitar o anular una respuesta inmunitaria en seres humanos. Las formas humanizadas de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) son anticuerpos quiméricos que contienen una secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. En su mayor parte, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las cuales 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 ratón, rata, conejo o primate no humano que tiene las características de unión a antígeno deseadas, tales como especificidad y afinidad. En algunos casos, los residuos de la región marco (FR) de Fv de la inmunoglobulina humana se reemplazan por los residuos no humanos correspondientes. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender residuos que no se encuentran en el anticuerpo receptor o en el anticuerpo donante. Estas modificaciones se realizan para optimizar aún más el rendimiento del anticuerpo. En general, un anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente al menos uno, y típicamente dos, dominios variables, en los que todos o sustancialmente todos los bucles hipervariables corresponden a los de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las regiones FR son los de una secuencia de inmunoglobulina humana. Un anticuerpo humanizado opcionalmente también comprenderá al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), típicamente la de una inmunoglobulina humana. Para más detalles, véanse 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).
- 35 40 45 50 Los términos "anticuerpo monoclonal" o "composición de anticuerpo monoclonal", como se emplean en la presente memoria, se refieren a una preparación de moléculas de anticuerpo de composición molecular única. Una composición de anticuerpo monoclonal muestra una única especificidad de unión y afinidad por un epítipo particular. En consecuencia, el término "anticuerpo monoclonal humano" se refiere a anticuerpos que presentan una única especificidad de unión que tienen regiones constantes y variables derivadas de secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana. Los anticuerpos monoclonales humanos pueden ser generados 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. Un anticuerpo monoclonal se puede abreviar como mAb.
- 55 60 Como se emplea en la presente memoria, "unión específica" se refiere a una unión de anticuerpo a un antígeno predeterminado. Típicamente, el anticuerpo, se une con una afinidad correspondiente a una K_D de aproximadamente 10⁻⁷ M o menos, tal como aproximadamente 10⁻⁸ M o menos, tal como aproximadamente 10⁻⁹ M o menos, aproximadamente 10⁻¹⁰ M o menos, o aproximadamente 10⁻¹¹ M o incluso menos cuando se determina mediante tecnología de resonancia de plasmón superficial (SPR) en un aparato BIAcore 3000 utilizando CD38 recombinante como ligando y el anticuerpo como analito. El anticuerpo se puede unir al antígeno predeterminado con una afinidad

correspondiente a una K_D que es al menos diez veces más baja, tal como al menos 100 veces más baja, por ejemplo, al menos 1000 veces más baja tal como al menos 10.000 veces más baja, por ejemplo, al menos 100.000 veces más baja que su afinidad para unirse a un antígeno no específico (p. ej., BSA, caseína) distinto del antígeno predeterminado o un antígeno estrechamente relacionado. La cantidad con la cual la afinidad es menor, depende de la K_D del anticuerpo, de manera que cuando la K_D del anticuerpo es muy baja (es decir, el anticuerpo es altamente específico), en ese caso la cantidad con la cual la afinidad por el antígeno es menor que la afinidad por un antígeno no específico puede ser al menos 10.000 veces.

El término especificidad en la presente memoria se refiere a la capacidad de un péptido de unión a CD38, tal como un anticuerpo anti-CD38, para reconocer un epítipo dentro de CD38, mientras que solo tiene poca o ninguna reactividad detectable con otras porciones de CD38 (incluyendo otros epítipos que están unidos a otros anticuerpos anti-CD38). La especificidad se puede determinar relativamente mediante ensayos de competición como se describe en la presente memoria. La especificidad se puede determinar más particularmente mediante cualquiera de las técnicas de identificación/caracterización de epítipos descritas en la presente memoria o sus equivalentes conocidos en la técnica.

Sin embargo, un anticuerpo específico para un determinante antigénico particular puede reaccionar de forma cruzada con otras biomoléculas que pueden estar presentes en algún contexto biológico con CD38. Más típicamente, un anticuerpo anti-CD38, puede reaccionar de forma cruzada con homólogos de CD38 de otras especies. En uno o ambos contextos, típicamente tales anticuerpos con reactividad cruzada son selectivos para CD38 humano con respecto a la estructura relevante y/o los factores ambientales.

El término "selectividad" en la presente memoria se refiere a la unión preferencial de un anticuerpo anti-CD38, para una región, diana o péptido particulares; típicamente una región o epítipo en CD38, en oposición a una o más moléculas biológicas, estructuras, células, tejidos, etc. distintos. En una realización, un anticuerpo anti-CD38 utilizado en la presente invención es selectivo para una porción de CD38 en el contexto de células de cáncer de colon (es decir, el anticuerpo anti-CD38 se unirá selectivamente a la porción de CD38 sobre otros componentes de una célula de cáncer de colon).

Se pretende que el término " k_d " (sec^{-1}), como se emplea en la presente memoria, haga referencia a la constante de velocidad de equilibrio de disociación de una interacción anticuerpo-antígeno particular. Tal valor también se conoce como valor K_{off} .

Se pretende que el término " k_a " ($\text{M}^{-1} \times \text{seg}^{-1}$), como se emplea en la presente memoria, haga referencia a la constante de velocidad de equilibrio de asociación de una interacción anticuerpo-antígeno particular.

Se pretende que el término " k_b " (M), como se emplea en la presente memoria, haga referencia a la constante de equilibrio de disociación de una interacción anticuerpo-antígeno particular.

Se pretende que el término " k_A " (M^{-1}), como se emplea en la presente memoria, haga referencia a la constante de equilibrio de asociación de una interacción anticuerpo-antígeno particular y se obtiene dividiendo la k_a por el k_d .

Como se emplea en la presente memoria, "isotipo" se refiere a la clase de anticuerpo (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgD, IgA, IgE o IgM) que está codificada por los genes de la región constante de la cadena pesada.

"Célula diana" significará cualquier célula no deseada en un individuo. En algunas realizaciones, la célula diana es una célula que expresa o expresa de manera anormalmente alta CD38. Las células que expresan CD38 incluyen típicamente células hemopoyéticas, tales como timocitos medulares, células T y B activadas, 80% de las células NK en reposo y monocitos, linfoblastos del centro germinal del ganglio linfático, células B plasmáticas y algunas células intrafoliculares, células dendríticas, células de médula ósea normal, células precursoras particulares, 50-80% de las células de la sangre del cordón umbilical, eritrocitos y plaquetas. CD38 también puede ser expresado por células no hemopoyéticas, tales como células intraepiteliales y linfocitos de la lámina propia en el intestino, por células de Purkinje y marañas neurofibrilares en el cerebro, por células epiteliales en la próstata, por células β en el páncreas, osteoclastos en el hueso, células de la retina en el ojo y sarcolema del músculo liso y estriado. En células malignas, CD38 se expresa en una variedad de enfermedades hematológicas malignas, incluyendo, pero no limitadas a, mieloma múltiple, leucemia de células plasmáticas primarias o secundarias, 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.

Como se emplea en la presente memoria, el término "individuo" incluye cualquier animal humano o no humano. El término "animal no humano" incluye todos los vertebrados, por ejemplo, mamíferos y no mamíferos, tales como primates no humanos, ovejas, perros, vacas, pollos, anfibios, reptiles, etc.

"Tratamiento" significa la administración de una cantidad eficaz de un compuesto terapéuticamente activo de la

presente invención con el propósito de aliviar, mejorar o erradicar (curar) los síntomas o estados de enfermedad.

Aspectos y realizaciones de la invención

5 En un primer aspecto principal, la invención se refiere a un método para inhibir el crecimiento y/o la proliferación de células tumorales que expresan CD38 en un individuo que lo necesite, cuyo método comprende la administración a dicho individuo de

- 10 i) un anticuerpo no agonístico que se une a, es decir, se une específicamente a, CD38,
 ii) al menos un corticosteroide, y
 iii) al menos un agente quimioterapéutico no corticosteroideo.

15 En un aspecto principal adicional, la invención se refiere a un método para el tratamiento del cáncer que implica células tumorales que expresan CD38 en un individuo que lo necesite, cuyo método comprende la administración a dicho individuo de:

- 20 i) un anticuerpo no agonístico que se une a, es decir, se une específicamente a, CD38,
 ii) al menos un corticosteroide, y
 iii) al menos un agente quimioterapéutico no corticosteroideo,

seguido de trasplante autólogo de células madre periféricas o de médula ósea.

25 El al menos un agente quimioterapéutico no corticosteroideo comprende talidomida (Thalomid®) o un análogo de talidomida, p. ej. CC-5013 (lenalidomida, Revlimid™) o CC4047 (Actimid™) y/o comprende un inhibidor de proteasoma, tal como bortezomib (Velcade®).

30 El al menos un corticosteroide comprende un glucocorticoide. En una realización, dicho al menos un corticosteroide comprende prednisona o dexametasona. En una realización, dicho al menos un agente quimioterapéutico no corticosteroideo comprende un agente citotóxico y/o un inhibidor de la angiogénesis. En una realización adicional, dicho al menos un agente quimioterapéutico no corticosteroideo comprende un agente alquilante.

35 En una realización adicional más, dicho al menos un agente quimioterapéutico no corticosteroideo comprende uno o más agentes seleccionados del grupo que consiste en: melfalán, mecloretamina, tioepa, clorambucilo, carmustina (BSNU), lomustina (CCNU), ciclofosfamida, busulfán, dibromomanitol, estreptozotocina, dacarbazina (DTIC), procarbazona, mitomicina C, cisplatino y otros derivados de platino, tal como el carboplatino.

Incluso en una realización adicional, dicho al menos un agente quimioterapéutico no corticosteroideo comprende un alcaloide de vinca, tal como vincristina o una antraciclina, tal como doxorubicina.

40 En realizaciones adicionales de la invención, dicho al menos un corticosteroide comprende prednisona y dicho al menos un agente quimioterapéutico no corticosteroideo comprende melfalán.

45 Incluso en realizaciones adicionales de la invención, dicho al menos un corticosteroide comprende prednisona y dicho al menos un agente quimioterapéutico no corticosteroideo comprende talidomida.

Incluso en realizaciones adicionales de la invención, dicho al menos un corticosteroide comprende prednisona y dicho al menos un agente quimioterapéutico no corticosteroideo comprende melfalán y talidomida.

50 Incluso en realizaciones adicionales de la invención, dicho al menos un corticosteroide comprende dexametasona y dicho al menos un agente quimioterapéutico no corticosteroideo comprende talidomida y/o lenalidomida.

Incluso en realizaciones adicionales de la invención, dicho al menos un corticosteroide comprende dexametasona y dicho al menos un agente quimioterapéutico no corticosteroideo comprende vincristina y/o doxorubicina.

55 En una realización, dicho anticuerpo no agonístico que se une a CD38 es un anticuerpo monoclonal.

En una realización adicional de la invención, dicho anticuerpo es un antagonista de CD38.

60 En una realización adicional de la invención, dicho anticuerpo es:

- un anticuerpo que no induce la liberación de IL-6 significativa por monocitos humanos o células mononucleares de sangre periférica según lo determinado por el método descrito en el Ejemplo 19 de la memoria descriptiva y/o

- un anticuerpo que no induce la liberación de IFN- γ detectable por células T humanas o células mononucleares de sangre periférica según lo determinado por el método descrito en el Ejemplo 20 de la memoria descriptiva
y/o
- 5 • un anticuerpo que es internalizado por células que expresan CD38; tal como internalizado por células CHO-CD38 en el plazo de 5 a 15 minutos a 37°C mediante el método descrito en el Ejemplo 12 de la memoria descriptiva
y/o
- 10 • un anticuerpo que induce ADCC; tal como con un valor de CE₅₀ inferior a 15 ng/ml, tal como inferior a 10 ng/ml en células de Daudi-luc y con un valor de CE₅₀ inferior a 75 ng/ml, tal como inferior a 50 ng/ml, 30 ng/ml o 10 ng/ml en células MM según lo determinado por el método descrito en el Ejemplo 5 de la memoria descriptiva
y/o
- 15 • un anticuerpo que induce CDC en presencia de complemento; tal como con un valor de CE₅₀ inferior a 5 μ g/ml, tal como inferior a 1 μ g/ml en células de Daudi-luc o CD38-CHO por el método descrito en el Ejemplo 6 de la memoria descriptiva
y/o
- 20 • un anticuerpo que inhibe la síntesis de cGDPR.
y/o
- un anticuerpo que inhibe la síntesis de cADPR
y/o
- 25 • un anticuerpo que se une a CD38 humano con una afinidad (K_D) de menos de 10⁻⁸ M, tal como en el intervalo de 10⁻⁸ M a 10⁻¹¹ M, por ejemplo, en el intervalo de 7 x 10⁻⁹ M a 10⁻¹⁰ M, según lo determinado por resonancia de plasmón superficial como se describe en el Ejemplo 20 de la memoria descriptiva
y/o
- un anticuerpo que inhibe la síntesis de cGDPR en al menos 25%, tal como al menos 30% después de 90 minutos a una concentración de 3 μ g/ml según lo determinado por el método espectrofotométrico descrito en el Ejemplo 24 de la memoria descriptiva
y/o
- 30 • un anticuerpo que inhibe la síntesis de cADPR en al menos 25%, tal como al menos 30% después de 90 minutos a una concentración de 3 μ g/ml según lo determinado por el método de HPLC descrito por Munshi et al., J. Biol. Chem. 275, 21566-21571 (2000).

35 El anticuerpo contra CD38 no agonístico -003 es un anticuerpo IgG1 monoclonal humano que tiene una región V_L que consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 2 y una región V_H que consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 7.

40 En una realización, el anticuerpo contra CD38 no agonístico utilizado en la invención es el anticuerpo -005. -005 es un anticuerpo IgG1 monoclonal humano que tiene una región V_L que consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 12 y una región V_H que consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 17.

45 El anticuerpo contra CD38 no agonístico -024 es un anticuerpo IgG1 monoclonal humano que tiene una región V_L que consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 22 y una región V_H que consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 27.

El anticuerpo contra CD38 no agonístico -003 es un anticuerpo que se une a CD38 humano codificado por los ácidos nucleicos de la cadena ligera humana y de la cadena pesada humana que comprenden secuencias de nucleótidos en sus regiones variables como se expone en SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 6, respectivamente.

50 En una realización, el anticuerpo contra CD38 no agonístico -005 utilizado en la invención es un anticuerpo que se une a CD38 humano codificado por los ácidos nucleicos de la cadena ligera humana y de la cadena pesada humana que comprenden secuencias de nucleótidos en sus regiones variables como se expone en SEQ ID NO: 11 y SEQ ID NO: 16, respectivamente.

55 El anticuerpo contra CD38 no agonístico -024 es un anticuerpo que se une a CD38 humano codificado por los ácidos nucleicos de la cadena ligera humana y de la cadena pesada humana que comprenden secuencias de nucleótidos en sus regiones variables como se expone en SEQ ID NO: 21 y SEQ ID NO: 26, respectivamente.

60 Los anticuerpos contra CD38 no agonísticos se describen en el documento WO2005/103083 (Morphosys), en particular un anticuerpo que comprende una o más de las secuencias proporcionadas en la Figura 1b y/o las secuencias proporcionadas en la Figura 2B del documento WO 2005/103083.

Los anticuerpos interactúan con los antígenos diana principalmente a través de los residuos de aminoácidos que se encuentran en las seis regiones determinantes de complementariedad (CDR) de las cadenas pesadas y ligeras. Por esta razón, las secuencias de aminoácidos dentro de las CDR son más diversas entre los anticuerpos individuales que las secuencias fuera de las CDR. Debido a que las secuencias de las CDR son responsables de la mayoría de

5 las interacciones anticuerpo-antígeno, es posible expresar anticuerpos recombinantes que imitan las propiedades de los anticuerpos naturales específicos mediante la construcción de vectores de expresión que incluyen secuencias de CDR del anticuerpo natural específico injertado en secuencias marco de un anticuerpo diferente con diferentes propiedades (véanse 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)).

10 Dado que es bien conocido en la técnica que los dominios de CDR3 de la cadena pesada del 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), los anticuerpos utilizados en la invención comprenden las CDR3 de las cadenas pesadas y ligeras de -005.

15 En la presente memoria se describe un anticuerpo que comprende una CDR3 de V_H que tiene la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 10 o un anticuerpo que compite por la unión a CD38 con dicho anticuerpo, p. ej. mediante la unión del mismo epítipo a dicho anticuerpo.

La competición se puede determinar mediante el uso de un ELISA como se describe en la sección de Ejemplos.

20 La competición también se puede determinar mediante el uso de un FACS como se describe en la sección de Ejemplos.

En la presente memoria se describe un anticuerpo que comprende una CDR3 de V_L con la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 5 y una CDR3 de V_H con la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 10.

25 En la presente memoria se describe un anticuerpo que comprende las regiones variables la cadena ligera humana y pesada humana, en donde la región variable de la cadena ligera comprende una CDR1 de V_L con la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 3, una CDR2 de V_L con la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 4 y una CDR3 de V_L que tiene la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 5, y la región variable de la cadena pesada comprende una CDR1 de V_H con la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 8, una CDR2 de V_H con la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 9 y una CDR3 de V_H con la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 10.

35 En la presente memoria se describe un anticuerpo que comprende una región V_L que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 2 o una región V_L que tiene al menos aproximadamente 90%, tal como al menos aproximadamente 95% de identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 2.

40 En la presente memoria se describe un anticuerpo que comprende una región V_H que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 7 o una región V_H que tiene al menos aproximadamente 90%, tal como al menos aproximadamente 95% de identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 7 o una región V_H que tiene 1-5, tal como 1-3 sustituciones, deleciones o adiciones de aminoácidos en comparación con la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 7.

45 En la invención, dicho anticuerpo es un anticuerpo que comprende una CDR3 de V_H con la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 20. En la presente memoria se describe un anticuerpo que compite por la unión de CD38 con dicho anticuerpo, p. ej. mediante la unión al mismo epítipo que dicho anticuerpo.

En particular, en la invención, dicho anticuerpo es un anticuerpo que comprende una CDR3 de V_L con la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 15 y una CDR3 de V_H con la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 20.

50 Específicamente, en la invención, dicho anticuerpo es un anticuerpo que comprende las regiones variables de la cadena ligera humana y pesada humana, en donde la región variable de la cadena ligera comprende una CDR1 de V_L que tiene la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 13, una CDR2 de V_L que tiene la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 14 y una CDR3 de V_L que tiene la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 15, y la región variable de la cadena pesada comprende una CDR1 de V_H que tiene la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 18, una CDR2 de V_H que tiene la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 19 y una CDR3 de V_H que tiene la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 20.

55 En una realización, dicho anticuerpo es un anticuerpo que comprende una región V_L que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 12 o una región V_L que tiene al menos aproximadamente 90%, tal como al menos aproximadamente 95% de identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia de acuerdo con SEQ ID NO: 12.

60 En otra realización, dicho anticuerpo es un anticuerpo que comprende una región V_H que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 17 o una región V_H que tiene al menos aproximadamente 90%, tal como al menos aproximadamente 95% de identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia expuesta en SEQ ID NO:

17 o una región V_H que tiene 1-5, tal como 1-3 sustituciones, deleciones o adiciones de aminoácidos en comparación con la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 17.

5 En la presente memoria se describe un anticuerpo que comprende una CDR3 de V_H que tiene la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 30 o un anticuerpo que compite por la unión de CD38 con dicho anticuerpo, p. ej. mediante la unión al mismo epítipo que dicho anticuerpo.

10 En la presente memoria se describe un anticuerpo que comprende una CDR3 de V_L con la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 25 y una CDR3 de V_H con la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 30.

15 En la presente memoria se describe un anticuerpo que comprende las regiones variables de la cadena ligera humana y pesada humana, en donde la región variable de la cadena ligera comprende una CDR1 de V_L que tiene la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 23, una CDR2 de V_L que tiene la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 24 y una CDR3 de V_L que tiene la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 25, y la región variable de la cadena pesada comprende una CDR1 de V_H con la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 28, una CDR2 de V_H que tiene la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 29 y una CDR3 de V_H que tiene la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 30.

20 En la presente memoria se describe un anticuerpo que comprende una región V_L que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 22 o una región V_L que tiene al menos aproximadamente 90%, tal como al menos aproximadamente 95% de identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia de acuerdo con SEQ ID NO: 22.

25 En la presente memoria se describe un anticuerpo que comprende una región V_H que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 27 o una región V_H que tiene al menos aproximadamente 90%, tal como al menos aproximadamente 95% de identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia de acuerdo con SEQ ID NO: 27 o una región V_H que tiene 1-5, tal como 1-3 sustituciones, deleciones o adiciones de aminoácidos en comparación con la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 27.

30 En una realización de la invención, dicho al menos un agente quimioterapéutico no corticosteroideo comprende uno o más agentes seleccionados del grupo que consiste en: melfalán, mecloretamina, tioepa, clorambucilo, carmustina (BSNU), lomustina (CCNU), ciclofosfamida, busulfán, dibromomanitol, estreptozotocina, dacarbazina (DTIC), procarbazona, mitomicina C, cisplatino y otros derivados de platino, tales como el carboplatino, y dicho anticuerpo es un anticuerpo IgG1 monoclonal humano que tiene una V_L región que consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 12 y una región V_H que consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 17.

35 En una realización de la invención, dicho al menos un agente quimioterapéutico no corticosteroideo comprende melfalán, y dicho anticuerpo es un anticuerpo IgG1 monoclonal humano que tiene una región V_L que consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 12 y una región V_H que consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 17.

40 En otra realización, dicho al menos un agente quimioterapéutico no corticosteroideo comprende un derivado de ácido glutámico, tal como talidomida (Thalomid®) o un análogo de talidomida, p. ej., CC-5013 (lenalidomida, Revlimid™) o CC4047 (Actimid™), y dicho anticuerpo es un anticuerpo IgG1 monoclonal humano que tiene una región V_L que consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 12 y una región V_H que consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 17.

45 En otra realización, dicho al menos un agente quimioterapéutico no corticosteroideo comprende talidomida (Thalomid®) o un análogo de talidomida, p. ej. CC-5013 (lenalidomida, Revlimid™) o CC4047 (Actimid™), y dicho anticuerpo es un anticuerpo IgG1 monoclonal humano que tiene una región V_L que consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 12 y una región V_H que consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 17.

50 En otra realización, dicho al menos un agente quimioterapéutico no corticosteroideo comprende un inhibidor de proteasoma, tal como bortezomib (Velcade®), y dicho anticuerpo es un anticuerpo IgG1 monoclonal humano que tiene una región V_L que consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 12 y una región V_H que consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 17.

55 En otra realización, dicho al menos un corticosteroideo comprende dexametasona, dicho al menos un agente quimioterapéutico no corticosteroideo comprende un inhibidor de proteasoma, tal como bortezomib (Velcade®), y dicho anticuerpo es un anticuerpo IgG1 monoclonal humano que tiene una región V_L que consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 12 y una región V_H que consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 17.

60 En otra realización, dicho al menos un agente quimioterapéutico no corticosteroideo comprende un alcaloide de vinca, tal como vincristina, y dicho anticuerpo es un anticuerpo IgG1 monoclonal humano que tiene una región V_L que consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 12 y una región V_H que consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 17.

En otra realización, dicho al menos un agente quimioterapéutico no corticosteroideo comprende una antraciclina, tal

como doxorubicina, y dicho anticuerpo es un anticuerpo IgG1 monoclonal humano que tiene una región V_L que consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 12 y una región V_H que consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 17.

5 En otra realización, dicho al menos un corticosteroide comprende prednisona, y dicho anticuerpo es un anticuerpo IgG1 monoclonal humano que tiene una región V_L que consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 12 y una región V_H que consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 17.

10 En otra realización, dicho al menos un corticosteroide comprende prednisona y dicho al menos un agente quimioterapéutico no corticosteroideo comprende melfalán, y dicho anticuerpo es un anticuerpo IgG1 monoclonal humano que tiene una región V_L que consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 12 y una región V_H que consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 17.

15 En otra realización, dicho al menos un corticosteroide comprende prednisona y dicho al menos un agente quimioterapéutico no corticosteroideo comprende talidomida, y dicho anticuerpo es un anticuerpo IgG1 monoclonal humano que tiene una región V_L que consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 12 y una región V_H que consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 17.

20 En otra realización, dicho al menos un corticosteroide comprende prednisona y dicho al menos un agente quimioterapéutico no corticosteroideo comprende melfalán y talidomida, y dicho anticuerpo es un anticuerpo IgG1 monoclonal humano que tiene una región V_L que consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 12 y una región V_H que consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 17.

25 En otra realización, dicho al menos un corticosteroide comprende dexametasona, y dicho anticuerpo es un anticuerpo IgG1 monoclonal humano que tiene una región V_L que consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 12 y una región V_H que consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 17.

30 En otra realización, dicho al menos un corticosteroide comprende dexametasona y dicho al menos un agente quimioterapéutico no corticosteroideo comprende talidomida y/o lenalidomida, y dicho anticuerpo es un anticuerpo IgG1 monoclonal humano que tiene una región V_L que consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 12 y una región V_H que consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 17.

35 En otra realización, dicho al menos un corticosteroide comprende dexametasona y dicho al menos un agente quimioterapéutico no corticosteroideo comprende vincristina y/o doxorubicina, y dicho anticuerpo es un anticuerpo IgG1 monoclonal humano que tiene una región V_L que consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 12 y una región V_H que consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 17.

40 Los anticuerpos adecuados para su uso en la presente invención también incluyen variantes de los anticuerpos de los Ejemplos. Una variante funcional de una V_L o V_H utilizada en el contexto de un anticuerpo contra CD38 todavía permite que el anticuerpo conserve al menos una proporción sustancial (al menos aproximadamente 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% o más) de la afinidad/avidez y/o la especificidad/selectividad del anticuerpo parental y en algunos casos, tal anticuerpo se puede asociar con mayor afinidad, selectividad y/o especificidad que el anticuerpo parental.

45 Un anticuerpo anti-CD38 "variante" es un anticuerpo que difiere de un anticuerpo parental (generado típicamente por inmunización) por una o más alteraciones adecuadas de residuos de aminoácidos, es decir, sustituciones, deleciones, inserciones o adiciones de secuencias terminales, en las secuencias de V_H y/o V_L (siempre que dichos cambios conserven, si no mejoren, al menos una cantidad sustancial de las características de unión al epítipo del anticuerpo parental).

50 Así, por ejemplo, en una variante de anticuerpo, se pueden introducir o insertar uno o más residuos de aminoácidos en o adyacentes a una o más de las regiones hipervariables de un anticuerpo parental. Una variante de anticuerpo anti-CD38 puede comprender cualquier número de residuos de aminoácidos insertados, siempre que se conserve al menos una cantidad sustancial de las características de unión al epítipo del anticuerpo parental. Una variante de anticuerpo anti-CD38 de la presente invención puede comprender, por ejemplo, de aproximadamente 1 a 30
55 residuos de aminoácidos insertados, por ejemplo, de aproximadamente 1 a 10, tal como, por ejemplo, de aproximadamente 2 a 10, por ejemplo de 2 a 5 o por ejemplo de aproximadamente 1 a 5 residuos de aminoácidos insertados. Del mismo modo, una variante de anticuerpo anti-CD38 de la presente invención puede comprender, por ejemplo, de aproximadamente 1 a 30 residuos de aminoácidos eliminados, por ejemplo de aproximadamente 1 a 10, tal como, por ejemplo, de aproximadamente 2 a 10, por ejemplo de 2 a 5 o por ejemplo de aproximadamente 1 a 5
60 residuos de aminoácidos eliminados. Del mismo modo, una variante de anticuerpo anti-CD38 de la presente invención puede comprender, por ejemplo, de aproximadamente 1 a 30 residuos de aminoácidos sustituidos, por ejemplo, de aproximadamente 1 a 10, tal como, por ejemplo, de aproximadamente 2 a 10, por ejemplo, de 2 a 5 o por ejemplo de aproximadamente 1 a 5 residuos de aminoácidos sustituidos. Del mismo modo, una variante de anticuerpo anti-CD38 útil para la presente invención puede comprender, por ejemplo, de aproximadamente 1 a 30

adiciones de residuos de aminoácidos de la secuencia terminal, por ejemplo de aproximadamente 1 a 10, tal como por ejemplo de aproximadamente 2 a 10, por ejemplo de 2 a 5 o por ejemplo de aproximadamente 1 a 5 adiciones de residuos de aminoácidos de secuencia terminal. Una variante de anticuerpo de la presente invención también puede comprender una combinación de dos o más de tales inserciones, deleciones, sustituciones y adiciones de residuos de aminoácidos de secuencia terminal, 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 epítomos de CD38.

En la presente memoria se describen anticuerpos que comprenden una CDR3 de V_H variante que consiste esencialmente en una secuencia que tiene al menos aproximadamente 80%, tal como al menos aproximadamente 85%, por ejemplo al menos aproximadamente 90%, tal como al menos aproximadamente 95% de identidad de secuencia de aminoácidos con una secuencia de acuerdo con cualquiera de SEQ ID NO: 10 o SEQ ID NO: 20 o SEQ ID NO: 30, en donde el anticuerpo tiene al menos una proporción sustancial (al menos aproximadamente 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% o más) de las características de unión al epítomo de un anticuerpo que tiene una secuencia de CDR3 de V_H variante de SEQ ID NO: 10 o SEQ ID NO: 20 o SEQ ID NO: 30, respectivamente, tal como un anticuerpo que tiene una secuencia de V_H de SEQ ID NO: 7 o SEQ ID NO: 17 o SEQ ID NO: 27, respectivamente, tal como un anticuerpo que tiene una secuencia de V_H de SEQ ID NO: 7 y una secuencia de V_L de SEQ ID NO: 2, o un anticuerpo que tiene una secuencia de V_H de SEQ ID NO: 17 y una secuencia de V_L de SEQ ID NO: 12, o un anticuerpo que tiene una secuencia de V_H de SEQ ID NO: 27 y una secuencia de V_L de SEQ ID NO: 22, respectivamente.

El porcentaje de identidad entre dos secuencias es una función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias (es decir, % de homología = núm. de posiciones idénticas/número total de posiciones x 100), teniendo en cuenta el número de espacios y la longitud de cada espacio, que debe introducirse para una alineación óptima de las dos secuencias. La comparación de las secuencias y la determinación del porcentaje de identidad entre dos secuencias se puede lograr utilizando un algoritmo matemático, como se describe en los ejemplos no limitativos a continuación.

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

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

Clases de residuos de aminoácidos para sustituciones conservativas

Residuos Ácidos	Asp y Glu
Residuos alcalinos	Lys, Arg y su
Residuos hidrófilos no cargados	Ser, Thr, Asn, y Gln
Residuos Alifáticos no Cargados	Gly, Ala, Val, Leu e Ile
Residuos no polares no cargados	Cys, Met y Pro
Residuos aromáticos	Phe, Tyr, y Trp

50

Clases alternativas de sustituciones conservativas 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)

Clasificaciones físicas y funcionales alternativas de Residuos de aminoácidos

Residuos que contienen grupos 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 giros	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

- 5 Los grupos de sustituciones más conservativas incluyen: valina-leucina-isoleucina, fenilalanina-tirosina, lisina-arginina, alanina-valina y asparragina-glutamina. También se pueden formular grupos adicionales de aminoácidos utilizando los principios descritos, por ejemplo, por Creighton (1984) en *Proteins: Structure and Molecular Properties* (2ª Ed. 1993), W.H. Freeman and Company.
- 10 Cuando se realizan inserciones en la región hipervariable para generar un anticuerpo variante, se debe tener en cuenta 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, las inserciones se pueden introducir en la secuencia de CDR1 de V_L de un anticuerpo parental mientras conserva un tamaño apropiado sustancialmente similar y, por lo tanto, esperado, que según Kabat et al., más arriba, p. ej., típicamente tiene un total de aproximadamente 9-20 (p. ej., aproximadamente 10-17) residuos. Del mismo modo, una CDR2 de V_L tiene típicamente una longitud total de aproximadamente 5-10 residuos; CDR3 de V_L tiene típicamente una longitud de aproximadamente 7-20 residuos; CDR1 de V_H tiene típicamente una longitud de aproximadamente 10-15 residuos; CDR2 de V_H tiene típicamente una longitud de aproximadamente 15-20 residuos; y CDR3 de V_H tiene típicamente una longitud de aproximadamente 6-30 residuos (p. ej., 3-25 residuos). Las inserciones en la región V_H típicamente se hacen en la CDR3 de V_H y, por lo general, cerca del extremo C terminal del dominio, por ejemplo, aproximadamente los residuos 97-102 de la CDR3 de V_H CDR3 parental (por ejemplo, adyacente a, o C-terminal en la secuencia con respecto, al residuo número 100 de la secuencia de CDR3 de V_H parental) utilizando el alineamiento y la numeración descritos por Kabat. Las variantes de anticuerpo con uno o varios residuos de aminoácido insertados en una región hipervariable del mismo se pueden preparar al azar, especialmente cuando la afinidad de unión inicial del anticuerpo parental para el antígeno diana es tal que las variantes de anticuerpo producidas aleatoriamente pueden seleccionarse fácilmente. Por ejemplo, la presentación en fagos proporciona un método conveniente para detectar tales variantes aleatorias.
- 25
- 30 En la presente memoria se describen anticuerpos que se caracterizan con respecto a su capacidad para competir (inhibir competitivamente) o competir de forma cruzada (es decir, inhibir la unión del epítipo de forma relativamente parcial) 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 tiene 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. Tal anticuerpo puede ser, por ejemplo, un fragmento Fab, derivado de un anticuerpo que se une a un epítipo idéntico o que se solapa con un epítipo unido por 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 tiene 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 tiene una secuencia de V_L de SEQ ID NO: 22 y una secuencia de V_H de SEQ ID NO: 27. La competición por la unión a CD38 o una porción de CD38 por dos o más anticuerpos se puede determinar mediante cualquier técnica adecuada. En una realización, la competición se determina, por ejemplo, como se describe en el Ejemplo 7, 8 y 9.

A menudo, la competición está marcada por una inhibición relativa significativamente mayor que aproximadamente 5%, según lo determinado por ELISA y/o el análisis FACS. Puede ser deseable establecer un umbral más alto de inhibición relativa como criterio/determinante de lo que es un nivel adecuado de competición en un contexto particular (p. ej., cuando el análisis de competición se utiliza para seleccionar o escrutar nuevos anticuerpos diseñados con la función prevista de bloquear la unión de otro péptido o molécula a CD38 (p. ej., los compañeros de unión naturales de CD38, tales como CD31, también denominado antígeno CD31, EndoCAM, GPIIA', PECAM-1, molécula de adhesión de las células plaquetarias/endoteliales o anticuerpo anti-CD38)). Así, por ejemplo, es posible establecer un criterio de competitividad en donde se detecte al menos aproximadamente 10% de inhibición relativa; se detecta al menos aproximadamente 15% de inhibición relativa; o se detecte al menos aproximadamente 20% de inhibición relativa antes de que un anticuerpo se considere suficientemente competitivo. En los casos en que los epítomos que pertenecen a anticuerpos competidores están localizados cerca de un antígeno, la competición puede estar marcada por una inhibición relativa de la unión a CD38 superior a aproximadamente 40% (p. ej., al menos aproximadamente 45% de inhibición, tal como al menos aproximadamente 50% de inhibición, por ejemplo, al menos aproximadamente 55% de inhibición, tal como al menos aproximadamente 60% de inhibición, por ejemplo, al menos aproximadamente 65% de inhibición, tal como al menos aproximadamente 70% de inhibición, por ejemplo al menos aproximadamente 75% de inhibición, tal como al menos aproximadamente 80% de inhibición, por ejemplo, al menos aproximadamente 85% de inhibición, tal como al menos aproximadamente 90% de inhibición, por ejemplo, al menos aproximadamente 95% de inhibición, o un nivel más alto de inhibición relativa).

En la presente memoria se describe un anticuerpo que se une específicamente a un epítipo de CD38 que también está unido específicamente a 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 tiene 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).

Un epítipo de CD38 unido a 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 tiene 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), se puede identificar mediante técnicas convencionales de mapeo y caracterización, cuyo ajuste adicional se puede identificar mediante cualquier mecanismo adecuado, cuyos ejemplos numerosos están disponibles para el experto en la técnica. Estos mecanismos también se pueden utilizar para identificar y/o caracterizar epítomos para anticuerpos anti-CD38 en general. Como ejemplo de tales métodos de mapeo/caracterización, se puede determinar un epítipo para un anticuerpo anti-CD38 por medio de la "huella" del epítipo utilizando la modificación química de las aminas/carboxilos expuestos en la proteína CD38. Un ejemplo específico de tal mecanismo de huella es el uso de HXMS (intercambio de hidrógeno-deuterio detectado por espectrometría de masas) en donde se produce un intercambio de hidrógeno/deuterio de los protones de amida de la proteína de ligando y receptor, unión, e intercambio de vuelta, en donde los grupos amida de la cadena principal que participan en la unión de la proteínas están protegidos del intercambio de vuelta y, por lo tanto, permanecerán deuterados. Las regiones relevantes se pueden identificar en este punto por proteólisis péptica, separación por cromatografía líquida de alto rendimiento de microprocesador rápido y/o espectrometría de masas de ionización por electropulverización. Véanse, por ejemplo, Ehring H, *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 se compara típicamente la posición de las señales en los espectros de RMN bidimensionales del antígeno libre y el antígeno complejo con el péptido de unión al antígeno, tal como un anticuerpo. El antígeno normalmente se marca de forma isotópica selectiva con ^{15}N , de modo que solo se ven señales correspondientes al antígeno y no se ve ninguna señal del péptido de unión al antígeno en el espectro de RMN. Las señales de antígenos que se originan a partir de los aminoácidos implicados en la interacción con el péptido de unión al antígeno generalmente cambiarán de posición en los espectros del complejo en comparación con los espectros del antígeno libre, y los aminoácidos implicados en la unión se pueden identificar de esa manera. 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).

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

Las técnicas de digestión con proteasa también pueden ser útiles en el contexto del mapeo e identificación de epítomos. Las regiones/secuencias relevantes para los determinantes antigénicos se pueden determinar mediante digestión con proteasas, p. ej. mediante el uso de tripsina en una proporción de aproximadamente 1:50 para la

digestión de CD38 durante la noche (O/N), a 37°C y pH 7-8, seguido de un análisis de espectrometría de masas (MS) para la identificación de péptidos. Los péptidos protegidos de la escisión con tripsina del anticuerpo se pueden identificar posteriormente por comparación de muestras sometidas a digestión con tripsina y muestras incubadas con anticuerpo y después sometidas a digestión p. ej. con tripsina (revelando así una huella para el aglutinante).
 5 También, o alternativamente, se pueden utilizar otras enzimas como la quimotripsina, la pepsina, etc., en un método de caracterización de epítomos similar. Se considera que un anticuerpo que proporciona significativamente el mismo resultado 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 (tal como el anticuerpo -003), o un anticuerpo que tiene 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) en estas mediciones es un anticuerpo que se une al 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 (tal como el anticuerpo -003), o un anticuerpo que tiene 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), respectivamente. Véase por ejemplo Manca, Ann 1st Super Sanita. 27(1), 15-9 (1991) para una discusión de técnicas similares.

Otros métodos potencialmente útiles para mapear epítomos incluyen técnicas de cristalografía, técnicas de difracción de rayos X (tales como las técnicas de estudio de difracción de rayos X/secuencia desarrolladas por Poljak y otros en la década de 1970-1980) y la aplicación de la Tecnología de Síntesis de péptidos Multipin. Los métodos informáticos tales como el análisis de secuencias y el análisis de estructuras tridimensionales y el acoplamiento también se pueden utilizar para identificar determinantes antigénicos. Por ejemplo, también se puede determinar un epítomo por modelado molecular utilizando una estructura de CD38 con acoplamiento de la estructura del fragmento Fab del anticuerpo monoclonal individual. Estos y otros métodos de mapeo se discuten en Epitope Mapping A Practical Approach (Westwood y Hay Eds.) 2001 Oxford University Press.

Un anticuerpo utilizado en la presente invención puede tener cualquier afinidad y/o avidez adecuada para un epítomo contenido en CD38. La afinidad se refiere a la fuerza de unión del anticuerpo a semejante epítomo. Típicamente, la afinidad se mide por la constante de disociación K_D , definido como $[Ab] \times [Ag]/[Ab-Ag]$ donde $[Ab-Ag]$ es la concentración molar del complejo anticuerpo-antígeno (o el complejo antígeno-anticuerpo), $[Ab]$ es la concentración molar del anticuerpo no unido 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 la afinidad por inhibición competitiva se pueden encontrar, por ejemplo, en Harlow et al., Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring 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).

Los anticuerpos anti-CD38 utilizados en la presente invención pueden tener una afinidad por un epítomo de CD38 en el intervalo de aproximadamente 10^4 a aproximadamente $10^{10} M^{-1}$. Tal anticuerpo puede tener una afinidad que sea al menos tan grande para CD38 como la de -003 y -005 y -024, y en algunas realizaciones tiene una afinidad que es al menos tan grande como la de -003 y -005 y -024. La afinidad se puede determinar por cualquiera de los métodos descritos en otra parte de la presente memoria o sus equivalentes conocidos en la técnica. Un ejemplo de un método que se puede utilizar para determinar la afinidad se proporciona en Scatchard analysis of Munson & Pollard, Anal. Biochem. 107, 220 (1980). La afinidad de unión también se puede determinar mediante métodos de equilibrio (por ejemplo, ensayo de inmunoabsorción con enzima ligada (ELISA) o radioinmunoensayo (RIA)) o análisis cinético (por ejemplo, análisis BIACORE™).

Típicamente, la constante de disociación para los anticuerpos anti-CD38 utilizados en la presente invención es menor que aproximadamente 100 nM, menor que aproximadamente 50 nM, menor que aproximadamente 10 nM, aproximadamente 5 nM o menos, aproximadamente 1 nM o menos, aproximadamente 0,5 nM o menos, aproximadamente 0,1 nM o menos, aproximadamente 0,01 nM o menos, o incluso aproximadamente 0,001 nM o menos.

Los ejemplos no limitantes de anticuerpos anti-CD38 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 humanas idénticas en su totalidad (es decir, no quiméricas); (b) una molécula de inmunoglobulina completa, funcional que comprende: (i) dos cadenas pesadas quiméricas idénticas que comprenden una región variable como se indica, y una región constante humana, y (ii) dos cadenas ligeras no humanas idénticas en su totalidad (es decir, no quiméricas) cadenas; (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 como se indica, y una región constante humana, y (ii) dos cadenas ligeras diferentes, solo una de las cuales tiene la misma especificidad que la región variable de las cadenas pesadas. La molécula de anticuerpo resultante se une solo a un extremo de la misma y, por lo tanto, no es susceptible de unión divalente. Como otra ilustración, se puede

decir que los péptidos relacionados con la inmunoglobulina 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')₂; (j) una molécula de Fv; y (k) una molécula de Fv unida por disulfuro.

En una realización, el anticuerpo utilizado en la invención está glicosilado en una célula eucariótica. En otra realización, el anticuerpo utilizado en la invención comprende adicionalmente un conector quelante para anclar un radioisótopo. En una realización adicional, el anticuerpo utilizado en la invención está en una forma sustancialmente aislada.

Un anticuerpo monoclonal se refiere a una composición que comprende una población homogénea de anticuerpos que tiene una estructura y especificidad uniformes. Típicamente, un anticuerpo monoclonal es un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos, excepto por posibles mutaciones naturales que pueden estar presentes en pequeñas cantidades. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos y cada anticuerpo monoclonal se dirige típicamente contra un solo epítipo, que está en contraste con las preparaciones de anticuerpos policlonales que incluyen típicamente diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes epítopos. No se debe interpretar que un anticuerpo que sea monoclonal requiera la producción del anticuerpo por ningún método en particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales de la presente invención se pueden producir por el método de hibridoma descrito por primera vez por Kohler et al., *Nature* 256, 495 (1975), o puede ser producido por métodos de ADN recombinante. Los anticuerpos monoclonales también se pueden aislar de bibliotecas de anticuerpos en fagos utilizando las técnicas descritas, por ejemplo, por Clackson et al., *Nature* 352, 624-628 (1991) y Marks et al., *J. Mol. Biol.* 222, 581-597 (1991).

Los anticuerpos monoclonales se pueden obtener de cualquier fuente adecuada. Así, por ejemplo, se pueden obtener anticuerpos monoclonales 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 la superficie, o un ácido nucleico que codifica un antígeno de interés. Los anticuerpos monoclonales también se pueden obtener a partir de hibridomas derivados de células que expresan anticuerpos de seres humanos inmunizados o de mamíferos no humanos tales como ratas, perros, primates, etc.

Alternativamente, los genes de anticuerpos clonados se pueden expresar en otros sistemas de expresión, incluyendo las células procarióticas, tales como microorganismos, tales como *E. coli*, para la producción de anticuerpos Fv de cadena sencilla, "algi", así como células de insectos. Además, los anticuerpos se pueden producir en animales transgénicos no humanos, tal como en la leche de ovejas y conejos o en huevos de gallinas, o en plantas transgénicas. Véanse 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 anticuerpos monoclonales humanos dirigidos contra CD38 se pueden generar utilizando ratones transgénicos o transcromosómicos que portan partes del sistema inmunitario humano en lugar del sistema de ratón. Tales ratones transgénicos y transcromosómicos incluyen ratones referidos en la presente memoria como ratones HuMAb y ratones KM, respectivamente, y se denominan colectivamente en la presente memoria "ratones transgénicos". Un anticuerpo monoclonal humano generado en tales ratones se puede abreviar como HuMAb.

El ratón HuMAb contiene miniloci de un gen de inmunoglobulina humana que codifica secuencias de inmunoglobulina de cadena pesada humana (μ y γ) ligera κ no reorganizadas, junto con mutaciones elegidas como diana que inactivan los loci de las cadenas μ y κ endógenas (Lonberg, N. et al., *Nature* 368, 856-859 (1994)). Por consiguiente, los ratones muestran una reducción de la expresión de IgM o κ de ratón y, en respuesta a la inmunización, los transgenes de cadena pesada y ligera humanas introducidos, sufren un cambio de clase y mutación somática para generar anticuerpos monoclonales IgG, κ humanos de alta afinidad, (Lonberg, N. et al.) (1994), más arriba; 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 ratones HuMAb es descrita con detalle por 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.

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

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

El ratón KM contiene un transcromosoma de cadena pesada humana y un transgén de cadena ligera κ humana. Los genes de la cadena ligera y pesada de ratón endógenos también se han alterado en los ratones KM, de modo que la inmunización de los ratones conduce a la producción de inmunoglobulinas humanas en lugar de inmunoglobulinas de ratón. La construcción de ratones KM y su uso para elevar las inmunoglobulinas humanas se describe con detalle en el documento WO 02/43478. Los esplenocitos de estos ratones transgénicos se pueden usar para generar hibridomas que secretan anticuerpos monoclonales humanos de acuerdo con técnicas bien conocidas.

Los anticuerpos monoclonales o policlonales humanos, o anticuerpos originados de otras especies también se pueden generar de manera transgénica a través de la generación de otro mamífero no humano o planta que sean transgénicos para las secuencias de cadena pesada y ligera de inmunoglobulina de interés y la producción del anticuerpo en una forma recuperable. En relación con la producción transgénica en mamíferos, los anticuerpos se pueden producir y recuperar 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.

Adicionalmente, los anticuerpos humanos utilizados en la presente invención o los anticuerpos de otras especies se pueden generar a través de tecnologías de tipo de presentación, que incluyen, sin limitación, presentación en fagos, presentación retroviral, presentación en ribosomas y otros mecanismos, utilizando mecanismos bien conocidos en la técnica y las moléculas resultantes se pueden someter a una maduración adicional, tal como la maduración por afinidad, ya que tales mecanismos son bien conocidos en la técnica (véanse 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 en ribosomas), 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 y McCafferty TIBTECH 10, 80-84 (1992), y documento US 5.733.743). Si se utilizan tecnologías de presentación para producir anticuerpos que no son humanos, tales anticuerpos se pueden humanizar, por ejemplo, como se describe en otro lugar en la presente memoria.

Los ejemplos de cómo elaborar anticuerpos humanizados se pueden encontrar, por ejemplo, en los documentos US 6.054.297, US 5.886.152 y US 5.877.293. Además, el uso de ADNc de Ig para la construcción de genes de inmunoglobulina quiméricos es conocido en la técnica (véanse por ejemplo Liu et al., PNAS USA 84, 3439 (1987) y J. Immunol. 139, 3521 (1987).

Los anticuerpos anti-CD38 se pueden recuperar de bibliotecas combinatorias de anticuerpos recombinantes, tal como una biblioteca de presentación en fagos de scFv, que se puede preparar con ADNc de V_L y V_H humanos preparados a partir de ARNm derivado de linfocitos humanos. Los métodos para preparar y escrutar tales bibliotecas son conocidos en la técnica. Hay una serie de kits disponibles comercialmente para generar bibliotecas de presentación en fagos. También hay otros métodos y reactivos que se pueden utilizar para generar y escrutar bibliotecas de presentación de anticuerpos (véanse, 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_L y V_H adecuadas se pueden seleccionar utilizando cualquier método apropiado. Por ejemplo, los ácidos nucleicos de V_L y V_H se pueden seleccionar empleando los métodos de impronta epitépica descritos en el documento WO 93/06213. Las bibliotecas de anticuerpos, tales como las bibliotecas de scFv, se pueden preparar y escrutar utilizando métodos conocidos y adecuados (con péptidos que contienen CD38 humanos como antígeno), tales como los descritos, por ejemplo, en el documento WO92/01047, McCafferty et al., Nature 348, 552-554 (1990) y Griffiths et al., EMBO J 12, 725-734 (1993). Tales bibliotecas de anticuerpos se pueden utilizar terapéuticamente para proporcionar una respuesta inmunitaria más completa; como herramientas en los métodos de escrutinio de péptidos inmunogénicos, moléculas pequeñas, otros anticuerpos anti-CD38 (p. ej., mediante ensayos de competición), y similares; y/o en métodos y

composiciones de diagnóstico (p. ej., se puede preparar un chip de inmunoensayo que comprende un panel de tales anticuerpos, opcionalmente en asociación con otros anticuerpos mediante técnicas convencionales). Una vez que se seleccionan los segmentos de V_L y V_H humanos iniciales, se pueden realizar experimentos de "mezcla y coincidencia", en los que diferentes pares de los segmentos de V_L y V_H seleccionados inicialmente se escrutan para determinar la unión del péptido que contiene CD38, para seleccionar las combinaciones de pares de V_L/V_H deseables. Por ejemplo, la reactividad de los péptidos se puede determinar por medio de ELISA u otros métodos de análisis de epítomos adecuados (véanse por ejemplo Scott, J. K. y Smith, G. P. *Science* 249, 386-390 (1990), Cwirlla 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 la discusión de tales técnicas y principios). Los anticuerpos se pueden seleccionar por su afinidad por el antígeno y/o por su cinética de disociación (velocidad de disociación) del antígeno (véase, por ejemplo, Hawkins et al., *J. Mol. Biol.* 226, 889-896 (1992)).

Los péptidos de anticuerpos de alta afinidad, tales como los fragmentos de anticuerpos Fv de cadena sencilla (scFv) y Fab humanos, también se pueden aislar de tales bibliotecas utilizando una técnica de inmunopurificación en la que el antígeno de interés está inmovilizado sobre una superficie sólida, tal como placas de microtitulación o esferas (véanse 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 bibliotecas grandes no sometidas a tratamiento previo también hace posible aislar anticuerpos humanos directamente sin inmunización (véase, por ejemplo, de Haard et al., *J. Biol. Chem.* 274 (26), 18218-18230 (1999)).

Los anticuerpos adecuados para su uso en la presente invención se pueden seleccionar basándose en su capacidad para proporcionar la capacidad de fijación del complemento, o no. Existe una serie de isotipos de anticuerpos que son susceptibles de fijación del complemento y CDC, incluyendo, pero no limitados a, 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. La determinación de isotipos y otros métodos para modificar la fijación del complemento y las características funcionales de la CDC de los anticuerpos son conocidos en la técnica.

Los anticuerpos anti-CD38 utilizados en la presente invención se pueden preparar por expresión recombinante en cualquier tipo adecuado de células o animales. Los métodos adecuados para la producción de anticuerpos son conocidos en la técnica e incluyen los descritos, por ejemplo, por Harlow et al., en *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)), 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 se pueden producir utilizando el método de hibridoma descrito por primera vez por Kohler et al., *Nature* 256, 495 (1975), o por otros métodos conocidos y desarrollados posteriormente (véase, p. ej., Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, pág. 59-103 (Academic Press, 1986)). Los hibridomas se pueden utilizar en la producción de anticuerpos anti-CD38 de la presente invención. Tales hibridomas se pueden formar mediante fusión química, fusión eléctrica o cualquier otra técnica adecuada, con cualquier tipo de mieloma adecuado, heteromieloma, células linfoblastoides, plasmacitoma u otro equivalente de los mismos y cualquier tipo adecuado de célula que exprese anticuerpos. Las células B inmortalizadas transformadas también se pueden utilizar para producir eficazmente anticuerpos de la presente invención. Tales células se pueden producir mediante técnicas convencionales, tales como la transformación con un virus de Epstein Barr o un gen transformador. (Véase, p. ej., "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, pág. 19-33).

Las células recombinantes que comprenden ácidos nucleicos exógenos que codifican anticuerpos anti-CD38 se pueden preparar mediante cualquier técnica adecuada (p. ej., transfección/transformación con un vector plasmídico de ADN desnudo, vector viral, vector de célula bacteriana invasiva u otro vector de célula completa, etc., que comprende una secuencia (o secuencias) codificante de anticuerpo suministrada a la célula mediante transfección facilitada por precipitación con fosfato de calcio, direccionamiento y transfección mediados por el receptor, suministro biolístico, electroporación, transfección mediada por dextrano, transformación mediada por liposomas, fusión de protoplastos, microinyección directa, etc.) . Los métodos para transformar/transfectar células son bien conocidos en la técnica (véanse, p. ej., 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)).

Las líneas celulares disponibles como anfitriones para la expresión de proteínas recombinantes son bien conocidas en la técnica e incluyen muchas líneas celulares inmortalizadas disponibles de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC). Estas incluyen, entre otras, células de ovario de hámster chino (CHO), células NSO, SP2, células HeLa, células de riñón de cría de hámster (BHK), células de riñón de mono (COS), células de carcinoma hepatocelular humano (p. ej., Hep G2), células A549, y una serie de otras líneas celulares. Otras líneas celulares que se pueden utilizar son líneas celulares de insectos, tales como las células Sf9. Cuando los ácidos nucleicos (o vectores que contienen los ácidos nucleicos) que codifican las proteínas, tales como los anticuerpos anti-CD38, se

introducen en células anfitrionas de mamífero, las proteínas se pueden producir cultivando las células anfitrionas durante un período de tiempo suficiente para permitir la expresión de la proteína en las células anfitrionas o por medio de la secreción de la proteína al medio de cultivo en el que se cultivan las células anfitrionas. Los anticuerpos se pueden recuperar del medio de cultivo utilizando métodos convencionales de purificación de proteínas. Los anticuerpos también se pueden recuperar de los productos lisados de las células anfitrionas cuando se expresan directamente sin una señal secretora.

Cuando se introducen vectores de expresión recombinantes que codifican genes de anticuerpos anti-CD38 en células anfitrionas de mamífero, los anticuerpos se producen cultivando las células anfitrionas durante un período de tiempo suficiente para permitir la expresión del anticuerpo en las células anfitrionas o para la secreción del anticuerpo al medio de cultivo en el que se cultivan las células anfitrionas. La purificación de anticuerpos a partir de cultivos celulares, productos lisados celulares y animales (p. ej., del fluido ascítico de un animal transgénico que produce anticuerpos anti-CD38) se puede lograr mediante la aplicación de cualquier número de mecanismos adecuados conocidos en la técnica, incluyendo, p. ej., purificación en columna por inmutafinidad; precipitación con sulfato; cromatofenofque; SDS-PAGE preparativa, y similares.

Los anticuerpos monoclonales humanos de la presente invención también se pueden producir mediante una variedad de técnicas diferentes, incluyendo la metodología de anticuerpos monoclonales convencional, p. ej., la técnica de hibridación de células somáticas convencional de Kohler y Milstein, Nature 256, 495 (1975). También se pueden emplear otros mecanismos para producir anticuerpos monoclonales, p. ej., mecanismos de presentación en fagos utilizando bibliotecas de genes de anticuerpos 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 hibridomas en el ratón es un procedimiento muy bien establecido. Los protocolos y mecanismos de inmunización para el aislamiento de esplenocitos inmunizados para la fusión son conocidos en la técnica. Los compañeros de fusión (p. ej., células de mieloma murino) y los procedimientos de fusión también son conocidos.

Para generar anticuerpos monoclonales completamente humanos contra CD38, se pueden inmunizar ratones transgénicos o transcromosómicos que contienen genes de inmunoglobulina humana (p. ej., ratones HCo12, HCo7 o KM) con una preparación enriquecida de antígeno CD38 y/o células que expresan CD38, como describen, por ejemplo, Lonberg et al., (1994), más arriba, Fishwild et al., (1996), más arriba, y el documento WO 98/24884. Alternativamente, los ratones se pueden inmunizar con ADN que codifica CD38 humano. Los ratones pueden tener 6-16 semanas de edad después de la primera infusión. Por ejemplo, se puede utilizar una preparación enriquecida (5-50 µg) del antígeno CD38 para inmunizar los ratones HuMAb por vía intraperitoneal. En el caso de que las inmunizaciones que utilizan una preparación purificada o enriquecida del antígeno CD38 no produzcan anticuerpos, los ratones también se pueden inmunizar con células que expresan CD38, por ejemplo, una línea celular, para promover respuestas inmunitarias.

La experiencia acumulada con varios 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 coadyuvante completo de Freund, seguido de inmunizaciones i.p. (hasta un total de 10) en semanas alternas con células que expresan CD38 en PBS. La respuesta inmunitaria se puede controlar durante el curso del protocolo de inmunización, obteniéndose muestras de plasma mediante sangrados retroorbitales. El plasma se puede escrutar mediante análisis FACS, y se pueden utilizar los ratones con títulos suficientes de inmunoglobulina humana anti-CD38 para las fusiones. Los ratones se pueden reforzar por vía intravenosa con células que expresan CD38 para los Ejemplos 4 y 3 días antes del sacrificio y la extracción del bazo.

Para generar hibridomas que producen anticuerpos monoclonales humanos contra CD38 humano, se pueden aislar esplenocitos y células de ganglios linfáticos de ratones inmunizados y fusionarlos con una línea celular inmortalizada apropiada, tal como una línea celular de mieloma de ratón. Los hibridomas resultantes se pueden escrutar a continuación para determinar la producción de anticuerpos específicos del antígeno. Por ejemplo, las suspensiones de células individuales de linfocitos esplénicos de ratones inmunizados se pueden fusionar con células de mieloma de ratón SP2/0 no secretoras (ATCC, CRL 1581) con PEG al 50% (p/v). Las células se pueden cultivar en placas a aproximadamente 1 x 10⁵ por pocillo en una placa de microtitulación de fondo plano, seguido de una incubación de dos semanas en medio selectivo que contiene, además de los reactivos habituales, 10% de Suero de Clon fetal, 5-10% de factor de clonación de hibridoma de origen (IGEN) y 1X HAT. (Sigma). Después de aproximadamente dos semanas, las células se pueden cultivar en un medio en el que la HAT se reemplaza por HT. Los pocillos individuales se pueden escrutar a continuación mediante ELISA para detectar anticuerpos que contienen cadenas ligeras kappa humanas y mediante análisis FACS utilizando células que expresan CD38 para determinar la especificidad de CD38. Una vez que se produce un crecimiento extenso del hibridoma, el medio puede observarse generalmente después de 10-14 días. Los hibridomas que secretan anticuerpos pueden ser volver a cultivar en placa, y si aún son positivos para la IgG humana, los anticuerpos monoclonales anti-CD38 pueden ser subclonados al menos dos veces por dilución limitante. Los subclones estables pueden ser cultivados después *in vitro* para generar anticuerpo en medio de cultivo tisular para su caracterización.

Los anticuerpos humanos de la presente invención también se pueden producir en un transfectoma de una célula anfitriona utilizando, por ejemplo, una combinación de técnicas de ADN recombinante y métodos de transfección de genes como es bien conocido en la técnica, véase por ejemplo Morrison, S., Science 229, 1202 (1985).

5 Por ejemplo, para expresar los anticuerpos, o fragmentos de anticuerpos de los mismos, se pueden obtener ADN que codifican cadenas ligeras y pesadas de longitud parcial o completa, mediante técnicas convencionales de biología molecular (por ejemplo, amplificación por PCR, mutagénesis dirigida al sitio) y se pueden insertar en vectores de expresión, de tal manera que los genes están conectados operativamente a las secuencias de control de la transcripción y la traducción. En este contexto, se pretende que el término "conectado operativamente" 10 signifique que un gen de anticuerpo está ligado en un vector de tal manera que las secuencias de control de la transcripción y la traducción dentro del vector cumplen su función prevista de regular la transcripción y la traducción del gen de anticuerpo. El vector de expresión y las secuencias de control de la expresión se eligen para que sean compatibles con la expresión de la célula anfitriona utilizada. El gen de la cadena ligera del anticuerpo y el gen de la cadena pesada del anticuerpo se pueden insertar en vectores separados o, más típicamente, ambos genes se insertan en el mismo vector de expresión. Los genes de anticuerpos se pueden insertar en el vector de expresión por métodos convencionales (p. ej., la ligación de sitios de restricción complementarios en el fragmento del gen del anticuerpo y el vector, o ligadura de extremo como si no hay sitios de restricción presentes). Las regiones variables de la cadena ligera y pesada de los anticuerpos descritos en la presente memoria se pueden utilizar para crear genes de anticuerpos completos de cualquier isotipo de anticuerpo insertándolos en vectores de expresión que ya 20 codifican regiones constantes de cadena pesada y de cadena ligera del isotipo deseado, de manera que el segmento V_H está conectado operativamente al segmento de CL dentro del vector y el segmento V_L está conectado operativamente al segmento de CL dentro del vector. Adicional o alternativamente, el vector de expresión recombinante puede codificar un péptido señal que facilita la secreción de la cadena de anticuerpo de una célula anfitriona. El gen de la cadena del anticuerpo se puede clonar en el vector de manera que el péptido señal esté conectado en marco al extremo amino del gen de la cadena del anticuerpo. El péptido señal puede ser un péptido señal de inmunoglobulina o un péptido señal heterólogo (es decir, un péptido señal de una proteína distinta de inmunoglobulina).

Además de los genes de las cadenas del anticuerpo, los vectores de expresión recombinantes llevan secuencias reguladoras que permiten y controlan la expresión de los genes de la cadena de anticuerpos en una célula anfitriona. Además, los vectores de expresión recombinantes pueden llevar secuencias adicionales, tales como secuencias que regulan la replicación del vector en células anfitrionas (p. ej., orígenes de replicación) y genes marcadores seleccionables. El gen marcador seleccionable facilita la selección de células anfitrionas 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, normalmente el gen marcador seleccionable confiere resistencia a fármacos, tales como G418, higromicina o metotrexato, a una célula anfitriona en la que se ha introducido el vector. Los ejemplos de genes marcadores seleccionables incluyen el gen de la dihidrofolato reductasa (DHFR) (para su uso en células anfitrionas dhfr- con selección/amplificación por metotrexato) y el gen neo (para la selección con G418).

40 Para la expresión de las cadenas ligeras y pesadas, el vector o los vectores de expresión que codifican las cadenas pesadas y ligeras se transfectan en una célula anfitriona mediante técnicas convencionales. Las células anfitrionas pueden ser procarióticas o eucarióticas, tales como células anfitrionas de mamíferos. Por ejemplo, los fragmentos de unión a antígeno se pueden expresar en células anfitrionas procarióticas y los anticuerpos completos se pueden expresar en células anfitrionas eucarióticas.

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

Los genes de anticuerpos se pueden expresar en otros sistemas de expresión, incluyendo células procarióticas, tales como microorganismos, p. ej. E. coli para la producción de anticuerpos scFv, "algi", así como células de insecto. Además, los anticuerpos se pueden producir en animales transgénicos no humanos, tal como en la leche de ovejas y conejos o en los huevos de gallinas, o en plantas transgénicas. Véanse 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).

60 **Anticuerpos biespecíficos y multiespecíficos**

En una realización, el anticuerpo utilizado puede estar derivatizado o unido 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 utilizado en la presente invención puede

estar unido funcionalmente (por ejemplo, por acoplamiento químico, fusión genética, asociación no covalente o de otra manera) a una o más moléculas de unión, tales como otro anticuerpo, péptido o mimético de unión.

5 Por consiguiente, el anticuerpo puede ser una molécula biespecífica o multiespecífica que comprende al menos una primera especificidad de unión para CD38 y una segunda especificidad de unión para un segundo epítipo diana. En una realización de la presente invención, el segundo epítipo diana es un receptor de Fc, p. ej., FcγRI humano (CD64) o un receptor de Fcα humano (CD89), o un receptor de células T, p. ej., CD3. En una realización, las moléculas biespecíficas y multiespecíficas pueden ser capaces de unirse a células efectoras que expresan FcγR, FcαR o FcεR (p. ej., monocitos, macrófagos o células polimorfonucleares (PMN)), y a células diana que expresan CD38. Estas moléculas biespecíficas y multiespecíficas dirigen las células que expresan CD38 a la célula efectora y desencadenan actividades de la célula efectora mediadas por el receptor de Fc, tales como la fagocitosis de las células que expresan CD38, la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC), la liberación de citoquinas o la generación de aniones superóxido.

15 En una realización, las moléculas biespecíficas y multiespecíficas comprenden como especificidad de unión al menos un anticuerpo adicional, que incluye, p. ej., un Fab, Fab', F(ab')₂, Fv o un scFv. El anticuerpo adicional también puede ser un dímero de cadena ligera o cadena pesada, o cualquier fragmento mínimo del mismo, tal como un Fv o una construcción de cadena sencilla como describen Ladner et al., en el documento US 4.946.778. El anticuerpo también puede ser una proteína de fusión de inmunoglobulina con dominio de unión como se describe en los documentos US 2003/0118592 y US 2003/0133939.

25 En una realización, la especificidad de unión para un receptor de Fc es proporcionada por un anticuerpo monoclonal humano, cuya unión no está bloqueada por la inmunoglobulina G humana (IgG). Como se emplea en la presente memoria, el término "receptor de IgG" se refiere a cualquiera de los ocho genes de la cadena γ y ubicados en el cromosoma 1. Estos genes codifican un total de doce isoformas de receptor soluble o transmembrana que se agrupan en tres clases de receptores de Fc*: FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) y FcγRIII (CD16). En una realización, el receptor de Fcγ es un FcγRI de alta afinidad humano. La producción y caracterización de estos anticuerpos monoclonales son descritas por Fanger et al., en los documentos WO 88/00052 y US 4.954.617. Estos anticuerpos se unen a un epítipo de FcγRI, FcγRII o FcγRIII en un sitio que es distinto del sitio de unión a Fcγ del receptor y, por lo tanto, su unión no está bloqueada sustancialmente por los niveles fisiológicos de IgG. Los anticuerpos anti-FcγRI 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 de Fcγ es una forma humanizada de mAb 22 (H22). La producción y caracterización del anticuerpo H22 es descrita por Graziano, R.F. et al., en J. Immunol. 155(10), 4996-5002 (1995) y en el documento WO 94/10332. La línea celular productora de anticuerpos H22 se depositó en la Colección Americana de Cultivos Tipo el 4 de noviembre de 1992 con la designación HA022CL1 y tiene el número de registro CRL 11177.

40 En una realización, la especificidad de unión para un receptor de Fc es proporcionada por un anticuerpo que se une a un receptor de IgA humano, p. ej., un receptor de Fcα (FcαI (CD89)), cuya unión en una realización no está bloqueada por la inmunoglobulina A humana (IgA). Se pretende que el término "receptor de IgA" incluya el producto génico de un gen α (FcαRI) ubicado en el cromosoma 19. Se sabe que este gen codifica varias isoformas transmembrana empalmadas alternativamente de 55 a 110 kDa. FcαRI (CD89) se expresa de forma constitutiva en monocitos/macrófagos, granulocitos eosinófilos y neutrofilos, pero no en poblaciones de células no efectoras. FcαRI tiene una afinidad media tanto para IgA1 como para IgA2, que aumenta con la exposición a citoquinas tales como G-CSF o GM-CSF (Morton, H.C. et al., Critical Reviews in Immunology 16, 423-440 (1996)). Se han descrito cuatro anticuerpos monoclonales específicos de FcαRI, identificados como A3, A59, A62 y A77, que se unen a FcαRI fuera del dominio de unión al ligando de IgA (Monteiro, R.C. et al., J. Immunol. 148, 1764 (1992)).

50 FcαRI, FcγRI, FcγRII y FcγRIII, especialmente FcγRII y FcγRIII, son ejemplos de receptores desencadenantes para su uso en la presente invención porque (1) se expresan principalmente en células efectoras inmunitarias, p. ej., monocitos, PMN, macrófagos y células dendríticas; (2) se expresan a niveles altos (por ejemplo, 5.000-100.000 por célula); (3) son mediadores de actividades citotóxicas (por ejemplo, ADCC, fagocitosis); y (4) median una mejor presentación de antígenos de los antígenos, incluyendo los auto-antígenos, dirigidos a ellos.

55 Las moléculas de anticuerpos biespecíficos ilustrativas comprenden (i) dos anticuerpos, uno con una especificidad para CD38 y otro con una segunda diana que se conjugan entre sí, (ii) un único anticuerpo que tiene una cadena específica para CD38 y una segunda cadena específica para una segunda molécula, y (iii) un anticuerpo de cadena sencilla que tiene especificidad por CD38 y una segunda molécula. Típicamente, la segunda diana/segunda molécula es una molécula distinta de CD38. En una realización, la segunda molécula es un antígeno canceroso/antígeno asociado a tumor tal como antígeno carcinoembrionario (CEA), antígeno específico de próstata (PSA), RAGE (antígeno renal), α-fetoproteína, CAMEL (antígeno reconocido por CTL en el 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 (p. ej., MUC1, mucina-CA125, etc.), antígenos gangliósidos, 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 al cáncer, tal como la integrina $\alpha 5\beta 3$. En una realización, la segunda molécula es un factor angiogénico u otro factor de crecimiento asociado al cáncer, tal como factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), factor de crecimiento epidérmico (EGF), receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), angiogenina y receptores de los mismos, particularmente los receptores asociados con la progresión del cáncer (por ejemplo, uno de los receptores HER1-HER4). Otras proteínas asociadas con la progresión del cáncer discutidas en la presente memoria también pueden ser segundas moléculas adecuadas. En una realización, la segunda molécula es una molécula expresada sobre la superficie de células de mieloma múltiple, tales como CD138.

En una realización, un anticuerpo biespecífico es un diacuerpo.

Los anticuerpos biespecíficos y multiespecíficos se pueden elaborar utilizando 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.

Productos conjugados

En una realización, el anticuerpo contra CD38 se conjuga con un radical terapéutico, tal como una citotoxina, un fármaco quimioterapéutico, un inmunosupresor o un radioisótopo. Tales productos conjugados se denominan en la presente memoria "productos inmunoconjugados". Los productos inmunoconjugados que incluyen una o más citotoxinas se conocen como "inmuno-toxinas".

Una citotoxina o agente citotóxico incluye cualquier agente que sea perjudicial para (p. ej., que destruya) las células. Para una descripción de estas clases de fármacos que son bien conocidos en la técnica, y sus mecanismos de acción, véase Goodman et al., Goodman y Gilman's, The Pharmacological Basis Of Therapeutics, 8ª edición, Macmillan Publishing Co., 1990. Otras técnicas relevantes para la preparación de inmunotoxinas de anticuerpos, son proporcionadas, por ejemplo, por Vitetta, en Immunol. Today 14, 252 (1993) y en el documento US 5.194.594.

Los agentes terapéuticos adecuados para la formación de productos inmunoconjugados incluyen taxol, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorrubicina, dihidroxi antracínodiona, mitoxantrona, actinomicina D, 1-deshidrotestosterona, glucocorticoides, procáina, tetracaína, lidocaína, propranolol, y puromicina, antimetabolitos (tales como metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, fludarabina, 5-fluorouracilo, descabazina, hidroxurea, asparraginas, gemcitabina, cladribina), agentes alquilantes (tales como mecloretamina, tioepa, clorambucilo, melfalán, carmustina (BSNU), lomustina (CCNU), ciclofosfamida, busulfán, dibromomanitol, estreptozotocina, dacarbazina (DTIC), procarbazona, mitomicina C, cisplatino y otros derivados de platino, tales como carboplatino), antibióticos (tales como dactinomicina (antes actinomicina), bleomicina, daunorrubicina (antes daunomicina), doxorubicina, idarrubicina, mitramicina, caliqueamina, mitomicina, mitoxantrona, plicamicina, antramicina (AMC)), toxina de la difteria y moléculas relacionadas (tales como cadena A de la difteria y fragmentos activos de la misma y moléculas híbridas), toxina de ricina (tales como ricina A o una toxina de cadena de ricina A desglucosilada), toxina del cólera, una toxina de tipo Shiga (SLT-I, SLT-II, SLT-III), toxina LT, toxina C3, toxina Shiga, toxina pertussis, toxina tetánica, inhibidor de proteasa de Bowman-Birk de la soja, exotoxina de Pseudomonas, alorina, saporina, modeccina, gelanina, cadena A de abrina, cadena A de modeccina, alfa-sarcina, proteínas de Aleurites fordii, proteínas dianthina, proteínas de Phytolacca americana (PAPI, PAPII, y PAP-S), inhibidor de Momordica charantia, curcina, crotona, inhibidor de saponaria officinalis, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina y toxinas de enomicina. Los agentes terapéuticos, que se pueden administrar combinados con un anticuerpo como se describe en otra parte en la presente memoria, también pueden ser candidatos para radicales terapéuticos útiles para la conjugación con un anticuerpo utilizado en la presente invención. Por ejemplo, el radical de fármaco puede ser una proteína o polipéptido que poseen una actividad biológica deseada. Tales proteínas pueden incluir, por ejemplo, una toxina enzimáticamente activa, o un fragmento de la misma, tal como abrina, ricina A, exotosina de Pseudomonas, o toxina de la difteria; una proteína tal como factor de necrosis tumoral o interferón γ ; o, modificadores de la respuesta biológica tales como, por ejemplo, linfoquinas, interleuquina 1 (IL-1), interleuquina 2 (IL-2), interleuquina 6 (IL-6), factor estimulador de las colonias de granulocitos macrófagos (GM-CSF), factor estimulador de las colonias de granulocitos (G-CSF), u otros factores de crecimiento y proteínas inductoras de la apoptosis aislados de mitocondrias.

Los productos conjugados de anticuerpos y tales radicales citotóxicos se pueden preparar utilizando una variedad de agentes de acoplamiento de proteínas bifuncionales. Los ejemplos de tales reactivos incluyen SPDP, IT, derivados bifuncionales de imidoésteres tales como HCl de adipimidato de dimetilo, ésteres activos tales como suberato de disuccinimidilo, aldehídos tales como glutaraldehído, compuestos de bis-azido tales como bis (p-azidobenzoil)hexanodiamina, derivados de bis-diazonio tales como bis-(p-diazoniobenzoil)-etilendiamina, diisocianatos tales como 2,6-diisocianato de tolueno y compuestos de flúor bis-activos tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzoceno y agentes anti-mitóticos (p. ej., vincristina, vinblastina, docetaxel, paclitaxel y vinorelbina).

En una realización, el anticuerpo anti-CD38 se conjuga con un inmunomodulador, tal como una citoquina inmunomoduladora, factor de crecimiento de células madre, linfotóxina (tal como un TNF tal como TNF α), o un factor hematopoyético. Los ejemplos de tales moléculas que pueden ser útiles como productos conjugados incluyen IL-1, IL-2, IL-3, IL-6, IL-10, IL-12, IL-18 e IL-21, factores estimuladores de colonias (tales como factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF) y factor estimulador de colonias de granulocitos macrófagos (GM-CSF), interferones (tales como IFN α , IFN β e IFN γ), factor de crecimiento de células madre denominado "factor S1", eritropoyetina y trombopoyetina, fragmentos activos de los mismos, derivados de los mismos, variantes de los mismos, o una combinación de cualquiera de los mismos.

Las técnicas para conjugar tales radicales terapéuticos con anticuerpos, son bien conocidas, véase por ejemplo Arnon et al., "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", en in Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy, Reisfeld et al., (eds.), pág. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985), Hellstrom et al., "Antibodies For Drug Delivery", en Controlled Drug Delivery (2^a Ed.), Robinson et al., (eds.), pág. 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.), pág. 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.), pág. 303-16 (Academic Press 1985) and Thorpe et al., "The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates", Immunol. Rev. 62, 119-58 (1982).

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

Formulación y modo de administración

Los agentes utilizados en la presente invención se pueden formular como una composición farmacéutica con portadores o diluyentes farmacéuticamente aceptables, así como cualquier otro adyuvante y excipiente conocido de acuerdo con técnicas convencionales tales como las descritos en Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19^a edición, Gennaro, Ed., Mack Publishing Co., Easton, PA, 1995.

Los portadores o diluyentes farmacéuticamente aceptables, así como cualquier otro coadyuvante y excipiente conocidos, deben ser adecuados para el compuesto elegido utilizado en la presente invención y el modo de administración elegido. La idoneidad para los portadores y otros componentes de las composiciones farmacéuticas se determina en función de la falta de un impacto negativo significativo sobre las propiedades biológicas deseadas del compuesto o composición farmacéutica elegidos (p. ej., menos de un impacto sustancial (10% o menos de inhibición relativa, 5% o menos de inhibición menos relativa, etc.) sobre la unión del antígeno.

Una composición farmacéutica utilizada en la presente invención también puede incluir diluyentes, cargas, sales, tampones, detergentes (p. ej., un detergente no iónico, tal como Tween-80), estabilizadores, estabilizadores (p. ej., azúcares o aminoácidos libres de proteínas), conservantes, fijadores de tejidos, solubilizantes y/u otros materiales adecuados para su inclusión en una composición farmacéutica.

Los niveles de dosificación reales de los ingredientes activos en las composiciones farmacéuticas se pueden variar para obtener una cantidad del ingrediente activo que sea eficaz para lograr la respuesta terapéutica deseada para un paciente, composición y modo de administración particulares, sin que sean tóxicos para el paciente. El nivel de dosificación seleccionado dependerá de una variedad de factores farmacocinéticos que incluyen la actividad de las composiciones particulares empleadas, o el éster, sal o amida de los mismos, la vía de administración, el tiempo de administración, la velocidad de excreción del compuesto particular que se está empleando, la duración del tratamiento, otros fármacos, compuestos y/o materiales utilizados combinados con las composiciones particulares empleadas, la edad, el sexo, el peso, el estado, la salud general y el historial médico anterior del paciente que se está tratando, y factores similares bien conocidos en las artes médicas.

La composición farmacéutica se puede administrar por cualquier vía y modo adecuados. Las vías adecuadas de administración de un compuesto de la presente invención *in vivo* e *in vitro* son bien conocidas en la técnica y pueden ser seleccionadas por los expertos en la técnica.

Los compuestos utilizados en la presente invención se pueden administrar por cualquier vía adecuada, tal como oral, nasal, inhalable, tópica (incluyendo bucal, transdérmica y sublingual), rectal, vaginal y/o parenteral.

En una realización, uno o más de los compuestos utilizados en la presente invención se administran por vía oral, por

ejemplo, con un diluyente inerte o un portador comestible asimilable. El ingrediente activo se puede incluir en una cápsula de gelatina de cubierta dura o blanda, comprimir en comprimidos o incorporar directamente a la dieta del sujeto. Las composiciones farmacéuticas que son adecuadas para la administración oral incluyen comprimidos ingeribles, comprimidos bucales, trociscos, cápsulas, elixires, suspensiones, jarabes, obleas y similares que contienen portadores que se conocen en la técnica como apropiados. Para permitir la administración oral, puede ser necesario recubrir el compuesto con, o coadministrar el compuesto con, un material para evitar su inactivación.

En una realización, uno o más de los compuestos utilizados en la presente invención se administran por vía parenteral.

Las expresiones "administración parenteral" y "administrado parenteralmente" como se emplean en la presente memoria representan modos de administración distintos a la administración entérica y tópica, generalmente por 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 intrastemal.

En una realización, el compuesto se administra mediante inyección o infusión intravenosa o subcutánea.

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

Las composiciones farmacéuticas utilizadas en la presente invención se pueden formular para vías de administración particulares, tales como administración oral, nasal, tópica (incluyendo bucal, transdérmica y sublingual), rectal, vaginal y/o parenteral. Las composiciones farmacéuticas se pueden presentar convenientemente en forma de dosificación unitaria y se pueden preparar mediante cualquier método conocido en la técnica farmacéutica. La cantidad de ingrediente activo que se puede combinar con un material portador para producir una forma de dosificación única variará dependiendo del sujeto que se esté tratando y del modo particular de administración. La cantidad de ingrediente activo que se puede combinar con un material portador para producir una forma de dosificación única será generalmente aquella cantidad de composición que produce un efecto terapéutico. Generalmente, del cien por cien, esta cantidad oscilará entre aproximadamente 0,01% y aproximadamente 99% del ingrediente activo, tal como de aproximadamente 0,1% a aproximadamente 70%, por ejemplo, de aproximadamente 1% a aproximadamente 30%.

Independientemente de la vía de administración seleccionada, los compuestos utilizados en la presente invención, que se pueden utilizar en forma de una sal farmacéuticamente aceptable o en una forma hidratada adecuada, y/o las composiciones farmacéuticas se formulan en formas de dosificación farmacéuticamente aceptables por medio de métodos convencionales conocidos por los expertos en la técnica. Una "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a una sal que conserva la actividad biológica deseada del compuesto parental y no confiere ningún efecto toxicológico no deseado (véase, por ejemplo, Berge, S.M. et al., J. Pharm. Sci. 66, 1-19 (1977)). Los ejemplos de tales 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 los ácidos clorhídrico, nítrico, fosfórico, sulfúrico, bromhídrico, yodhídrico, fosforoso y similares, así como de ácidos orgánicos no tóxicos tales como ácidos mono- y di-carboxílicos alifáticos, ácidos alcanóicos sustituidos con fenilo, ácidos hidroxilo 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'-dibenciletildiamina, N-metilglucamina, cloroprocaína, colina, dietanolamina, etilendiamina, procaína y similares.

Los portadores farmacéuticamente aceptables incluyen todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes de isotonicidad, antioxidantes y agentes retardantes de la absorción adecuados, y similares que sean fisiológicamente compatibles con un compuesto utilizado en la presente invención.

Los ejemplos de portadores acuosos y no acuosos adecuados que se pueden emplear en las composiciones farmacéuticas incluyen agua, solución salina, 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 carboximetilcelulosa, goma de tragacanto y ésteres orgánicos inyectables, tales como oleato de etilo, y/o varios tampones. Otros portadores son bien conocidos en la técnica farmacéutica.

Los portadores farmacéuticamente aceptables incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. El uso de tales medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas es conocido en la técnica. Excepto en la medida en

que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con el compuesto activo, se contempla su uso en las composiciones farmacéuticas.

5 La fluidez adecuada se puede mantener, por ejemplo, mediante el uso de materiales de recubrimiento, tales como la lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de las dispersiones, y mediante el uso de tensioactivos.

10 Las composiciones farmacéuticas comprenden agentes utilizados en la presente invención y también pueden comprender antioxidantes farmacéuticamente aceptables, por ejemplo (1) antioxidantes solubles en agua, tales como ácido ascórbico, hidrocloreuro de cisteína, bisulfato de sodio, metabisulfito de sodio, sulfito de sodio y similares; (2) antioxidantes solubles en aceite, tales como palmitato de ascorbilo, hidroxianisol butilado (BHA), hidroxitolueno butilado (BHT), lecitina, galato de propilo, alfa-tocoferol y similares; y (3) agentes quelantes de metales, tales como ácido cítrico, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), sorbitol, ácido tartárico, ácido fosfórico y similares.

15 Las composiciones farmacéuticas también pueden comprender agentes de isotonicidad, tales como azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol, glicerol o cloruro de sodio en las composiciones.

Los diluyentes farmacéuticamente aceptables incluyen soluciones salinas y soluciones tampón acuosas.

20 Las composiciones farmacéuticas utilizadas en la presente invención también pueden contener uno o más coadyuvantes apropiados para la vía de administración elegida, tales como conservantes, agentes humectantes, agentes emulsionantes, agentes dispersantes, conservantes o tampones, que pueden mejorar la vida útil o la eficacia de la composición farmacéutica. Los compuestos de la presente invención se pueden mezclar, por ejemplo, con lactosa, sacarosa, polvos (p. ej., polvo de almidón), ésteres de celulosa de ácidos alcanóicos, ácido esteárico, talco, estearato de magnesio, óxido de magnesio, sales de sodio y calcio de ácidos fosfóricos y sulfúricos, goma arábica, gelatina, alginato de sodio, polivinilpirrolidina y/o poli(alcohol vinílico). Otros ejemplos de coadyuvantes son QS21, GM-CSF, SRL-172, dihidrocloreuro de histamina, timocartina, Tio-TEPA, composiciones de monofosforil-lípido A/micobacterias, alumbre, coadyuvante incompleto de Freund, Montanide ISA, sistema coadyuvante ribi, coadyuvante TiterMax, formulaciones coadyuvantes Syntex, complejos inmunoestimuladores (ISCOM), coadyuvante Gerbu, oligodesoxinucleótidos CpG, lipopolisacáridos y ácido poliinosínico:policitidílico.

35 La prevención de la presencia de microorganismos se puede garantizar 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 se puede lograr mediante la inclusión de agentes que retrasan la absorción, tales como el monoestearato de aluminio y la gelatina.

40 Las composiciones farmacéuticas que comprenden un compuesto para su uso en la presente invención también pueden incluir una sal adecuada por lo tanto. Se puede utilizar cualquier sal adecuada, tal como una sal de metal alcalinotérreo en cualquier forma adecuada (p. ej., una sal tampón), en la estabilización del compuesto utilizado en 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 utiliza una sal de aluminio para estabilizar un compuesto utilizado en la presente invención en una composición farmacéutica, cuya sal de aluminio también puede servir como coadyuvante cuando tal composición se administra a un paciente.

45 Los compuestos utilizados en la presente invención se pueden preparar con portadores que protegerán el compuesto contra la liberación rápida, tal como una formulación de liberación controlada, incluyendo implantes, parches transdérmicos y sistemas de suministro microencapsulados. Tales portadores pueden incluir gelatina, monoestearato de glicerilo, diestearato de glicerilo, polímeros biodegradables, biocompatibles, tales como etilenvinilacetato, polianhídridos, poli(ácido glicólico), colágeno, poliortoésteres y poli(ácido láctico) solo o con una cera u otros materiales bien conocidos en la técnica. Los métodos para la preparación de tales formulaciones son generalmente conocidos por los expertos en la técnica. Véase, p. ej., Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1978.

55 Para administrar las composiciones por ciertas vías de administración, puede ser necesario recubrir el compuesto con, o coadministrar el compuesto con, un material para evitar su inactivación. Por ejemplo, el compuesto utilizado en el método de la invención se puede administrar a un sujeto en un portador apropiado, por ejemplo, liposomas, o un diluyente. Los liposomas incluyen emulsiones CGF de agua en aceite en agua, así como liposomas convencionales (Strejan et al., J. Neuroimmunol. 7, 27 (1984)).

60 Dependiendo de la vía de administración, el compuesto activo se puede recubrir con un material para proteger el compuesto de la acción de los ácidos y otras condiciones naturales que pueden inactivar el compuesto. Por ejemplo, el compuesto se puede administrar a un sujeto en un portador apropiado, por ejemplo, liposomas. Los liposomas incluyen emulsiones CGF de agua en aceite en agua, así como liposomas convencionales (Strejan et al., J. Neuroimmunol. 7, 27 (1984)).

En una realización de la presente invención, los compuestos para su uso en la presente invención se pueden formular en liposomas. En una realización adicional, los liposomas incluyen un radical de direccionamiento. En una realización adicional, los compuestos en los liposomas se administran mediante inyección en embolada a un sitio próximo al área deseada, p. ej., el sitio de inflamación o infección, o el sitio de un tumor. La composición debe ser fluida en la medida en que exista una fácil jeringabilidad. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y debe conservarse frente a la acción contaminante de microorganismos tales como bacterias y hongos.

En una realización, los compuestos utilizados en la presente invención se pueden formular para prevenir o reducir su transporte a través de la placenta. Esto se puede realizar por métodos conocidos en la técnica, p. ej., mediante PEGilación de los compuestos o mediante el uso de fragmentos $F(ab')_2$. Se pueden hacer referencias adicionales 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 portadores 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 tales medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas es conocido en la técnica. Excepto en la medida en que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con el compuesto activo, se contempla su uso en las composiciones farmacéuticas. También se pueden incorporar a las composiciones compuestos activos complementarios.

Las composiciones farmacéuticas para inyectables típicamente deben ser estériles y estables en las condiciones de fabricación y almacenamiento. La composición se puede formular como una solución, microemulsión, liposoma u otra estructura ordenada adecuada para una alta concentración de fármaco. El portador puede ser un medio de dispersión o disolvente 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 el oleato de etilo. La fluidez adecuada se puede mantener, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento tal como la lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido 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 de sodio en la composición. La absorción prolongada de las composiciones inyectables se puede lograr incluyendo en la composición un agente que retrase la absorción, por ejemplo, sales monoestearato y gelatina. Las soluciones inyectables estériles se pueden preparar incorporando el compuesto activo en la cantidad requerida en un disolvente apropiado con uno o una combinación de ingredientes, p. ej. como los enumerados anteriormente, según se requiera, seguido de microfiltración en condiciones estériles. 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 requeridos, p. ej. de los enumerados anteriormente. En el caso de los polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los ejemplos de métodos de preparación son el secado al vacío y el secado por congelación (liofilización) que producen un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente deseado adicional de una solución previamente esterilizada y filtrada del mismo. .

Las soluciones inyectables estériles se pueden preparar incorporando el compuesto activo en la cantidad requerida en un disolvente apropiado con uno o una combinación de los ingredientes enumerados anteriormente, según sea necesario, seguido de una microfiltración en condiciones estériles. 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 requeridos de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los ejemplos de métodos de preparación son el secado al vacío y el secado por congelación (liofilización) que producen un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente deseado adicional de una solución previamente esterilizada y filtrada del mismo. .

En una realización de la invención, dicho al menos un agente quimioterapéutico no corticosteroideo comprende melfalán, en el que el melfalán se administra por vía intravenosa o por vía oral.

En otra realización de la invención, dicho al menos un agente quimioterapéutico no corticosteroideo comprende un derivado de ácido glutámico, tal como talidomida (Thalomid®) o un análogo de talidomida, p. ej., CC-5013 (lenalidomida, Revlimid™) o CC4047 (Actimid™), en donde dicho derivado de ácido glutámico se administra por vía oral.

En otra realización de la invención, dicho al menos un agente quimioterapéutico no corticosteroideo comprende un inhibidor de proteasoma, tal como bortezomib (Velcade®), en donde el bortezomib se administra por vía intravenosa.

En otra realización de la invención, dicho al menos un agente quimioterapéutico no corticosteroideo comprende un alcaloide de vinca, tal como vincristina, en donde la vincristina se administra por vía intravenosa.

En otra realización de la invención, dicho al menos un agente quimioterapéutico no corticosteroideo comprende una antraciclina, tal como doxorubicina, en donde la doxorubicina se administra por vía intravenosa.

5 En otra realización de la invención, dicho al menos un corticosteroide comprende prednisona, en donde dicha prednisona se administra por vía oral.

En otra realización de la invención, dicho al menos un corticosteroide comprende prednisona, en donde dicha prednisona se administra por vía oral.

10 **Pacientes y enfermedades a tratar**

Los individuos que se pueden tratar con la terapia combinada de la invención pueden incluir, por ejemplo, pacientes humanos con trastornos que se pueden corregir o mejorar mediante la inhibición de la función de CD38, tal como la actividad enzimática, la transducción de señales, la inducción de la expresión de citoquinas, la inducción de la proliferación o la diferenciación, y/o la inducción de la lisis y/o la eliminación/reducción del número de células que expresan CD38.

15 Por ejemplo, los anticuerpos anti-CD38 se pueden usar para provocar *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 la expresión de citoquinas, la inducción de la proliferación o diferenciación y/o la inducción de la lisis), destrucción de a una célula que expresa CD38, mediando la fagocitosis o la 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 destruyendo las células que expresan CD38 mediante apoptosis.

20 En una realización, los productos inmunoconjugados descritos en la presente memoria se pueden utilizar para dirigir compuestos (p. ej., agentes terapéuticos, marcas, citotoxinas, inmunosupresores, etc.) a células que tienen CD38 unido a su superficie utilizando tales compuestos diana como radicales terapéuticos en los productos inmunoconjugados.

30 Las células que tienen CD38 unido a su superficie se pueden destruir administrando tales productos inmunoconjugados.

Los anticuerpos anti-CD38 se utilizan para inhibir las actividades inducidas por CD38 asociadas con ciertos trastornos o para eliminar o reducir el número de células que expresan CD38.

35 Un trastorno que implica células que expresan CD38 puede ser un trastorno tumorigénico, tal como un trastorno caracterizado por la presencia de células tumorales que expresan CD38 incluyendo, por ejemplo, linfoma de células B, neoplasias malignas de células plasmáticas, linfoma de células T/NK y neoplasias malignas mieloides.

40 Los ejemplos de tales enfermedades tumorigénicas incluyen linfoma/leucemias de células B que incluyen leucemia linfoblástica/linfoma de células B precursoras y linfomas no Hodgkin de células B; leucemia promielocítica aguda/leucemia linfoblástica aguda y neoplasias malignas de células B maduras, tales como leucemia linfocítica crónica (CLL)/linfoma linfocítico de células pequeñas (SLL) de células B, 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 (tipo MALT, tipo nodal y esplénico), leucemia de células pilosas, linfoma difuso de células B grandes, linfoma de Burkitt, plasmacitoma, mieloma de células del plasma, leucemia de células del plasma, trastorno linfoproliferativo post-transplante, macroglobulinemia de Waldenström, leucemias de células del plasma y linfoma anaplásico de células grandes (ALCL).

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

Los ejemplos de linfomas no Hodgkin de células B son la granulomatosis linfomatoide, el linfoma de efusión primaria, el linfoma intravascular de células B grandes, el linfoma mediastínico de células B grandes, las enfermedades de cadena pesada (incluidas las enfermedades γ , μ y α), los linfomas inducidos por terapia con agentes inmunosupresores, tales como el linfoma inducido por ciclosporina y el linfoma inducido por metotrexato.

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

Los ejemplos de un trastorno que implica células que expresan CD38 pueden ser una neoplasia maligna derivada de células T y NK que incluyen: neoplasias de células T y células NK maduras que incluyen leucemia prolinfocítica de células T, leucemia linfocítica granular de células T grandes, leucemia de células NK agresiva, leucemia/linfoma de células T adultas, linfoma de células NK/T extranodal, tipo nasal, linfoma de células T asociado a enteropatía,

linfoma de células T hepatoesplénicas, linfoma de células T tipo paniculitis subcutánea, linfoma blástico de células NK, micosis fungoide/síndrome de Sézary, trastornos linfoproliferativos de células T positivos para CD30 cutáneos primarios (linfoma anaplásico de células cutáneo primario de células grandes C-ALCL, papulosis linfomatoide, lesiones limitrofes), linfoma angioinmunoblástico de células T, linfoma periférico de células T no especificado y linfoma anaplásico de células grandes.

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

Dosificaciones y regímenes de tratamiento

El tratamiento de acuerdo con la presente invención incluye una "cantidad terapéuticamente eficaz" de los medicamentos utilizados. Una "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad eficaz, a dosificaciones y durante los períodos de tiempo necesarios, para lograr un resultado terapéutico deseado. Una cantidad terapéuticamente eficaz puede variar de acuerdo con factores tales como el estado de la enfermedad, la edad, el sexo y el peso del individuo, y la capacidad de los medicamentos para provocar una respuesta deseada en el individuo. Una cantidad terapéuticamente eficaz es también una en la que cualquier efecto tóxico o perjudicial del anticuerpo o porción del anticuerpo se ve compensado por los efectos terapéuticamente beneficiosos. En el contexto de la presente terapia combinada, una cantidad terapéutica incluye cantidades que son terapéuticamente eficaces solamente combinadas con los otros compuestos, p. ej., cantidades que serían demasiado bajas para ser eficaces en monoterapia.

Una "cantidad terapéuticamente eficaz" para la terapia de tumores también se puede medir por su capacidad para estabilizar la progresión de la enfermedad. La capacidad de un compuesto para inhibir el cáncer se puede evaluar en un sistema modelo animal predictivo de la eficacia en tumores humanos. Alternativamente, esta propiedad de una composición se puede evaluar examinando la capacidad del compuesto para inhibir el crecimiento celular o para inducir la apoptosis mediante ensayos *in vitro* conocidos por el experto en la materia. Una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto terapéutico puede disminuir el tamaño del tumor o mejorar los síntomas en un sujeto. Un experto en la técnica sería capaz de determinar tales cantidades basándose en factores tales como el tamaño del sujeto, la gravedad de los síntomas del sujeto y la composición o vía de administración particular seleccionados.

Los regímenes de dosificación se ajustan para proporcionar la respuesta óptima deseada (p. ej., una respuesta terapéutica). Por ejemplo, se puede administrar una sola embolada, se pueden administrar varias dosis divididas a lo largo del tiempo o la dosis se puede reducir o aumentar proporcionalmente según lo indiquen las exigencias de la situación terapéutica. Las composiciones parenterales se pueden formular en forma de unidad de dosificación para facilitar la administración y la uniformidad de la dosificación. La forma de unidad de dosificación como se emplea en la presente memoria se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones 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 asociado con el portador farmacéutico requerido. La memoria descriptiva para las formas unitarias de dosificación de la presente invención está dictada por (a) las características únicas del compuesto activo y el efecto terapéutico particular que se debe lograr, y (b) las limitaciones inherentes en la técnica de la composición de semejante compuesto activo para el tratamiento de la sensibilidad en individuos.

Las dosificaciones y los regímenes de dosificación eficaces para los anticuerpos anti-CD38 utilizados en la presente invención dependen de la enfermedad o afección a tratar y pueden ser determinados por los expertos en la técnica. Un intervalo no limitante ilustrativo para una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo anti-CD38 utilizado en la presente invención es de aproximadamente 0,1 a 100 mg/kg, tal como de aproximadamente 0,1 a 50 mg/kg, por ejemplo de aproximadamente 0,1 a 20 mg/kg, tal como de aproximadamente 0,1 a 10 mg/kg, por ejemplo aproximadamente 0,5, aproximadamente tal como 0,3, aproximadamente 1, o aproximadamente 3 mg/kg. En otra realización, el anticuerpo se administra en una dosis de 1 mg/kg o más, tal como una dosis de 1 a 20 mg/kg, p. ej. una dosis de 5 a 20 mg/kg, p. ej. una dosis de 8 mg/kg.

Un médico o veterinario que tenga experiencia normal en la técnica puede determinar y prescribir fácilmente la cantidad eficaz de la composición farmacéutica requerida. Por ejemplo, el médico o veterinario podría comenzar las dosis del medicamento empleado en la composición farmacéutica a niveles más bajos que los requeridos para lograr el efecto terapéutico deseado y aumentar gradualmente la dosis hasta lograr el efecto deseado. En general, una dosis diaria adecuada de una composición será la cantidad del compuesto que sea la dosis más baja eficaz para producir un efecto terapéutico. Tal dosis eficaz dependerá generalmente de los factores descritos anteriormente. La administración puede ser intravenosa, intramuscular, intraperitoneal o subcutánea, y por ejemplo se puede administrar cerca del sitio de la diana. Si se desea, la dosis diaria eficaz de una composición farmacéutica se puede administrar en dos, tres, cuatro, cinco, seis o más subdosis administradas por separado a intervalos apropiados a lo largo del día, opcionalmente, en formas de dosificación unitaria. Si bien es posible que un compuesto se administre solo, es preferible administrar el compuesto como una composición farmacéutica como se ha descrito anteriormente.

En una realización, el anticuerpo anti-CD38 se administra por infusión a una dosificación semanal de 10 a 500 mg/m², tal como de 200 a 400 mg/m². Tal administración se puede repetir, p. ej., de 1 a 8 veces, tal como de 3 a 5 veces. La administración se puede realizar por infusión continua durante un período de 2 a 24 horas, tal como de 2 a 12 horas.

5 En una realización, el anticuerpo anti-CD38 se administra por infusión continua lenta durante un período prolongado, tal como más de 24 horas, para reducir los efectos secundarios tóxicos.

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

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

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

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

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

35 En una realización de la invención, dicho al menos un agente quimioterapéutico no corticosteroideo comprende melfalán, y dicho al menos un corticosteroideo comprende prednisona. Típicamente, el melfalán se dosifica por vía intravenosa (IV), pero se puede utilizar por vía oral (PO), p. ej. en el intervalo de 0,2 a 0,25 mg/kg por día o p. ej. 7-9 mg/m²). La prednisona se puede administrar p. ej. a 2 mg/kg durante 4 días cada 4-6 semanas (Alexanian et al., J Am Med Assoc 1969; 208:1680). En otras realizaciones, el melfalán se puede utilizar en régimen de dosis altas en dosis únicas de hasta 140 mg/m² (IV) o dosis intermedias en el intervalo de 25 a 75 mg/m² (IV), un ejemplo es 40 mg/d administrados los días 1-4, 9-12 y 17-20 cada ciclo de 5 semanas (Tsakanikas et al., Oncology 1991; 48:369, Richardson PG Am J Oncol 2005; 4:737).

45 En otra realización de la invención, dicho al menos un agente quimioterapéutico no corticosteroideo comprende talidomida (Thalomid®), y dicho al menos un corticosteroideo comprende dexametasona. La talidomida se puede utilizar p. ej. a una dosis de 200 mg/d (PO), o p. ej. en un intervalo de 50 a 400 mg/d junto con, p. ej. una dosis de dexametasona de 40 mg/d administrada diariamente o administrada secuencialmente, p. ej. el día 1-4, 9-12 y 17-20 de cada ciclo de 28 días. (Rajkumar SV J Clin Oncol 2006; 24:431).

50 En otra realización de la invención, dicho al menos un agente quimioterapéutico no corticosteroideo comprende lenalidomida, y dicho al menos un corticosteroideo comprende dexametasona. La lenalidomida se puede administrar p. ej. a dosis de 25 mg/d administrados diariamente (PO) y dexametasona, p. ej. en un intervalo de 40 mg/d administrados (PO), p. ej. los días 1-4, 9-12 y 17-20 del ciclo de 28 días, opcionalmente más tarde solo los días 1-4 de cada ciclo (Rajkumar SV, ASH 2004).

55 En otra realización de la invención, dicho al menos un agente quimioterapéutico no corticosteroideo comprende bortezomib (Velcade®). El bortezomib se puede utilizar p. ej. combinado con dexametasona. Esta combinación se puede utilizar tanto en un entorno de inducción como de mantenimiento. Un ejemplo es bortezomib 1,3 mg/m² los días 1, 4, 8 y 11 cada ciclo de 21 días (fase de inducción, normalmente hasta 8 ciclos) seguido de los días 1, 8, 11, 15 y 22 cada ciclo de 5 semanas para mantenimiento (Richardson PG N Engl J Med 2005; 352:2487).

60 En otra realización de la invención, dicho al menos un agente quimioterapéutico no corticosteroideo comprende vincristina y doxorubicina, y dicho al menos un corticosteroideo comprende dexametasona. La vincristina se puede

5 administrar p. ej. mediante infusión IV continua, 0,4 mg por día (días 1-4 en cada ciclo de 4 semanas) y doxorubicina, p. ej. a una dosis de 9 mg/m²/d en infusiones IV continuas los días 1-4 en cada ciclo de 4 semanas. La dexametasona se puede administrar p. ej. a una dosis de 40 mg los días 1-4, 9-12 y 17-21 en cada ciclo de 4 semanas. Como alternativa, se puede utilizar doxorubicina liposomal pegilada (p. ej., a una dosis de 40 mg/m² el día 1 en un ciclo de una semana) (Rifkin Cancer 2006; 106:848).

Combinaciones adicionales

10 La terapia combinada de la invención se puede combinar adicionalmente con otros medicamentos, es decir, combinada con agentes terapéuticos adicionales relevantes para la enfermedad o afección a tratar. Tal administración puede ser simultánea, separada o secuencial. Para la administración simultánea, los agentes se pueden administrar como una composición o como composiciones separadas, según sea apropiado.

15 Por consiguiente, la presente invención proporciona una terapia combinada para el tratamiento de un trastorno que implica células que expresan CD38 como se describió anteriormente, cuyos métodos comprenden la triple terapia de la presente invención combinada con uno o más agentes terapéuticos adicionales como se describe a continuación.

20 En una realización, la terapia combinada de la invención incluye adicionalmente la administración de al menos un agente quimioterapéutico, al menos un agente antiinflamatorio, o al menos un agente inmunosupresor y/o inmunomodulador.

25 En una realización, tal agente quimioterapéutico se puede seleccionar entre un antimetabolito, tal como metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, fludarabina, 5-fluorouracilo, descarbazona, hidroxiurea, asparraginasa, gemcitabina, cladribina y agentes similares.

30 En una realización, tal agente quimioterapéutico se puede seleccionar entre un antibiótico, tal como dactinomicina (antes actinomicina), bleomicina, daunorrubicina (antes daunomicina), idarrubicina, mitramicina, mitomicina, mitoxantrona, plicamicina, antramycin (AMC) y agentes similares.

35 En una realización, tal agente quimioterapéutico se puede seleccionar entre un agente antimetabólico, tal como taxanos, por ejemplo, docetaxel y paclitaxel.

40 En una realización, tal agente quimioterapéutico se puede seleccionar entre un inhibidor de topoisomerasa, tal como topotecán.

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

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

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

60 En una realización, tal agente quimioterapéutico puede ser un inhibidor de la quinasa MAP P38a, tal como SCIO-469.

65 En una realización adicional, la terapia combinada de la invención incluye adicionalmente la administración de al menos un inhibidor de la angiogénesis, neovascularización y/u otra vascularización a un sujeto que lo necesite.

Los ejemplos de tales inhibidores de la angiogénesis son los inhibidores de la uroquinasa, los inhibidores de la metaloproteasa de la matriz (tal como marimastat, neovastat, BAY 12-9566, AG 3340, BMS-275291 y agentes similares), los inhibidores de la migración y proliferación de células endoteliales (tales como TNP-470, escalamina), 2-metoxiestradiol, combretastatina, 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 angiopoietina-1), Sugen 5416, SU5402, ribozima antiangiogénica (tal como angiozima), interferón α (tal como el interferón α 2a), suramina y agentes similares), inhibidores de la quinasa VEGF-

R y otros inhibidores de la tirosina quinasa anti-angiogénicos (tales como SU011248), inhibidores de la señalización de supervivencia de las integrinas específica endoteliales (tal como vitaxina y agentes similares), antagonistas/quelantes de cobre (tales como tetratiomolibdato, captopril y agentes similares), carboxiamido triazol (CAI), ABT-627, CM101, interleuquina-12 (IL-12), IM862, PNU145156E así como moléculas de nucleótido que inhiben la angiogénesis (tales como ADNc de VEGF antisentido, ADNc que codifica angiostatina, ADNc que codifica p53 y ADNc que codifica la deficiencia de receptor 2 de VEGF) y agentes similares.

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

En una realización adicional, la terapia combinada de la invención incluye adicionalmente la administración de un inmunógeno anticanceroso, tal como un antígeno canceroso/antígeno asociado a tumor (p. ej., una molécula de adhesión de células epiteliales (EpCAM/TACSTD1), mucina 1 (MUC1), antígeno carcinoembrionario (CEA), glicoproteína asociada a tumor 72 (TAG-72), gp100, Melan-A, MART-1, KDR, RCAS1, MDA7, vacunas virales asociadas al cáncer (p. ej., vacunas contra el virus del papiloma humano), proteínas de choque térmico derivadas de tumores, y agentes similares. También se puede utilizar o se puede utilizar alternativamente en tal realización una serie de otros antígenos cancerosos/antígenos asociados a tumores descritos en otras partes de la presente memoria y moléculas similares conocidas en la técnica. Los péptidos inmunogénicos anticancerosos también incluyen "vacunas" anti-idiotípicas tales como los anticuerpos antiidiotípicos BEC2, Mitumomab, CeaVac y los anticuerpos antiidiotípicos relacionados, el anticuerpo antiidiotípico contra el anticuerpo MG7 y otros anticuerpos antiidiotípicos contra el cáncer (véanse, 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)). Tales anticuerpos anti-idiotípicos se pueden conjugar opcionalmente con un portador, que puede ser un portador de molécula 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, véase por ejemplo Wi et al., *J Immunol Methods*. 122(2), 227-34 (1989)).

En una realización adicional, la terapia combinada de la invención incluye adicionalmente la administración de un bifosfonato. Los ejemplos de bifosfonatos potencialmente adecuados son pamidronato (Aredia®), ácido zoledrónico (Zometa®), clodronato (Bonefos®), risendronato (Actonel®), ibandronato (Boniva®), etidronato (Didronel®), alendronato (Fosamax®), tiludronato (Skelid®), incadronato (Yamanouchi Pharmaceutical) y minodronato (YM529, Yamanouchi).

En una realización adicional, la terapia combinada de la invención incluye adicionalmente la administración de un factor estimulador de colonias. Los ejemplos de factores estimuladores de colonias adecuados son los factores estimuladores de colonias de granulocitos (G-CSF), tales como filgrastim (Neupogen®) y pegfilgrastim (Neulasta®), y los factores estimuladores de colonias de granulocitos macrófagos (GM-CSF) tal como sargramostim (Leukine®).

En una realización adicional, la terapia combinada de la invención incluye adicionalmente la administración de un agente eritropoyético. Los ejemplos de agentes eritropoyéticos adecuados son la eritropoyetina (EPO), tal como la epoetina alfa (por ejemplo, Procrit®, Epogen® y Eprex®) y la epoetina beta (por ejemplo, NeoRecormon®) y las proteínas estimuladoras de la eritropoyesis (por ejemplo, Aranesp®).

En una realización adicional, la terapia combinada de la invención incluye adicionalmente la administración de una citoquina anti-cancerosa, quimioquina o combinación de las mismas. Los ejemplos de citoquinas y factores de crecimiento adecuados incluyen IFN γ , 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 α (p. ej., IFN α 2b), IFN β , GM-CSF, CD40L, ligando de Flt3, factor de células madre, ancestim y TNF α . Las quimioquinas adecuadas pueden incluir quimioquinas negativas para Glu-Leu-Arg (ELR), tales como IP-10, MCP-3, MIG y SDF-1 α de las familias de quimioquinas CXC y C-C humanas. Las citoquinas adecuadas incluyen derivados de citoquinas, variantes de citoquinas, fragmentos de citoquinas y proteínas de fusión de citoquinas.

En una realización adicional, la terapia combinada de la invención incluye adicionalmente la administración de un agente que modula, p. ej., aumenta o inhibe, la expresión o actividad de los receptores de Fc α o Fc γ . Los ejemplos de agentes adecuados para este uso incluyen interleuquina-1 (IL-1), interleuquina-2 (IL-2), interleuquina-6 (IL-6), factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF), tales como filgrastim (Neupogen®) y pegfilgrastim (Neulasta®), y factores estimuladores de colonias de granulocitos macrófagos (GM-CSF) tal como sargramostim

(Leukine®), interferón-γ (IFN-γ) y factor de necrosis tumoral (TNF).

- 5 En una realización adicional, la terapia combinada de la invención incluye adicionalmente la administración de un regulador de control del ciclo celular/apoptosis (o "agente regulador"). Un regulador de control del ciclo celular/apoptosis puede incluir moléculas (i) que dirigen y modulan los reguladores de control del ciclo celular/apoptosis tales como cdc-25 (tal como NSC 663284), (ii) quinasas dependientes de ciclina que estimulan en exceso 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, GRN16 y composiciones descritas en por ejemplo en los documentos US 6.440.735 y US 6.713.055). Los ejemplos no limitantes de moléculas que interfieren en las rutas apoptóticas incluyen el ligando inductor de la apoptosis relacionada con el TNF (TRAIL)/ligando de apoptosis-2 (Apo-2L), agentes que inducen el bloqueo de NF-κB que conduce a la inhibición de la producción de IL-6, anticuerpos que activan los receptores TRAIL, IFN, Bcl-2 antisentido y As₂O₃ (tríóxido arsénico, Trisenox®).
- 10
- 15 En una realización adicional, la terapia combinada de la invención incluye adicionalmente la administración de un agente regulador hormonal, tales como los agentes útiles para la terapia con anti-andrógenos y anti-estrógenos. Los ejemplos de tales agentes reguladores hormonales son tamoxifeno, idoxifeno, fulvestrant, droloxifeno, toremifeno, raloxifeno, dietilestilbestrol, etinilestradiol/etinilo, un anti-andrógeno (tal como flutaminida/Eulexin), una progestina (tal como caproato de hidroxiprogesterona, medroxiprogesterona/provera, acepato de megesterol/Megace), un adrenocorticosteroide (tal como hidrocortisona, prednisona), hormona liberadora de hormona luteinizante (y sus análogos y otros agonistas de la LHRH tales como buserelina y goserelina), un inhibidor de la aromatasa (tal como anastrozol/arimidex, aminoglutetimida/citraden, exemestano), un inhibidor hormonal (tal como octreotida/Sandostatin) y agentes similares.
- 20
- 25 En una realización adicional, la terapia combinada de la invención incluye adicionalmente la administración de un agente antianérgico (por ejemplo, compuestos de moléculas pequeñas, proteínas, glicoproteínas o anticuerpos que rompen la tolerancia a antígenos de tumores y cáncer). Ejemplos de tales compuestos son moléculas que bloquean la actividad de CTLA-4, como MDX-010 (Phan et al., PNAS USA 100, 8372 (2003)).
- 30 En una realización adicional, la terapia combinada de la invención incluye adicionalmente la administración de un ácido nucleico o vector que contiene un gen supresor de tumores, tal como un adenovirus de replicación deficiente que codifica p53/SCH58500 de tipo salvaje recombinante humano, etc.; ácidos nucleicos antisentido dirigidos a oncogenes, genes mutados o desregulados; o ARNiP dirigido a genes mutados o desregulados. Los ejemplos de dianas supresoras de tumores incluyen, por ejemplo, BRCA1, RB1, BRCA2, DPC4 (Smad4), MSH2, MLH1 y DCC.
- 35 En una realización adicional, la terapia combinada de la invención incluye adicionalmente la administración de un ácido nucleico anticanceroso, 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 PKCα, clusterina, IGF1BP, proteína quinasa A, ciclina D1 o Bcl-2h.
- 40 En una realización adicional, la terapia combinada de la invención incluye adicionalmente la administración de una molécula de ARN inhibidora de cáncer (véase, por ejemplo, Lin et al., Curr Cancer Drug Targets. 1(3), 241-7 (2001), Errata 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)).
- 45 En una realización adicional, la terapia combinada de la invención incluye adicionalmente la administración de un virus, proteínas virales y similares. Los virus de replicación deficiente, que generalmente son capaces de una o solo unas pocas rondas de replicación *in vivo*, y que están dirigidos a células tumorales, pueden ser, por ejemplo, componentes útiles de tales composiciones y métodos. Tales agentes virales pueden comprender o estar asociados con ácidos nucleicos que codifican inmunoestimuladores, tales como GM-CSF y/o IL-2. Tanto los virus naturalmente oncolíticos como los virus oncolíticos recombinantes (por ejemplo, virus HSV-1, reovirus, adenovirus sensibles a la replicación y de replicación deficiente, etc.) pueden ser componentes útiles de tales métodos y composiciones (véanse, 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
- 55 En una realización adicional, la terapia combinada de la invención puede implicar adicionalmente métodos de inmunoterapia "de células completas" y "adoptivos". Por ejemplo, tales métodos pueden comprender la infusión o la reinfusión de células del sistema inmunitario (por ejemplo, linfocitos infiltrantes de tumores (TIL), tales células T como CD4⁺ y/o CD8⁺ (por ejemplo, células T expandidas con antígenos específicos de tumores y/o mejoras genéticas), células B que expresan anticuerpos u otras células productoras/presentadoras de anticuerpos, células
- 60

dendríticas (p. ej., células dendríticas recombinantes que expresan anti-citoquinas, células dendríticas cultivadas con un agente de expansión de DC, tal como GM-CSF y/o Flt3-L, y/o células dendríticas cargadas con antígeno asociado a tumores), células NK antitumorales, llamadas células híbridas, o combinaciones de las mismas. Los productos lisados celulares también pueden ser útiles en tales métodos y composiciones. Las "vacunas" celulares en pruebas clínicas que pueden ser útiles en tales aspectos incluyen Canvaxin™, APC-8015 (Dendreon), HSPPC-96 (Antigenics) y productos lisados celulares Melacine®. Los antígenos que se desprenden de las células cancerosas y sus mezclas (véase, por ejemplo, Bystryn et al., Clinical Cancer Research vol. 7, 1882-1887, julio de 2001), opcionalmente mezclados con coadyuvantes tales como alumbre, también pueden ser componentes en tales métodos y composiciones combinadas.

En una realización adicional, la terapia combinada de la invención incluye adicionalmente la aplicación de un método de vacunación interna. La vacunación interna se refiere a la muerte de células cancerosas o tumorales inducida, tal como la muerte celular inducida por un fármaco o inducida por radiación de células tumorales, en un paciente, que generalmente conduce a la provocación de una respuesta inmunitaria dirigida a (i) las células tumorales en su totalidad o (ii) partes de las células tumorales que incluyen (a) proteínas, glicoproteínas u otros productos secretados, (b) proteínas o glicoproteínas asociadas a la membrana u otros componentes asociados con o insertados en las membranas, y/o (c) proteínas intracelulares u otros componentes intracelulares. Una respuesta inmunitaria interna inducida por la vacunación puede ser humoral (es decir, mediada por anticuerpos - complemento) o mediada por células (p. ej., el desarrollo y/o aumento de linfocitos T citotóxicos endógenos que reconocen las células tumorales internamente destruidas o partes de las mismas).

En una realización adicional, la terapia combinada de la invención incluye adicionalmente la administración de complemento. Por consiguiente, el uso de composiciones que comprenden anticuerpos anti-CD38 con suero o complemento también está dentro del alcance de la presente invención. En estas composiciones, el complemento se encuentra muy cerca del anticuerpo anti-CD38, por ejemplo, por conjugación o puede ser adecuado para la administración simultánea. Alternativamente, los anticuerpos anti-CD38 y el complemento o suero se pueden administrar por separado.

En una realización adicional, la terapia combinada de la invención incluye adicionalmente la administración de agentes inductores de la diferenciación, ácido retinoico y análogos de ácido retinoico (tales como todo ácido transretinoico, ácido 13-cis retinoico y agentes similares), análogos de vitamina D (tales como seocalcitol y agentes similares), inhibidores de ErbB3, ErbB4, IGF-IR, receptor de insulina, PDGFRa, PDGFRbeta, Flk2, Flt4, FGFR1, FGFR2, FGFR3, FGFR4, TRKA, TRKC, c-met, Ron, Tie, Tie2, Eph, Ret, Ros, Alk, LTK, PTK7 y agentes similares.

En una realización adicional, la terapia combinada de la invención incluye adicionalmente la administración de una catepsina B, moduladores de la actividad de la catepsina D deshidrogenasa, glutatión-S-transferasa (tal como glutacilcisteína sintetasa y lactato deshidrogenasa), o agentes similares.

En una realización adicional, la terapia combinada de la invención incluye adicionalmente la administración de estramustina o epirrubicina.

En una realización adicional, la terapia combinada de la invención incluye adicionalmente la administración de un inhibidor de HSP90 como 17-alil amino geldanamicina, anticuerpos dirigidos contra un antígeno tumoral tal como PSA, CA125, KSA, etc., integrinas tales como la integrina β1, inhibidores de VCAM o agentes similares

En una realización adicional, la terapia combinada de la invención incluye adicionalmente la administración de inhibidores de calcineurina (tales como valsopodar, PSC 833 y otros inhibidores de MDR-1 o p-glicoproteína), inhibidores de TOR (tales como sirolimus, everolimus y rapamicina) e inhibidores de los mecanismos de "recirculación de búsqueda del origen por los linfocitos (linfocite homing)" (tales como FTY720), y agentes con efectos sobre la señalización celular tales como inhibidores de moléculas de adhesión (por ejemplo, anti-LFA, etc.).

En una realización adicional, la terapia combinada de la invención incluye adicionalmente radioterapia.

La radioterapia puede comprender la radiación o la administración asociada de radiofármacos a un paciente. La fuente de radiación puede ser externa o interna al paciente que se está tratando (por ejemplo, el tratamiento de radiación puede ser en forma de radioterapia de haz externo (EBRT), braquiterapia (BT) o radioterapia dirigida esquelética). Los elementos radiactivos que se pueden utilizar en la práctica de tales métodos incluyen, p. ej., radio, cesio-137, iridio-192, americio-241, oro-198, cobalto-57, cobre-67, tecnecio-99, yoduro-123, yoduro 131, e indio-111.

En una realización adicional, la terapia combinada de la invención incluye adicionalmente un trasplante autólogo de células madre periféricas o de médula ósea.

En una realización adicional, la terapia combinada de la invención incluye adicionalmente la intervención ortopédica.

Las intervenciones ortopédicas se pueden usar en el tratamiento de un trastorno que implica células que expresan CD38, tal como el mieloma múltiple, para ayudar a controlar el dolor o a conservar la función o la movilidad. Tales intervenciones pueden incluir terapia física, férulas de huesos para prevenir o tratar fracturas, o procedimientos de cirugía (menor o mayor) para reparar fracturas.

5 En una realización adicional, la terapia combinada de la invención incluye adicionalmente la administración de uno o más agentes que promueven el acceso del anticuerpo contra CD38 o la composición combinada al interior de un tumor. Tales métodos se pueden realizar, por ejemplo, en asociación con el suministro de una relaxina, que es capaz de relajar un tumor (véase, por ejemplo, el documento US 6.719.977). En una realización, el anticuerpo anti-CD38 utilizado en la presente invención puede estar unido a un péptido que penetra en las células (CPP). Los péptidos que penetran en las células y los péptidos relacionados (tales como los anticuerpos que penetran en las células) han sido descritos, por ejemplo, por Zhao et al., en *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 y otros, *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 adicional, la terapia combinada de la invención incluye adicionalmente la administración de al menos un agente antiinflamatorio.

20 En una realización, tal agente antiinflamatorio se puede seleccionar entre un fármaco esteroideo y un AINE (fármaco antiinflamatorio no esteroideo).

En una realización, tal agente antiinflamatorio se puede seleccionar entre aspirina y otros salicilatos, inhibidores de Cox-2 (tales como rofecoxib y celecoxib), AINE (tales como ibuprofeno, fenoprofeno, naproxeno, sulindac, diclofenaco, piroxicam, ketoprofeno, diflunisal, nabumetona, etodolac, oxaprozina e indometacina), anticuerpos anti-IL6R, anticuerpos anti-IL8 (p. ej., 10F8 descrito en el documento WO2004/058797), anticuerpos anti-IL15, anticuerpos anti-IL15R, anticuerpos anti-CD4, anticuerpos anti-CD11a (p. ej., efalizumab), anticuerpos anti-alfa-4/beta-1 integrina (V_LA4) (p. ej., natalizumab), CTLA4-Ig para el tratamiento de enfermedades inflamatorias, prednisolona, prednisona, fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad (FAME) tales como metotrexato, hidroxicloroquina, sulfasalazina, inhibidores de la síntesis de pirimidina (tales como leflunomida), agentes bloqueadores del receptor de IL-1 (tales como anakinra), agentes bloqueadores del TNF- α (tales como etanercept, infliximab y adalimumab) y agentes similares.

35 En una realización adicional, la terapia combinada de la invención incluye adicionalmente la administración de al menos un agente inmunosupresor y/o inmunomodulador a un sujeto que lo necesite.

En una realización, tal agente inmunosupresor y/o inmunomodulador se puede seleccionar entre ciclosporina, azatioprina, ácido micofenólico, micofenolato de mofetilo, corticosteroides tales como prednisona, metotrexato, sales de oro, sulfasalazina, antimaláricos, brequinar, leflunomida, mizoribina, 15-desoxipergualina, 6-mercaptopurina, ciclofosfamida, rapamicina, tacrolimus (FK-506), OKT3, globulina antitímocítica, timopentina, timosina-a y agentes similares.

45 En una realización, tal agente inmunosupresor y/o inmunomodulador se puede seleccionar entre anticuerpos inmunosupresores, tales como anticuerpos que se unen a p75 del receptor de IL-2, o anticuerpos que se unen, por ejemplo, a MHC, CD2, CD3, CD4, CD7, CD28, B7, CD40, CD45, IFN γ , TNF- α , 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.

50 En una realización, tal agente inmunosupresor y/o inmunomodulador se puede seleccionar entre moléculas de IL-15R, IL-10, B7 solubles (B7-1, B7-2, variantes de las mismas y fragmentos de las mismas), ICOS y OX40, y inhibidor de un regulador de células T negativo (tal como un anticuerpo contra CTLA4) y agentes similares.

En una realización adicional, la terapia combinada de la invención incluye adicionalmente la administración de un anticuerpo anti-C3b (i).

55 En una realización adicional, la terapia combinada de la invención incluye adicionalmente la administración de inhibidores de histona desacetilasa (por ejemplo, fenilbutirato) y/o agentes de reparación de ADN (por ejemplo, enzimas de reparación de ADN y composiciones relacionadas, tales como dimericina).

60 En una realización adicional, la terapia combinada de la invención incluye adicionalmente una terapia fotodinámica dirigida contra el cáncer (por ejemplo, terapia con láser contra el cáncer - que opcionalmente se puede poner en práctica con el uso de agente fotosensibilizante, véase, por ejemplo, Zhang et al., *J Control Release*. 93 (2), 141-50 (2003)), terapias de ondas de sonido 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)).

Todos los métodos descritos en la presente memoria se pueden realizar en cualquier orden adecuado a menos que se indique lo contrario en la presente memoria o el contexto lo contradiga claramente.

5 La presente invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos, que no deben interpretarse como una limitación adicional.

Ejemplos

Ejemplo 1

10 Fabricación de células transfectadas con luciferasa (Daudi-luc)

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

20 Transfección con luciferasa

25 Se recogieron $8,2 \times 10^6$ células de Daudi CD38⁺ en 350 µl de RPMI (con un suplemento de dFCS al 10%, Gibco BRL) y se transfirieron a una cubeta de electroporación (Biorad, Hemel Hempstead, Herts, Reino Unido). A continuación, se añadieron 40 µg de gWIZ luciferasa de GTS (Aldevron, Fargo, ND, USA) y 10 µg de vector pPur (BD Biosciences, Alphen a/d Rijn, Países Bajos), que confiere resistencia a la puromicina. Después de dejar reposar las células en hielo durante 10 minutos, las células se sometieron a electroporación (250 V, 950 µF; Gene Pulser II, Biorad Laboratories GmbH, Munich, Alemania). Las células se dejaron reposar nuevamente en hielo y se recogieron en 40 ml de RPMI (con un suplemento de FCS al 10%). A continuación, las células se colocaron en placas de cultivo de tejidos 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 la puromicina se cultivaron adicionalmente en placas de cultivo de tejidos de 24 pocillos.

30 Determinación de la actividad luciferasa

35 La actividad luciferasa de las células se determinó utilizando el Luciferase Assay System (núm. E4030, Promega, Madison, WI, EEUU). Se centrifugaron 1×10^5 células (13.500 rpm, 1 min) en una centrífuga Eppendorf, y el sedimento se lavó en 100 µl de PBS. Después de la centrifugación (13.500 rpm, 1 min), el sedimento se lisó con 20 µl de Reporter Lysis Buffer (Promega), se congeló y se descongeló. Después de la centrifugación (13.500 rpm, 1 min), se descartaron 20 µl de sobrenadante y se añadieron 100 µl de reactivo de ensayo de luciferasa (en tubos de luminómetro especiales, Promega). La luminiscencia se midió (10 s) en un luminómetro (LB9507, Berthold, Vilvoorde, Bélgica).

Ejemplo 2

45 Inmunización de ratones y generación de hibridomas

Protocolo de inmunización para -003

50 Los ratones HCo12 se inmunizaron cada quince días con 20 µg de HA-CD38 purificado. La primera inmunización se realizó i.p. en presencia de 100 µl de PBS, mezclados con 100 µl de Coadyuvante Completo de Freund (CFA). Después de esta primera inmunización, se realizaron refuerzos posteriores (13x) con HA-CD38 purificado en presencia de 100 µl de PBS, mezclado con 100 µl de Coadyuvante Incompleto de Freund (IFA) alternando s.c. e i.p. Después del desarrollo del título, los ratones se reforzaron con 20 µg de HA-CD38 en PBS, i.v.

55 Protocolo de inmunización para -005 y -024

60 Los ratones HCo12 se inmunizaron cada quince días con 20 µg de HA-CD38 purificado alternando con células transfectadas con NIH-3T3-CD38. La primera inmunización se realizó con 5×10^6 células en 100 µl de PBS, mezclado con 100 µl de CFA, i.p., la segunda y posteriores inmunizaciones 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 realizaron en presencia de 200 µl de PBS. Después del desarrollo del título, los ratones se reforzaron con 20 µg de HA-CD38 en PBS, i.v.

Generación de hibridomas que producen anticuerpos monoclonales humanos para CD38

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

Ejemplo 3

10 Transfección de células NIH con CD38

El vector (pcIpuroCD38) para producir células NIH-3T3-CD38 se obtuvo del Prof. M. Glennie (Tenovus Research Laboratory, Hospital General de Southampton, Southampton, Reino Unido). Se cultivaron células NIH-3T3 (DSMZ, ACC 59; 150.000 células/pocillo; 0,5 ml; placas de fondo plano de 96 pocillos, Greiner) en DMEM (con un suplemento de glucosa [4,5 g/l], FCS al 10%, L-glutamina, Piruvato de Na; BioWhittaker) durante 24 h. A continuación, el ADN (0,8 µg) y la lipofectamina (Invitrogen, Breda, Países Bajos) se diluyeron en DMEM y se mezclaron (20 min, TA). Posteriormente, la mezcla (100 µl) se añadió a cada pocillo y se incubó (ON, 37°C).

20 Escrutinio de la expresión de CD38

Las células NIH-3T3-CD38 se lavaron (en 1 ml de PBS) y se tripsinizaron (200 µl, tripsina-EDTA, BioWhittaker). A continuación, se añadió 1 ml de DMEM y la mezcla se pipeteó en tubos FACS. Después de la centrifugación (1.200 rpm, 5 min), las células se lavaron en Tampón FACS (FB; PBS, BSA al 0,05%, NaN₃ al 0,02%) y se resuspendieron en 1 ml de FB. Después de la centrifugación (1.200 rpm, 5 min), se eliminó el sobrenadante y se añadió anti-CD38 humano de ratón-PE (dilución 1/50, Sanquin, Ámsterdam, Países Bajos). Después de lavar las células dos veces en FB, las células se resuspendieron en FB para su adquisición mediante citometría de flujo.

Expansión y selección

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

Cultivo de células NIH-3T3-CD38

Las células se cultivan en DMEM (con un suplemento de glucosa (4,5 g/l), FCS al 10%, L-glutamina 2 mM, piruvato de Na, penicilina, estreptomina). Las células se someten a pases dos veces por semana mediante el uso de tripsina/EDTA y se siembran a una concentración de 1×10^6 células/matraz T75. Las células NIH-3T3-CD38 con alto contenido de CD38 se congelaron en nitrógeno líquido (-80°C) hasta su uso.

45 Purificación del antígeno HA-CD38

Se acopló Sefarosa 4B (Amersham Bioscience, Uppsala, Suecia) con un anticuerpo anti-CD38 (Serotec, Oxford, Reino Unido). La columna (el tubo de la columna HR5/20 se empaquetó a una altura de 12 cm de altura de lecho, volumen de columna de 2,4 ml; la velocidad de flujo máxima 0,5 ml/min) se equilibró con al menos 5 volúmenes de columna (CV) de PBS. La muestra se filtró y se cargó en la columna. La columna se lavó con PBS hasta que la señal regresó al valor inicial (aproximadamente 3 CV). La elución se llevó a cabo con glicina 0,1 M a pH 2. Las fracciones eluidas se neutralizaron con Tris-HCl 2 M al 1% (v/v), pH 9.

55 Purificación de anticuerpos anti-CD38

Los anticuerpos anti-CD38 humano se purificaron a partir de los sobrenadantes de cultivos tisulares. Primero, los sobrenadantes se filtraron a través de un filtro de filtración transversal de 0,20 µm. A continuación, el sobrenadante se cargó en una columna de 5 ml de Proteína A (rProtein A FF, Amersham Bioscience) y se hizo eluir con ácido cítrico 0,1 M-NaOH, pH 3. El producto eluido se neutralizó inmediatamente con Tris-HCl 2 M, pH 9 y se sometió a diálisis O/N frente a fosfato de sodio 12,6 mM, NaCl 140 mM, pH 7,4 (B. Braun, Oss, Países Bajos). Después de la diálisis, las muestras se filtraron de forma estéril sobre un filtro de filtración transversal de 0,20 µm.

Purificación de lotes de His-CD38

La proteína está presente en el sobrenadante de cultivo celular 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 adicional de etiqueta poli-His en las construcciones y está presente en el extremo N de la proteína. Esta etiqueta permite la purificación con cromatografía de afinidad de metales inmovilizados. En este procedimiento, un quelante fijado sobre la resina cromatográfica se carga con cationes Co^{2+} . Particularmente, una secuencia que incluye 6 aminoácidos de histidina se une fuertemente a Co^{2+} . Por lo tanto, las proteínas CD38 etiquetadas con His se unen fuertemente a tal columna, mientras que otras proteínas presentes en el sobrenadante del cultivo fluirán a través de la columna o serán eliminadas por lavado. Las proteínas CD38 marcadas con His fuertemente unidas se hacen eluir a continuación con un tampón que contiene imidazol, que compite con la unión de His a Co^{2+} . Cuando se purifica suficiente His-CD38, el eluyente se elimina de la proteína mediante intercambio de tampón en una columna de desalinización.

Ejemplo 4

Unión de -003, -005 y -024 a células CHO transfectadas con CD38 (CHO-CD38), a células de Daudi-luc y a células tumorales de mieloma múltiple (MM) reciente

Después de la recolección y el recuento, las células de Daudi-luc, las células CHO transfectadas con CD38 y las células CHO de control se resuspendieron en PBS (1×10^6 células/ml). A continuación, las células se colocaron en placas con fondo en V de 96 pocillos (100 μl /pocillo) y se lavaron dos veces en PBS-BSA (PBS con un suplemento de BSA al 0,1% y azida de Na al 0,02%). Posteriormente, 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 de conejo-FITC en PBS-BSA (4°C en la oscuridad, 30 minutos). Las células se lavaron tres veces y la unión específica de los anticuerpos contra CD38 a las células CHO-CD38 y Daudi-luc se detectó mediante citometría de flujo. Se utilizó 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 la presente memoria) como control. Las Figuras 1 y 2 muestran que -003, -005 y -024 se unen a las células CHO-CD38 y a las células de Daudi-luc, aunque con diferentes CE_{50} (Tabla 1). No se observa unión a las células CHO de control (datos no mostrados).

Las células tumorales de MM recientes se obtuvieron del Dr. Lokhorst (University Medical Center Utrecht, Utrecht, Países Bajos). Las células tumorales se aislaron de la médula ósea de pacientes con mieloma múltiple mediante centrifugación por gradiente de Ficoll (Bio Whittaker; medio de separación de linfocitos, cat. 17-829E). Después de la recolección y el recuento, las células de 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 anti-IgG de ratón de cabra marcado con PE (1:200; Jackson ImmunoResearch Europe Ltd. Soham, Reino Unido). Después de la incubación (4°C, 30 min) y el lavado de las células en PBS-BSA, se midió la fluorescencia por citometría de flujo.

La Figura 3 muestra que -003, -005 y -024 se unen a las células de MM.

Tabla 1 - Valores de CE_{50} de la unión de anticuerpos anti-CD38 sobre células CHO-CD38, células de Daudi-luc y células tumorales de MM reciente

Anticuerpos específicos para CD38	CE_{50} de CHO-CD38 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	CE_{50} de Daudi-luc ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	CE_{50} de Células MM ($\mu\text{g}/\text{ml}$)
-003	0,54	0,26	0,56
-005	0,23	0,09	0,04
-024	0,08	0,05	0,02

Ejemplo 5

Citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos

Se recogieron células de Daudi-luc, células de tumor de mieloma múltiple reciente, células de tumor de Leucemia de Células Plasmáticas reciente y células de mieloma múltiple JK6L y AMO-1 (5×10^6 células) en RPMI⁺⁺ (medio de cultivo RPMI 1640 con un suplemento de suero de ternera Cosmic al 10% (HyClone, Logan, UT, EE.UU.), a las que se añadió ^{51}Cr (Cromo-51; Amersham Biosciences Europe GmbH, Roosendaal, Países Bajos) de 100 μCi y la mezcla se incubó en un baño de agua a 37°C durante 1 hora. Después del lavado de las células (dos veces en PBS, 1.500 rpm, 5 min), las células se resuspendieron en RPMI⁺⁺ y se sometieron a recuento por exclusión de azul de tripán. Las células se llevaron a una concentración de 1×10^5 células/ml.

Preparación de células efectoras

Las células mononucleares de sangre periférica reciente (voluntarios sanos, UMC Utrecht, Utrecht, Países Bajos) fueron aisladas de 40 ml de sangre heparinizada por Ficoll (Bio Whittaker; medio de separación de linfocitos, cat 17-829E) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Después de la resuspensión de las células en RPMI⁺⁺, las células se sometieron a recuento por exclusión de azul de tripán y se llevaron a una concentración de 1×10^7 células/ml.

Configuración de ADCC

Se pipetearon 50 μ l de células diana marcadas con Cr⁵¹ en placas de 96 pocillos, y se añadieron 50 μ l de anticuerpo, diluidos en RPMI⁺⁺ (concentraciones finales 10, 1, 0,1, 0,01 μ g/ml). Las células se incubaron (temperatura ambiente, 15 min) y se añadieron 50 μ l de células efectoras, lo que dio como resultado una razón de efector con respecto a diana de 100:1 (para la determinación de la lisis máxima, se añadieron 100 μ l de Triton-X100 al 5% en lugar de células efectoras; para la determinación de la lisis espontánea, se utilizaron 50 μ l de células diana y 100 μ l de RPMI). Las células se centrifugaron (500 rpm, 5 min) y se incubaron (37°C, CO₂ al 5%, 4 hr). Después de centrifugar las células (1.500 rpm, 5 min), se recogieron 100 μ l de sobrenadante en tubos micrónicos y se sometieron a recuento en un contador gamma. El porcentaje de lisis específica se calculó de la siguiente manera:

$$\frac{(\text{cpm de la muestra} - \text{cpm de células diana solamente})}{(\text{cpm de lisis máxima} - \text{cpm de células diana solamente})} \times 100$$
 en donde cpm son las cuentas por minuto.

En las células de Daudi-luc (Figura 4 y Tabla 2), -003, -005 y -024 inducen lisis por ADCC, y -003, y -005 tienen un rendimiento ligeramente mejor que el rituximab (mAb anti-CD20). Curiosamente, también cuando se utilizan células tumorales de mieloma múltiple reciente (obtenidas de Dr. H. Lokhorst, UMCU, Países Bajos) como células diana, la ADCC es inducida por -003, -005 y -024 (Figura 5A y Tabla 2).

Tabla 2 - Valores de CE₅₀ de anticuerpos específicos de CD38 obtenidos en ADCC

Anticuerpos específicos de CD38	CE ₅₀ Daudi-luc (ng/ml)	CE ₅₀ Células MM (ng/ml)
-003	9,0	27
-005	4,5	5,7
-024	9,7	56

Enriquecimiento de las células mononucleares de sangre periférica humana Erlangen

La sangre humana de voluntarios humanos (universidad de Erlangen, Erlangen, Alemania) se diluyó dos veces en RPMI 1640 y las células sanguíneas se colocaron en capas en Ficoll (Medio de Separación de Linfocitos 1077 g/ml, 710 g, temperatura ambiente, 20 min; BioWhittaker, Cambrex Bio Science Verviers, Verviers, Bélgica, cat. 17-829E, lote núm. 0148 32). Se recogieron células mononucleares de sangre periférica (CMN) de la interfase, se lavaron y se resuspendieron en medio de cultivo RPMI 1640 con un suplemento de FCS al 10%, L-glutamina 2 mM, 5 U/ml de penicilina, 50 μ g/ml de estreptomina (todos obtenidos de BioWhittaker) a lo que se añadió HEPES 25 mM (BioWhittaker).

Configuración de ADCC II

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, Universidad de Erlangen, Erlangen, Alemania) se marcaron con ⁵¹Cr de 20 μ Ci (Amersham Biosciences, Uppsala, Suecia) durante 2 horas. Después de un lavado exhaustivo en RPMI-10, las células se ajustaron a 1×10^5 células/ml. Se añadieron las MNC (50 μ l), los anticuerpos sensibilizadores (50 μ l) y RPMI-10 (50 μ l) a las placas de microtitulación de fondo redondo (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Alemania). Los ensayos se iniciaron agregando células de tumor de leucemia de células plasmáticas recientes, células JK6L o AMO-1 (50 μ l), lo que proporcionó un volumen final de 200 μ l. Se utilizó una razón de efector con respecto a diana (E:T) de 40:1. Después de la incubación (3 h, 37°C), los ensayos se detuvieron por centrifugación y se midió la liberación de Cr⁵¹ por triplicado en cuentas por minuto (cpm) en un contador de centelleo. El porcentaje de citotoxicidad celular se calculó utilizando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de lisis específica} = \frac{(\text{cpm experimental} - \text{cpm en el momento inicial})}{(\text{cpm máxima} - \text{CPM en el momento inicial})} \times 100$$

con una liberación máxima de ⁵¹Cr determinada mediante adición de ácido perclórico (concentración final 3%) a las células diana, y una liberación en el momento inicial medida en ausencia de anticuerpos sensibilizadores y células efectoras.

En ambas líneas celulares de mieloma múltiple (es decir, JK6L y AMO-1), la lisis se induce con -003 y -005 (Figuras

6 y 7), incluso cuando la expresión de CD38 es baja (línea celular AMO-1).

-003, -005 y -024 inducen la ADCC de células tumorales primarias de leucemia de células plasmáticas (Figura 5B).

5 **Ejemplo 6**

Citotoxicidad dependiente del complemento

Después de la recolección y el recuento de las células de Daudi-luc, la viabilidad de las células debe ser $\geq 90\%$. Después del lavado (PBS), las células se resuspenden a $2,0 \times 10^6$ células/ml en RPMI-B (RPMI con un suplemento de BSA al 1%). Posteriormente, las células se colocan en placas de fondo redondo de 96 pocillos a 1×10^5 células/pocillo (50 μ l/pocillo). A continuación, se añaden 50 μ l de anticuerpos a los pocillos (intervalo de concentración final entre 0 y 100 μ g/ml (diluciones triples en RPMI-B)). Después de la incubación (temperatura ambiente, 15 min), se añadieron a cada pocillo 11 μ l de suero humano agrupado (reserva de 18 donantes sanos) (37°C, 45 min). Los pocillos se resuspendieron una vez y se transfirieron 120 μ l a tubos FACS (Greiner). A continuación, se añadieron 10 μ l de yoduro de propidio (PI; Sigma-Aldrich Chemie B.V.) (10 μ g/ml de solución) a esta suspensión. La lisis se detectó mediante citometría de flujo (FACScalibur™, Becton Dickinson, San Diego, CA, EE.UU.) mediante la medición del porcentaje de células muertas (que corresponde a las células positivas para PI).

La Figura 8 y la Tabla 2 muestran que la lisis de las células de Daudi-luc es inducida por -005 (lisis máxima del ~60%) y que la lisis por -003 solo se observa a concentraciones de anticuerpos muy altas. -024 no induce CDC en células de Daudi (datos no mostrados). En las células CHO-CD38, la lisis es inducida por -003, -005 y -024 (Figura 9 y Tabla 3). La lisis por -003 se induce a concentraciones más altas. En células tumorales (todas obtenidas de Dr. Lokhorst y Dr. Bloem, University Medical Center Utrecht, Países Bajos), obtenidas de diferentes pacientes con MM (A: 3% de células tumorales refractarios, 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 indujo la lisis de células tumorales de MM (Figura 10E).

Tabla 3 - Valores de CE₅₀ de anticuerpos específicos de CD38 obtenidos en CDC

Anticuerpos específicos para CD38	CE ₅₀ Daudi-luc (μ g/ml)	CE ₅₀ CD38-CHO (μ g/ml)
-003	>90	3,14
-005	0,33	0,14
-024	>90	0,24

30 **Ejemplo 7**

Estudios de bloqueo cruzado utilizando FACS

Las células CHO-CD38 se incubaron con un exceso de anticuerpo específico para CD38 no marcado (4°C, 15 min). A continuación, las células se incubaron con anticuerpos específicos para CD38 marcados con FITC (la concentración se aproxima a la CE₉₀, 4°C, 45 min). Después de lavar dos veces las células con PBS-BSA, se midió la fluorescencia mediante citometría de flujo. La Figura 11 muestra que -003 no marcado bloquea la unión de -003 marcado con FITC, mientras que la unión de -005 marcado con FITC no se bloquea. Además, -005 no marcado bloquea la unión de -005 marcado con FITC, mientras que la unión de -003 marcado con FITC no se bloquea. -003 y -005 se unen a diferentes epítomos, porque no compiten por la unión.

Ejemplo 8

45 Estudios de bloqueo cruzado utilizando ELISA

El CD38 humano soluble se aplica como recubrimiento sobre la superficie de una placa ELISA. El CD38 aplicado como recubrimiento se incubaba con un exceso de anticuerpos específicos para CD38 no marcados durante aproximadamente 15 minutos y posteriormente se añaden anticuerpos específicos para CD38 biotinilados (la concentración se aproxima a la CE₉₀, temperatura ambiente, 1 hora). Después de lavar tres veces con PBS/Tween, se añade estreptavidina conjugada con peroxidasa de rábano picante (HRP) y la mezcla se incubaba durante 1 hora a temperatura ambiente. El complejo se puede detectar mediante la adición de una solución de ABTS y la conversión del sustrato mediada por HRP se mide utilizando un lector de ELISA a una DO de 405 nm.

55 **Ejemplo 9**

Estudios de bloqueo cruzado utilizando ELISA sándwich

Los anticuerpos específicos para CD38 se aplican como recubrimiento 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 con HRP durante 1 hora a temperatura ambiente. Este complejo se puede detectar mediante la adición de una solución ABTS (después de lavar con PBS/Tween) y la conversión del sustrato mediada por HRP se mide utilizando un lector de ELISA a una DO de 405 nm.

Ejemplo 10

Reactividad con un panel de tejidos humanos y reactividad cruzada con tejido de cinomolgo mediante inmunohistoquímica

Las secciones de tejido humano congelado (obtenidas del Dr. H. Niessen, Free University Medical Center, Ámsterdam, Países Bajos) o tejido de mono (Inveresk Research, Glasgow, Escocia) se cortaron a 6 µm y se secaron al aire durante la noche. Estas secciones de criostato se fijaron en acetona (temperatura ambiente, 10 min) y se secaron al aire (aprox. 5 min). Posteriormente, las secciones se incubaron con un tampón de ácido cítrico/fosfato 1x que contenía H₂O₂ al 0,1% (pH 5,8; Sigma), para bloquear la peroxidasa endógena. Después de 20 minutos a temperatura ambiente, las secciones se lavaron dos veces con PBS y Tween-20 al 0,05% (PBST, temperatura ambiente, 5 minutos; Riedel de-Haen, Alemania). A continuación, las secciones se incubaron con avidina (temperatura ambiente, 15 min; DAKO, Glostrup, Dinamarca), se lavaron dos veces con PBST y se incubaron con biotina (temperatura ambiente, 15 min; DAKO) para bloquear la biotina endógena. Después de lavar las secciones dos veces con PBST, las secciones se preincubaron con PBST⁺⁺ (PBST con un suplemento de suero humano normal al 10% (NHS, CLB, Ámsterdam, Países Bajos) y suero de cabra normal al 10% (NGS; DAKO) (temperatura ambiente, 20 min). Después de la transferencia del suero de preincubación, se incubaron las secciones con anticuerpo primario marcado con FITC diluido en PBST⁺⁺ al 2% a las concentraciones indicadas (temperatura ambiente, 60 min). Después de eso, las secciones se incubaron con anti-FITC de conejo (1:1.000; DAKO) en PBST⁺⁺ al 2% (temperatura ambiente, 30 min). Después de lavar las secciones con PBST, las secciones se incubaron con anti-conejo de cabra-biotina (1:400; DAKO) en PBST⁺⁺ al 2% (temperatura ambiente, 30 min). A continuación, las secciones se lavaron y se incubaron con SABC-HRP (1:100; DAKO) en PBST⁺⁺ al 2% (temperatura ambiente, 30 min). Después de lavar las secciones dos veces en PBST, se incubaron (temperatura ambiente, 10 min) con solución de revelado de amino-etil-carbazol (AEC) (tampón de acetato 50 mM, pH 4,9, H₂O₂ al 0,01%; Riedel-de-Haen). Finalmente, las secciones se lavaron en H₂O Millipore (5 min) y se contratiñeron 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 y 13B), así como con músculo estriado (miocitos, Figuras 12C y 13C), macrófagos, linfocitos y células B plasmáticas (Figuras 12A y 13A). -024 tiene una tinción similar de músculo estriado y epitelio bronquial, pero la tinción fue menos intensa. No se observa tinción de células endoteliales, ni con -003 (Fig. 14D), ni con -005 (14E) ni con -24 (datos no mostrados), mientras que se observó una tinción clara con los anticuerpos de control positivo contra marcadores de células endoteliales CD31 (Fig. 14A) y vWF (14B). Se utilizó anti-KLH como anticuerpo de control negativo (Fig. 14C). -003 (Figura 12D) y -024 (datos no mostrados) pero no -005 (Figura 13D) reaccionan de forma cruzada con el tejido linfóide del mono cinomolgo.

Ejemplo 11

Reactividad cruzada con células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de mono cinomolgo o rhesus mediante citometría de flujo

Se lisaron 5 ml de sangre periférica de mono cinomolgo (Inveresk Research) añadiendo 4,5 ml de tampón de choque (NH₄CL 1,7 mM, EDTA 1 mM), 40 ml de H₂O y 450 µl de KHCO₃ al 10%. Después de la hemólisis, las células se centrifugaron (1.200 rpm, 10 min) y se lavaron tres veces en PBS. Después del recuento de las células con azul de tripán, las células se resuspendieron en PBS-BSA (1x10⁶ célula/ml).

Se diluyeron 1:1 17,5 ml de sangre periférica de mono rhesus (BPRC, Rijswijk, Países Bajos) con RPMI 1640 y se colocaron en capas sobre Ficoll (1,077 g/ml; BioWhittaker, cat. 17-829E, núm. lote 0148 32). Después de la centrifugación (710 g, temperatura ambiente, 20 min), la interfase se recogió y se lavó dos veces en RPMI. Después del último lavado, las células se resuspendieron en RPMI 1640 a una concentración de 1x10⁵ células/50 µl.

Las células se transfirieron a una placa de 96 pocillos (100.000 PBMC/pocillo), se lavaron en tampón FACS (PBS, BSA al 0,05%, NaN₃ 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-hlgG marcado con FITC (DAKO, Glostrup, Dinamarca) (4°C, 30 min). Finalmente, las células se recogieron en tubos FACS en un volumen total de 150 µl. Las muestras se midieron y analizaron mediante el uso de FACScalibur™ (Becton Dickinson, San Diego, CA, EE.UU.).

Con la citometría de flujo, se mostró una reactividad cruzada de -003 en linfocitos (Figura 15A) y monocitos (Figura 15B) de cinomolgo, pero no de -005. También en monos rhesus, se observó una reactividad cruzada de -003 en células mononucleares, pero no de -005 (Figura 15C).

5 Ejemplo 12

Experimentos de internalización

10 Las células CHO-CD38 se tiñeron con una concentración saturante de anticuerpos específicos para CD38 marcados con FITC (sobre hielo, 30 min). Después del lavado de las células (en RPMI1640 con un suplemento de FCS al 10%), se calentó una reserva de células hasta 37°C para permitir la internalización, y la otra reserva se dejó en hielo. A varios intervalos de tiempo (0-120 min) se tomaron alícuotas de células y se transfirieron a PBS-BSA enfriado con hielo para detener la internalización. Después de lavar las muestras dos veces con PBS-BSA, se añadió EtBr (diluído en PBS-BSA, concentración final 2 mg/ml) a las muestras para inactivar el FITC unido a la membrana. La fluorescencia se midió por citometría de flujo.

Las Figuras 16A y 16B muestran que -003 y -005 son internalizados por las células CHO-CD38 en 5 minutos a 37°C.

20 Ejemplo 13

Experimentos de SCID-luciferasa in vivo

En este modelo las células tumorales son transfectadas con luciferasa de luciérnaga. Tras la administración de luciferina (Molecular Probes, Leiden, Países Bajos) a los ratones, las células marcadas se pueden detectar in vivo mediante imágenes bioluminiscentes utilizando una cámara CCD altamente sensible, véase Wetterwald et al., American Journal of Pathology 160(3), 1143-1153 (2002).

Las células de Daudi se transfectaron con luciferasa gWIZ de Gene Therapy Systems (San Diego, CA) y se cultivaron en RPMI con FCS al 10%, Pen/Strep, piruvato de sodio y 1 µg/ml de puromicina (Sigma). Las células se analizaron para determinar la expresión de luciferasa (expresada en células RLU/1 x 10⁵) en un luminómetro y para determinar la expresión de CD38 mediante FACS. Se inyectaron 2,5 x 10⁶ células de Daudi/transfectadas con luciferasa/ratón i.v. en ratones SCID. Los ratones se trataron con -003, -005, anticuerpo de control de isotipo (HuMab-KLH) o rituximab (anticuerpo anti-CD20). Los anticuerpos fueron inyectados por vía intraperitoneal. Se utilizaron cuatro configuraciones de tratamiento (véase Tabla 4). En la configuración preventiva, el anticuerpo (100 µg/ratón) y las células se administraron simultáneamente. En la configuración terapéutica I, el anticuerpo (300 µg/ratón) se administró 7 días después de la administración de las células. En la configuración terapéutica II, el anticuerpo (10 µg/ratón) se administró 14 días después de la administración de las células. En la configuración terapéutica III, el anticuerpo (100 µg/ratón) se administró 7 días después de la administración de las células. Para la obtención de imágenes, los ratones fueron anestesiados por medio de inyección i.p. de una mezcla de ketamina/xilazina/atropina. Se les administró i.p. D-luciferina sintética (sal de sodio, Molecular Probes) a una dosis de 25 mg/ml. A continuación, los ratones se colocaron en una cabina de luz hermética y, después de 3 minutos, se inició la obtención de imágenes utilizando un detector CCD enfriado con nitrógeno líquido VersArray 1300B (Roper Scientific). Los fotones emitidos desde la luciferasa se contaron durante un período de exposición de 5 min. Bajo iluminación se obtuvieron imágenes en blanco y negro como referencia. Se utilizó el soporte lógico MetaVue (Universal Imaging Corp) para la recopilación de datos y el análisis de imágenes. La significación estadística de las diferencias entre los grupos se estableció mediante el análisis de una vía de la varianza con una prueba posterior de Newman-Keuls utilizando GraphPad PRISM versión 3.02 (Graphpad Software Inc).

Tabla 4 - Configuraciones de tratamiento para experimentos de luciferasa in vivo

Configuración experimental	Tratamiento con anticuerpos (días después de la inoculación celular).	Dosis de anticuerpos (µg/ratón)
Configuración preventiva	0	100
Configuración terapéutica	7	300
Configuración terapéutica II	14	10
Configuración terapéutica III	7	100

50 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, 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 para CD38 retardan el crecimiento de las células tumorales de Daudi-luc (Figura 17C). En la configuración terapéutica III, -003 y -024 muestran una clara inhibición del crecimiento de las células tumorales de Daudi-luc (Figura 17D).

Ejemplo 14

Apoptosis

5 El ensayo de apoptosis se llevó a cabo de acuerdo con las instrucciones del fabricante (kit de apoptosis Annexin-V, BD Biosciences, Alphen a.d. Rijn, Países Bajos). En resumen, se añadieron mAb para CD38 a $2,5 \times 10^5$ células (células de Daudi transfectadas con luciferasa, en 0,5 ml de RPMI⁺⁺ en una placa de 24 pocillos), a una concentración de 5 µg/ml de -003 o -005 o un anticuerpo anti-CD20 solo o en presencia de bloqueo cruzado de rb-anti-hlgG (50 µg/ml).

10 Después de la incubación (37°C, CO₂ al 5%, 20 h), las células se recogieron cuidadosamente y se lavaron con Tampón de Unión (1.200 rpm, 4°C, 5 min, BD Biosciences). El sedimento se resuspendió en 100 µl de Tampón de Unión. A continuación, 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 temperatura ambiente. Se añadieron 400 µl de Tampón de Unión y se midieron las muestras (lectura de PI en FL2). Para el análisis de células apoptóticas, todas las células positivas para Anexina-V se contaron mediante citometría de flujo utilizando un citómetro de flujo FACScalibur con el soporte lógico CellQuest pro (BD Biosciences). Se recogieron al menos 10.000 eventos para su análisis. Esta población incluye tanto células positivas para PI como negativas para PI.

20 La Figura 18 muestra que -003 y -005 no inducen apoptosis. Sin embargo, después del entrecruzamiento, se observa la apoptosis de las células diana. -003 indujo apoptosis después del entrecruzamiento que fue similar a la apoptosis inducida por un anticuerpo anti-CD20 (rituximab). -005 fue menos capaz de inducir la apoptosis después del entrecruzamiento. Se obtuvieron resultados similares con células RAMOS como células diana (datos no mostrados).

Ejemplo 15

Efecto de -005 sobre células B de injerto tisular en un modelo de ratón RA-SCID

30 Implantación de tejido sinovial

Los ratones SCID, cepa CB-17/lcrCrl-SCID-bg, macho/hembra, de 4-12 semanas, adquiridos de Charles River Laboratories Nederland (Maastricht, Países Bajos) se mantuvieron en jaulas de IVC en condiciones normales de temperatura y luz, y fueron alimentados con comida de laboratorio y agua a voluntad. Antes de la implantación, los ratones (tres ratones en cada grupo experimental, día 0) se anestesiaron mediante inyección intraperitoneal de ketamina (NIMATEK, EuroVet) y xilazina (Rompun, Bayer) en una proporción de 1:1. Se realizó una pequeña incisión en la piel utilizando tijeras quirúrgicas. El tejido sinovial inflamado de un paciente con artritis reumatoide sometido a cirugía de reemplazo articular se implantó por vía subcutánea como una agrupación de seis fragmentos pequeños (total 2-3 mm³) en cada flanco del ratón. La herida se cerró utilizando cola de cianoacrilato Permacol. El día 1 del experimento, se analizó el tejido sinovial restante para detectar células B en los trasplantes sinoviales inflamados. Se inyectó (i.v.) -005 (12 mg/kg) o anticuerpo de control (anti-KLH, 30 mg/kg), en un volumen de 200 µl el día 8 del experimento. Al final del experimento (día 14) los ratones se sacrificaron mediante inhalación de CO₂ y los injertos sinoviales fueron explantados. Uno de los injertos fue congelado instantáneamente en un compuesto OCT (TissueTek, Sacura Finetek Europe) para un análisis inmunohistoquímico adicional, y otro fue congelado por inmersión en nitrógeno líquido para un análisis de ARN adicional.

Inmunohistoquímica

50 Se prepararon criosecciones 5 µm en portaobjetos SuperFrost (Menzel GmbH, Braunschweig) utilizando 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 fueron realizadas a temperatura ambiente. La actividad de peroxidasa endógena se bloqueó por incubación con PBS con un suplemento de peróxido de hidrógeno al 0,3% y azida de sodio 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, se incubó el anticuerpo primario (mAb de ratón) diluido en PBS con un suplemento de BSA al 1%/NHS al 10%/NRbS al 10% durante 60 min. Después de 3 lavados x 2 min en PBS, se añadió producto conjugado con HRP (anti-Ig de ratón de cabra-HRP; DAKO P0447) diluido 1:50 en PBS (con un suplemento de BSA al 1%/NHS al 10%/NRbS al 10%) durante 30 min. La señal de peroxidasa se mejoró utilizando el sistema TSA[™] Biotin (Perkin Elmer Life Sciences, NEL700). Los portaobjetos se lavaron 3 x 2 min en PBS y se incubaron con biotiniil tiramida diluida 1:1.600 en tampón de amplificación durante 30 min. Después de 3 lavados x 2 min en PBS, se añadió estreptavidina-HRP diluida 1:400 en PBS (con un suplemento de 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 de color se detuvo con agua destilada. Finalmente, los portaobjetos se tiñeron con hematoxilina (MERCK), se lavaron con agua corriente y se cubrieron con glicerina y cubreobjetos de Kaiser.

Puntuación de la intensidad de la tinción

- 5 La puntuación de los xenoinjertos de tejido sinovial teñidos se realizó de forma ciega por dos personas entrenadas. Primero se seleccionó la sección más fuerte de una serie de secciones y esta sección de referencia recibió la puntuación máxima 8. La intensidad de tinción en las otras secciones se calificó después en una escala de 0 a 8, con respecto a la sección de referencia.

Análisis estadístico

- 10 La puntuación de la intensidad de la tinción se analizó mediante ANOVA de una vía de Kruskal-Wallis seguido de la prueba de comparación múltiple de Dunn utilizando Graph Pad Prism versión 4.01 (soporte lógico Graph Pad, Inc., San Diego, CA, EE.UU.).
- 15 La Figura 19 y la Figura 21 muestran que el número de células plasmáticas positivas para anti-CD38 se reduce después del tratamiento con -005. La tinción de células plasmáticas con anti-CD138 confirma que -005 da como resultado una reducción del número de células plasmáticas (Figuras 20 y 22).

Ejemplo 16

- 20 Secuenciación de la secuencia codificante de anticuerpos humanos contra CD38

Preparación de ARN

- 25 El RNA total se preparó a partir de 5×10^6 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

- 30 Se preparó el ADN complementario 5'-RACE (ADNc) del ARN a partir de 100 ng de ARN total, utilizando el kit de Amplificación de ADNc SMART RACE (Clontech), siguiendo el protocolo del fabricante.

- 35 Los cebadores oligonucleotídicos fueron sintetizados y cuantificados por Isogen Bioscience (Maarsse, Países Bajos). Los cebadores se disolvieron en H₂O a 100 pmoles/ μ l y se almacenaron a -20°C. Se tabula un resumen de todos los cebadores de PCR y secuenciación (Tabla 5). Para la PCR, se utilizó la ADN polimerasa PfuTurbo® Hotstart (Stratagene, Ámsterdam, Países Bajos; producto núm. 600322) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Cada mezcla de reacción contenía 200 μ M de dNTP mezclados (Roche Diagnostics, Almere, Países Bajos; producto núm. 1814362), 12 pmoles del cebador inverso (RACEG1A1 para V_H3003-005, RACEV_HApal para V_H3003-003 y RACEV_LBsiWI para V_L3003-003 y 005), 7.2 pmoles de UPM-Mix (UPM-Mix: ShortupMH3 2 μ M y LongUPMH3 0,4 μ M), 0,6 μ l del molde de ADNc 5'-RACE y 1,5 unidades de ADN polimerasa PfuTurbo® Hotstart en tampón de reacción de PCR (suministrado con polimerasa) en un volumen total de 30 μ l. Las reacciones de PCR se llevaron a cabo con un TGradient Thermocycler 96 (Whatman Biometra, Goettingen, Alemania; producto núm. 050-801) utilizando un programa de 35 ciclos: desnaturalización a 95°C durante 2 minutos; 35 ciclos de 95°C durante 30 segundos, 55°C durante 30 segundos y 72°C durante 1,5 minutos; extensión final a 72°C durante 10 min. Cuando
- 45 fue apropiado, las mezclas de PCR se almacenaron a 4°C hasta su posterior análisis o procesamiento.

Tabla 5 - Cebadores

Nombre	Secuencia
ShortUPMH3	TGAAAGCTTCTAATACGACTCACTATAGGGC
RACEV _L BsiWi	GAAGATGAAGACAGATGGTGCAGCCACCGTACG
RACEV _H Apal	GGAGGGTGCCAGGGGAAGACCGATGGGCCCTT
RACEG1A1	GGGAGTAGAGTCCTGAGGACTG
M13inverso	GGATAACAATTTACACAGG
LongUPMH3	TGAAAGCTTCTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGG TATCAACGCAGAGT
HCseq5	GGTCAGGGCGCCTGAGTTCCACG
VH3003-003dir	GATAAGCTTGCCGCCACCATGGACTGGACCTGGAGGTTC CTC
VH3003-5dir	GATAAGCTTGCCGCCACCATGGAGTTTGGGCTGAGCTGG CTT
VL3003-5exdir	GATAAGCTTGCCGCCACCATGGAAGCCCCAGCTCAGCTT CTC
VL3003-003dir	GATAAGCTTGCCGCCACCATGAGGGTCCTCGCTCAGCTC CTG
VH300324exdir	GATAAGCTTGCCGCCACCATGGGGTCAACCGCCATCCTC GCC
VL3003-24-5exdir	GATAAGCTTGCCGCCACCATGGAAGCCCCAGCTCAGCTT CTC

Clonación de V_H y V_L de -003-2F5 y V_L de -005 y V_H y V_L de -024 en el Sistema Vector pGEMT II

5 Los productos de reacción se separaron por electroforesis en un gel de agarosa TAE al 1% y se tiñeron con bromuro de etidio. Se cortaron bandas del tamaño correcto de los geles y se aisló el ADN de la agarosa utilizando el kit de extracción de gel QiaexII (Qiagen, núm. de cat. 20021).

10 Los fragmentos de PCR aislados en gel se dotaron de una cola A mediante una incubación de 10 min a 72°C con dATP 200 µM y 2,5 unidades de Amplitaq (Perkin Elmer) y se purificaron utilizando columnas Minielute (Qiagen). Los fragmentos de PCR con cola A se clonaron en el vector pGEMTeasy (Promega) utilizando el kit y el protocolo del Sistema pGEMT Easy (LJ270, página 3/4). Se transformaron 2 µl de la mezcla de ligación en E. Coli competente OneShot DH5αT1R (Invitrogen) y se sembraron sobre placas LB/Amp/IPTG/Xgal.

15 Secuenciación

20 Las regiones V de -003 y -024 y la región V_L de -005 fueron secuenciada por AGOWA (Berlín, Alemania) después de la selección de 20 (V_H-003), 16 (V_L-003), 15 (V_L-005) y 6 (V_H y V_L -024) colonias blanco, aislamiento del plásmido y secuenciación con el cebador inverso M13. La región V_H de -005 se secuenció directamente en el producto de PCR utilizando el cebador HCseq5. Las secuencias se analizaron utilizando el paquete avanzado Vector NTI (Invitrogen).

Generación de vectores de expresión para el anticuerpo -003, -005, -024 y el anticuerpo 3079 de Morphosys

25 La región codificante de V_H de -003 se amplificó por PCR a partir de un clon de plásmido pGemT que contiene la región V_H de -003, utilizando los cebadores VH3003-003 directo y RACEVHApal, introduciendo sitios de restricción adecuados (HindIII y Apal) para la clonación en pConG1f0.4 (Lonza Biologics, Slough, Reino Unido) y una secuencia de Kozak ideal (GCCGCCACC). El vector pConG1f0.4 contiene la región constante de la cadena pesada de la IgG1

humana. El fragmento de la PCR de V_H se insertó, en marco, en el vector pConG1f0.4 utilizando HindIII y Apal. La construcción se verificó mediante análisis de secuencia.

5 La región codificante de V_H de -005 se amplificó por PCR a partir de un clon de plásmido pGemT que contiene la región de V_H de -005, utilizando los cebadores VH3003-5 directo y RACEVHApal, introduciendo sitios de restricción adecuados (HindIII y Apal) para la clonación en pConG1f0.4 y una secuencia de Kozak ideal. El fragmento de PCR de V_H se insertó, en marco, en el vector pConG1f0.4 utilizando HindIII y Apal. La construcción se verificó mediante análisis de secuencia.

10 La región codificante de V_H de -024 se amplificó por PCR a partir de un clon de plásmido pGemT que contiene la región de V_H de -024, utilizando los cebadores VH300324ex directo y RACEVHApal, introduciendo sitios de restricción adecuados (HindIII y Apal) para la clonación en pConG1f0.4 y una secuencia de Kozak ideal. El fragmento de PCR de V_H se insertó, en marco, en el vector pConG1f0.4 utilizando HindIII y Apal. La construcción se verificó mediante análisis de secuencia.

15 La región codificante de V_H del anticuerpo 3079 de Morphosys fue sintetizada por GeneArt (Regensburg, Alemania), basándose en los datos publicados en la patente WO 2005/103083 A2. Se optimizaron los codones de la región codificante para la expresión en células HEK para mejorar los niveles de expresión y se introdujeron sitios de restricción adecuados (HindIII y Apal) para la clonación en pConG1f0.4 y una secuencia de Kozak ideal. El plásmido que contiene la región VH sintética se digirió con Apal y HindIII y el fragmento VH se insertó, en marco, en el vector pConG1f0.4.

20 La región codificante de V_L de -005 se amplificó por PCR a partir de un clon de plásmido pGemT que contiene la región V_L de -005, utilizando los cebadores VL3003-5ex directo y RACEVLBsiWI, introduciendo sitios de restricción adecuados (HindIII y Pfl23II) para la clonación en pConKappa0.4 (Lonza Biologics) y una secuencia de Kozak ideal. El vector pConKappa0.4 contiene la región constante de la cadena ligera kappa. El fragmento de PCR de V_L se insertó, en marco, en el vector pConKappa0.4 utilizando HindIII y Pfl23II. La construcción se verificó mediante análisis de secuencia.

30 La región codificante de V_L de -003 se amplificó por PCR a partir de un clon de plásmido pGemT que contiene la región V_L de -003, utilizando los cebadores VL3003-003for y RACEVLBsiWI, introduciendo sitios de restricción adecuados (HindIII y Pfl23II) para la clonación en pConKappa0.4 y una secuencia de Kozak ideal. El fragmento de PCR de V_L se insertó, en marco, en el vector pConKappa0.4 utilizando HindIII y Pfl23II. La construcción se verificó mediante análisis de secuencia.

35 La región codificante de V_L de -024 se amplificó por PCR a partir de un clon de plásmido pGemT que contiene la región V_L de -024, utilizando los cebadores VL3003-24-5exfor y RACEVLBsiWI, introduciendo sitios de restricción adecuados (HindIII y Pfl23II) para la clonación en pConKappa0.4 y una secuencia de Kozak ideal. El fragmento de PCR de V_L se insertó, en marco, en el vector pConKappa0.4 utilizando HindIII y Pfl23II. La construcción se verificó mediante análisis de secuencia.

40 La región codificante de V_L del anticuerpo 3079 de Morphosys fue sintetizada por GeneArt, basándose en los datos publicados en la patente WO 2005/103083. Se optimizaron los codones de la región codificante para la expresión en células HEK; para mejorar los niveles de expresión y se introdujeron los sitios de restricción adecuados (HindIII y Pfl23II) para la clonación en pConKappa0.4 y una secuencia de Kozak ideal. El plásmido, que contiene la región V_L sintética, se digirió con Pfl23II y HindIII y el fragmento VH se insertó, en marco, en el vector pConKappa0.4.

45 Los anticuerpos se expresaron de forma transitoria en células HEK-293F, como se describe en el Ejemplo 17, cotransfectando sus vectores de cadena pesada y cadena ligera.

50 Generación de líneas celulares estables en células CHO-K1SV

Para la generación de líneas celulares estables, los vectores de cadena pesada y ligera de -003 o -005 se combinaron en un único vector de doble gen mediante técnicas de clonación convencionales.

55 Los vectores de doble gen de -003 o -005 se linealizaron y se transfectaron en células CHO-K1SV (Lonza Biologics), esencialmente como describe el fabricante. Las líneas celulares estables se seleccionaron mediante selección con L-metionina sulfoximina (MSX) 25 μ M según lo descrito por Lonza Biologics. Los clones de máxima producción se seleccionaron y propagaron en medio CD-CHO (Invitrogen) y los anticuerpos se purificaron del sobrenadante de cultivo celular como se describe en el Ejemplo 3.

60 **Ejemplo 17**

Mapeo de epítopos utilizando mutagénesis dirigida al sitio

Los cebadores oligonucleotídicos fueron sintetizados y cuantificados por Isogen Bioscience (Maarssen, Países Bajos). Los cebadores se disolvieron en H₂O a 100 pmoles/μl y se almacenaron a -20°C. Un resumen de todos los cebadores de PCR y secuenciación se muestra en la Tabla 6. Para la PCR, se utilizó la ADN polimerasa PfuTurbo® Hotstart (Stratagene, Ámsterdam, Países Bajos) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Cada mezcla de reacción contenía dNTP mezclados 200 μM (Roche Diagnostics, Almere, Países Bajos), 10 pmoles de cebador directo e 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 la polimerasa) en un volumen total de 20 μl. Las reacciones de PCR se llevaron a cabo con un TGradient Thermocycler 96 (Whatman Biometra, Goettingen, Alemania) utilizando un programa de 32 ciclos: desnaturalización a 95°C durante 2 minutos; 30 ciclos de 95°C durante 30 segundos, un gradiente de 60-70°C (u otra temperatura de reasociación específica) durante 30 segundos y 72°C durante 3 minutos; extensión final a 72°C durante 10 min. Cuando fue apropiado, las mezclas de PCR se almacenaron a 4°C hasta su posterior análisis o procesamiento.

La electroforesis en gel de agarosa se realizó de acuerdo con Sambrook (Sambrook, Russell et al. 2000) utilizando geles de 50 ml, en 1 x tampón Tris Acetato EDTA. El ADN se visualizó mediante la inclusión de bromuro de etidio en el gel y la observación bajo luz UV. Las imágenes del gel se registraron mediante una cámara CCD y un sistema de análisis de imágenes (GeneGnome; Syngene, a través de Westburg B.V., Leusden, Países Bajos).

La purificación de los fragmentos de PCR deseados se llevó a cabo utilizando un kit de Purificación de PCR MinElute (Qiagen, a través de Westburg, Leusden, Países Bajos; producto núm. 28006), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El ADN aislado se cuantificó mediante espectroscopia UV (véase más abajo) y la calidad se evaluó mediante electroforesis en gel de agarosa.

Alternativamente, los productos de PCR o de la digestión se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa (por ejemplo, cuando estaban presentes múltiples fragmentos) utilizando un gel de agarosa Tris Acetato EDTA al 1%. El fragmento deseado se extrajo del gel y se recuperó utilizando el kit de extracción de gel QIAEX II (Qiagen; producto núm. 20051), de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

La densidad óptica de los ácidos nucleicos se determinó utilizando 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 el análisis de la densidad óptica (DO) a 260 nm (una unidad de DO_{260nm} unidad = 50 μg/ml). Para todas las muestras, el tampón en el que se disolvieron los ácidos nucleicos se utilizó como referencia.

Las enzimas de restricción y los suplementos se obtuvieron de New England Biolabs (Beverly, MA, EE.UU.) O Fermetas (Vilnius, Lituania) y se utilizaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El ADN (100 ng) se digirió con 5 unidades de enzimas en el tampón apropiado en un volumen final de 10 μl (los volúmenes de reacción se ampliaron según correspondía). Las digestiones se incubaron a la temperatura recomendada durante un mínimo de 60 minutos. Para los fragmentos que requieren digestiones dobles con enzimas de restricción que implican tampones o requisitos de temperatura incompatibles, las digestiones se realizaron de forma secuencial. Cuando fue necesario, los productos de digestión se purificaron mediante electroforesis en gel de agarosa y extracción con gel.

Las ligaciones de los fragmentos de ADN se realizaron con el kit de Quick Ligation (New England Biolabs) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Para cada ligación, el ADN del vector se mezcló con un exceso molar de aproximadamente el triple del ADN insertado.

El ADN plasmídico (1-5 μl de solución de ADN, típicamente 2 μl de mezcla de ligación de ADN) se transformó en células de E. coli One Shot DH5α-T1^R (Invitrogen, Breda, Países Bajos; producto núm. 12297-016) utilizando el método de choque térmico, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. A continuación, las células se colocaron en placas de agar Luria-Bertani (LB) que contenían 50 μg/ml de ampicilina. Las placas se incubaron durante 16-18 horas a 37°C hasta que se hicieron evidentes las colonias bacterianas.

Las colonias bacterianas se escrutaron para detectar la presencia de vectores que contenían las secuencias deseadas mediante PCR de colonias utilizando ThermoStart PCR Master Mix (Abgene, a través de Westburg, Leusden, Países Bajos; producto núm. 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 a continuación se resuspendieron en la mezcla de PCR. La PCR se realizó con un TGradient Thermocycler 96 utilizando un programa de 35 ciclos: desnaturalización a 95°C durante 15 min; 35 ciclos de 94°C durante 30 segundos, 55°C durante 30 segundos y 72°C durante 2 minutos; seguido por una etapa de extensión final de 10 min a 72°C. Cuando fue apropiado, las mezclas de PCR se almacenaron a 4°C hasta su análisis por electroforesis en gel de agarosa.

El ADN plasmídico se aisló de los cultivos de E. coli utilizando los siguientes kits de Qiagen (a través de Westburg, Leusden, Países Bajos), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Para la preparación de plásmidos a granel (50-150 ml de cultivo), se utilizó un kit HiSpeed Plasmid Maxi (producto núm. 12663) o un kit HiSpeed Plasmid Midi

(producto núm. 12643). Para la preparación de plásmidos a pequeña escala (± 2 ml de cultivo), se utilizó un kit Qiaprep Spin Miniprep (producto núm. 27106) y el ADN se hizo eluir en 50 μ l de tampón de elución (suministrado con el kit).

5 Construcción del vector de expresión de HA-CD38 pEE13.4HACD38

El dominio extracelular de CD38 humano se amplificó a partir del plásmido pCIpuroCD38 (obtenido del Prof. M. Glennie, Tenovus Research Laboratory, Southampton General Hospital, Southampton, Reino Unido) utilizando los cebadores cd38forha y cd38exrev. Por medio de esta reacción de PCR se introdujo una etiqueta de HA. Este producto de PCR se usó como molde para una segunda reacción de PCR con los cebadores SPHMM38ex y cd38exrev. Mediante esta reacción de PCR, se introdujeron el péptido señal SPHMM, los sitios de restricción y una secuencia de Kozak ideal (GCCGCCACC) para la expresión óptima. Después de la purificación, este fragmento de PCR se clonó en el vector de expresión pEE13.4 (Lonza Biologics) y se confirmó la secuencia codificante completa mediante la secuenciación con los cebadores pConKseq1, pEE13.4seqrev, cd38seq1for y cd38seq2rev (Tabla 6). Esta construcción se denominó pEE13.4HACD38

15 Mutagénesis dirigida al sitio

Se construyeron tres proteínas mutantes únicas 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). La mutagénesis dirigida al sitio se realizó utilizando el kit de mutagénesis dirigida al sitio QuickChange II XL (Stratagene, Amsterdam, Países Bajos) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Este método incluyó la introducción de un sitio de restricción adicional silencioso o la pérdida de un sitio de restricción para escrutar la mutagénesis satisfactoria (sitio *Xba*1 adicional para el mutante T237A, sitio *Bcg*1 adicional para el mutante Q272R y pérdida del sitio *Ssp*1 para el mutante S274F). Brevemente, se mezclaron 5 μ l de búfer de reacción 10x, 1 μ l de oligonucleótido HACD38T237Afor2, HACD38Q272Rfor o HACD38S274Ffor (100 pmoles/ μ l), 1 μ l de mezcla de dNTP, 3 μ l de Quicksolution, 1 μ l de plásmido pEE13.4HACD38 (50 ng/ μ l) y 1 μ l de ADN polimerasa de PfuUltra HF en un volumen total de 50 μ l y se amplificaron con un termociclador TGradient 96 (Whatman Biometra, Goettingen, Alemania; producto núm. 050-801) utilizando un programa de 18 ciclos: desnaturalización a 95°C durante 1 min; 18 ciclos de 95°C durante 50 segundos, 60°C durante 50 segundos y 68°C durante 10 minutos. Las mezclas de PCR se almacenaron a 4°C hasta su posterior procesamiento. A continuación, las mezclas de PCR se incubaron con 1 μ l de *Dpn* durante 60 min a 37°C para digerir el vector pEE13.4HACD38 WT y se almacenaron a 4°C hasta su posterior procesamiento. La mezcla de reacción se hizo precipitar con 5 μ l de NaAc 3 M y 125 μ l de etanol, se incubó durante 20 minutos a -20°C y se centrifugó durante 20 minutos a 4°C a 14.000xg. El sedimento de ADN se lavó con etanol al 70%, se secó y se disolvió en 4 μ l de agua. El volumen total de reacción de 4 μ l se transformó en células competentes de *E. coli* One Shot Top 10DH5 α T1^R (Invitrogen, Breda, Países Bajos) de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Invitrogen). A continuación, las células se colocaron en placas de agar Luria-Bertani (LB) que contenían 50 μ g/ml de ampicilina. Las placas se incubaron durante 16-18 horas a 37°C hasta que se hicieron evidentes las colonias bacterianas. Las colonias se escrutaron mediante PCR de colonias utilizando los cebadores pConG1seq1 y pEE13.4seqrev2 (Tabla 5) y se digirieron con las enzimas de restricción relevantes para escrutar 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 utilizando los cebadores cd38seq1for, pConG1seq1 y pEE13.4seqrev2 para confirmar la presencia de las mutaciones y la ausencia de mutaciones indeseables adicionales.

45 Secuenciación de ADN

Las muestras de ADN plásmido se enviaron a AGOWA (Berlín, Alemania) para el análisis de secuencia. Las secuencias se analizaron utilizando el soporte lógico avanzado Vector NTI (Informax, Oxford, Reino Unido).

50 Expresión transitoria en células HEK-293F

Se obtuvieron células FreestyleTM 293-F (un subclón de HEK-293 adaptado al crecimiento en suspensión y medio Freestyle químicamente definido, (HEK-293F)) de Invitrogen y se transfectaron con pEE13.4HACD38 y con las tres construcciones que portaban las mutaciones T237A, Q272R y S274F, de acuerdo con el protocolo del fabricante utilizando 293fectina (Invitrogen). Se utilizaron sobrenadantes de cultivo de células transfectadas en ELISA para estudios de unión de anti-CD38.

60 Unión de anticuerpos anti-CD38

Las placas de ELISA (Greiner, núm. 655092) se recubrieron con O/N a 4°C con 1 μ g de anticuerpo anti-HA (Sigma, núm. H-9658) y posteriormente se bloquearon con suero de pollo al 2%. Se diluyeron los sobrenadantes de cultivo de células HEK293F transfectadas, se aplicaron a las placas de ELISA y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. Después del lavado, se añadieron diluciones seriadas de HuMab -003 y -005 y se incubaron durante 1

hora a temperatura ambiente. Los anticuerpos unidos se detectaron con anticuerpos IgG antihumana de cabra conjugados con HRP. El ensayo se desarrolló con ABTS (Roche, núm. 1112597) y la absorbancia se midió a 405 nm utilizando un espectrofotómetro.

5 Como se puede ver en las Figuras 23A-23C, tanto -003 como -005 se unen a CD38 humano wt. 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 alberga la mutación T237A (Figura 23A). La unión de -005 a CD38 con la mutación Q272R se vio gravemente afectada (Figura 23B), tanto con respecto a la EC₅₀ como respecto a la capacidad máxima de unión. -005 no pudo unirse al CD38 mutante en el que la serina en la posición 274 se había reemplazado por fenilalanina (Figura 23C).
10

Estos datos muestran 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.
15

Tabla 6 - Cebadores

Nombre	Secuencia
cd38forha	CTGCTGTGGCCCATGGTGTGGGCCTACCCTTACGACGTGC CTGACTACGCCAGGTGGCGCCAGACGTGGAGC
cd38exrev	AGGTCAGGTACCTCAGATCTCAGATGTGCAAG
SPHMM38ex	TATAGCCCGGGCCGCCACCATGTGGTGGCGCCTGTGGTG GCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGGCCCATGGTGTGG GCC
pConG1seq1	GAAGACTTAAGGCAGCGGCAGAA
pConKseq1	GTAGTCTGAGCAGTACTCGTTGC
pEE13.4seqrev	TGCATTCATTTTATGTTTCAGGT
pEE 13.4seqrev2	TCGGACATCTCATGACTTTCTTT
cd38seq1 para	AGGACACGCTGCTAGGCTACCTT
cd38seq2rev	GTCCTTTCTCCAGTCTGGGCAAG
HACD38T237Arev2	TCCACCATGTATCACCCAGGCCTCTAGAGCCTGAACCTTCT CTGGTTG
HACD38T237Afor2	CAACCAGAGAAGGTTTCAGGCTCTAGAGGCCTGGGTGATACA TGGTGA
HACD38Q272Rrev	GATATTCTTGCAGGAAAATCGAATATTCCTTTTGCTTAT
HACD38Q272Rfor	ATAAGCAAAAGGAATATTCGATTTTCCTGCAAGAATATC
HACD38S274Frev	TCTGTAGATATTCTTGCAGAAAAATTGAATGTTCTTTTGCTT ATA
HACD38S274F para	TATAAGCAAAAGGAACATTCAATTTTCTGCAAGAATATCTAC AGA

Ejemplo 18

20

Inducción de la proliferación de PBMC

Se sometieron a prueba -003, -005 y -024 en un ensayo esencialmente como describen Ausiello et al., en Tissue antigens 56, 538-547 (2000). Brevemente, se cultivaron PBMC de donantes sanos a 1x10⁵ células/pocillo en placas de 96 pocillos de fondo plano en presencia de anticuerpos (concentración final: 1,1 - 3,3 - 10 - 30 µg/ml) en 200 µl de
25

RPMI⁺⁺. La estimulación de células con IL-15 (a 333 ng/ml; Amgen Inc., Thousand Oaks, CA, EE.UU.) se utilizó como control positivo. Después de una incubación de 4 días a 37°C, se añadieron 30 µl de ³H-timidina (16,7 µCi/ml) y el cultivo continuó O/N. La incorporación de ³H-timidina se evaluó utilizando un contador gamma Packard Cobra (Packard Instruments, Meriden, DT, EE.UU.), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los datos se muestran como la media de cpm (± ETM) de las PBMC obtenidas de 10 donantes. Los resultados muestran que -003 y -005 no inducen una proliferación significativa de PBMC (Figura 24A). Además, -024 no indujo una proliferación significativa de PBMC (datos no mostrados).

Ejemplo 19

Inducción de IL-6

Se sometieron a prueba -003, -005 y -024 en un ensayo como describen Ausiello et al., en Tissue antigens 56, 538-547 (2000). En resumen, se cultivaron PBMC a 1x10⁶ células/pocillo en placas de 48 pocillos en presencia de 20 µg/ml de anticuerpos y 10 ng/ml de LPS (Sigma-Aldrich Chemie, Zwijndrecht, Países Bajos) en 500 µl de RPMI⁺⁺. Después de una incubación O/N a 37°C, el sobrenadante se recogió y se almacenó a -20°C. La concentración de IL-6 se evaluó mediante ELISA (kit ELISA de IL-6, U-CyTech Biosciences, Utrecht, Países Bajos) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los datos muestran la concentración media en pg/ml (± ETM) de 7 donantes. Los resultados muestran que -003 y -005 no inducen la liberación de niveles significativos de IL-6 (Figura 24B). Además, -024 no indujo la liberación de niveles significativos de IL-6 (datos no mostrados).

Ejemplo 20

Inducción de liberación de IFN-γ

Se sometieron a prueba -003, -005 y -024 en un ensayo como describen Ausiello et al., en Tissue antigens 56, 538-547 (2000). En resumen, se cultivaron PBMC a 1x10⁶ células/pocillo en placas de 48 pocillos en presencia de 20 µg/ml de anticuerpos y 1 µg/ml de OKT-3 (Sanquin, Ámsterdam, Países Bajos) en 500 µl de RPMI⁺⁺. Después de una incubación O/N a 37°C, el sobrenadante se recogió y se almacenó a -20°C. La concentración de IFN-γ se evaluó mediante ELISA (kit ELISA de IFN-γ, U-CyTech Biosciences, Utrecht, Países Bajos) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los datos muestran la concentración media en pg/ml (± ETM) de 9 donantes. Los resultados muestran que -003 y -005 no inducen la liberación de niveles detectables de IFN-γ (Figura 24C). Además, -024 no indujo la liberación de niveles significativos de IFN-γ (datos no mostrados).

Ejemplo 21

Afinidad de unión de -003 y -005 a CD38 recombinante

Se sometió a prueba la unión de -003 y -005 a CD38 utilizando resonancia de plasmón superficial. Brevemente, los anticuerpos purificados se inmovilizaron sobre un chip sensor CM-5 (Biacore, Uppsala, Suecia) a través de un acoplamiento de amina. El CD38 etiquetado con HA (véase Ejemplo 3) se transfirió y la unión del antígeno al mAb se detectó por un cambio en el índice de refracción en la superficie del chip utilizando un Biacore 3000 (Biacore). A continuación se resumen las constantes de asociación y velocidad para -003 (Tabla 7) y -005 (Tabla 8), media de 3 experimentos ± DT, y muestran que tanto -003 como -005 tienen una alta afinidad por CD38.

Tabla 7 - Constantes de asociación y velocidad a 25°C

	-003
k _a (1/Ms)	2,17x10 ⁵ ± 2,65x10 ⁴
K _d (1/s)	1,9x10 ⁻⁴ ± 4,51x10 ⁻⁵
K _A (1/M)	1,14x10 ⁹ ± 1,58x10 ⁸
K _D (M)	8,85x10 ⁻¹⁰ ± 1,2x10 ⁻¹⁰

Tabla 8 - Constantes de asociación y velocidad a 25°C

	-005
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)	$1,7 \times 10^8 \pm 3,68 \times 10^7$
K_D (M)	$6,06 \times 10^{-9} \pm 1,21 \times 10^{-9}$

Ejemplo 22

5 Mapeo de epitópico

Mapeo epitópico utilizando el método PEPSCAN

10 Se acuerdo con los procedimientos 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; Sloodstra 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 lineales de 20 unidades y en bucle de 15 unidades que abarcaban 138 aminoácidos en el extremo C de CD38 humano. Además, basándose en la secuencia en el extremo C, se prepararon péptidos de un solo bucle de diferente tamaño que abarcaban la región KNIYRPDKFLQCCKNPEDSSCTSEI, la región CVHNLQPEKVTLEAWVIHGG, y la región CLESIIKSRNIQAKNIYRC. Además, se diseñaron conjuntos adicionales para reconstruir regiones de doble bucle que estaban compuestas por SKRNIQFSCKNIYR y EKVQTLEAWVIHGG. Las cisteínas nativas fueron reemplazadas por alaninas. Los péptidos se escrutaron en un ensayo ELISA utilizando tarjetas mini-PEPSCAN con formato de tarjeta de crédito.

20 Síntesis de péptidos

Los péptidos se sintetizaron utilizando la química convencional de Fmoc y se desprotegieron utilizando TFA con captadores. 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)mesileno en bicarbonato de amonio (20 mM, pH 7,9), con un suplemento de acetonitrilo (1:1 [volumen/volumen]). Las micromatrices se agitaron suavemente en la solución durante 30-60 minutos, mientras se cubrían completamente con la solución. Finalmente, las micromatrices se lavaron exhaustivamente con un exceso de H₂O Millipore y se sometieron a sonicación en un tampón de ruptura que contenía dodecilsulfato de sodio al 1%, β-mercaptoetanol al 0,1%, en PBS (pH 7,2) a 70°C durante 30 min, seguido de sonicación en H₂O Millipore durante otros 45 min.

30 Ensayo PEPSCAN ELISA

Las tarjetas de polietileno con formato de tarjeta de crédito de 455 pocillos, que contenían los péptidos unidos covalentemente, se incubaron con suero (p. ej., diluido 1:1.000 en solución de bloqueo que contenía suero de caballo al 5% [volumen/volumen] y ovoalbúmina al 5% [peso/volumen]) (4°C, durante la noche). Después del lavado, 35 los péptidos se incubaron con anti-Ig humana de conejo con peroxidasa (dilución 1:1.000, 25°C, 1 hora), y después de lavar se añadió el sustrato de peroxidasa (sulfonato de 2,2'-azino-di-3-etilbenzotiazolina y 2 µl/ml de H₂O₂ al 3%). Después de una hora, el desarrollo del color se midió con una cámara CCD y un sistema de procesamiento de imágenes. La configuración consiste en una cámara CCD con una lente de 55 mm (cámara de video Sony CCD XC-77RR, Micro-nikkor Nikon 55 mm f/lente 2.8), un adaptador de cámara (Adaptador de Cámara Sony DC-77RR) y el Paquete de Soporte Lógico de Procesamiento de Imágenes Optimas, versión 6.5 (Media Cybernetics, Silver Spring, MD 20910, EE.UU.); Optimas se ejecuta en un sistema informático Pentium II).

Método para la representación de epitopos.

45 Los aminoácidos individuales se identificaron por medio de los motivos dipeptídicos que representan las unidades únicas más pequeñas en la secuencia de aminoácidos de CD38 humano. A todos los motivos dipeptídicos presentes en cada uno de los 1.164 péptidos analizados se les otorgó el valor ELISA obtenido para el péptido completo respectivo. Para clasificar los motivos dipeptídicos desde unión fuerte hasta unión pobre, se calculó una señal relativa dividiendo el valor ELISA obtenido para cada motivo individual por el valor ELISA promedio de los 1.164 péptidos lineales y en bucle analizados, y estos se clasificaron por valores decrecientes. De esta manera, se consideraron las contribuciones de aminoácidos a los epitopos conformacionales. Para cada uno de los mAb analizados, todos los motivos dipeptídicos con una puntuación superior a 2,5 (es decir, los valores ELISA de los péptidos que contenían estos motivos fueron al menos 2,5 veces el valor ELISA promedio de los obtenidos con los 1.164 péptidos). Los datos se desconvolucionaron en contribuciones de aminoácidos individuales representadas en la secuencia de CD38 lineal mediante un sistema de puntuación. Al caminar a lo largo de la secuencia de CD38 lineal y al usar las unidades dipeptídicas únicas como punto de referencia, se otorgó un punto cada vez que estaba

presente un aminoácido de CD38 en este conjunto de péptidos de alta puntuación.

Se encontró que -003, 005 y -024 se unían a las regiones SKRNIQFSCKNIIYR y EKVQTLEAWVIHGG de CD38 humano.

5 -003 reconocía especialmente los motivos RNIQF y WVIH, -005 reconocía especialmente los motivos KRN y VQTL.

Ejemplo 23

Actividad enzimática

10 La actividad enzimática de CD38 humano se midió en un ensayo esencialmente como describen Graeff et al. en J. Biol. Chem. 269, 30260-30267 (1994). Brevemente, se incubó el sustrato NGD⁺ (80 µM) con CD38 (0,6 µg/ml de dominio extracelular etiquetado con His de CD38 humano, véase el Ejemplo 3 con respecto a la purificación de His-CD38) en un tampón que contenía Tris-HCl 20 mM, pH 7,0. La producción de cGDPR se puede controlar
15 espectrofotométricamente a la longitud de onda de emisión de 410 nm (excitación a 300 nm). En este ejemplo se utilizó un filtro de excitación de 340 ± 60 nm y un filtro de emisión de 430 ± 8 nm.

Para someter a prueba el efecto de -003, -005 y -024 sobre la actividad enzimática de CD38, la proteína His-CD38 recombinante se preincubó durante 15 minutos a temperatura ambiente con varias concentraciones (30, 3, 0,3 y 0,03 µg/ml) de los diferentes anticuerpos antes de añadir el sustrato NGD⁺. La producción de GDP-ribosa cíclica (cGDPR) se registró en diferentes puntos de tiempo después de la adición de anticuerpos (3, 6, 9, 12, 30, 45, 60, 75 y 90 min).

25 La Fig. 25B muestra que -005 tiene un efecto inhibitor pronunciado sobre la producción de cGDPR. Después de 90 minutos, la adición de 30 y 3 µg/ml de -005 dio como resultado una reducción de la producción de 32% y 34% de cGDPR (Tabla 9). Se observaron resultados similares en experimentos independientes utilizando diferentes lotes de -005.

30 No se observó ningún efecto inhibitor sobre la producción de cGPDR después de la adición de -003 (Figura 25B, Tabla 9), -024 (Figura 25D, Tabla 9) o anti-KLH (Figura 25A, Tabla 9).

35 Basándose en estos hallazgos, se espera que -005 inhiba la síntesis de ADP-ribosa cíclica (cADPR) a partir de NAD⁺. La inhibición de la síntesis de cADPR se puede determinar de acuerdo con el método de HPLC descrito por Munshi et al., J. Biol. Chem. 275, 21566-21571 (2000).

Tabla 9. Producción de cGDPRibosa en presencia de anticuerpos específicos de 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

Ejemplo 24

40 Comparación de -003 y -005 con el anticuerpo 3079 de Morphosys
Los anticuerpos -003 y -005 se compararon funcionalmente con el anticuerpo 3079 de Morphosys (TH-3079). Los métodos para la clonación y expresión del anticuerpo de 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
45 Figura 26A muestra que -005 y -003 y TH-3079 inducen la lisis mediada por CDC de células CHO transfectadas con CD38, con una lisis máxima similar. Cuando se comparan los valores de CE₅₀, el anticuerpo -005 es mejor que el TH3079 para inducir la lisis de las células CHO-CD38, con una CE₅₀ 2 veces menor (véase la Tabla 10).

La Figura 26B muestra que -005 es superior a TH-3079 en la inducción de la lisis mediada por CDC de células de Daudi-luciferasa, con una lisis máxima por -005 2-3 veces mayor que por TH3079. Cuando se comparan los valores de CE₅₀, el anticuerpo -005 es similar al TH-3079 en la inducción de la lisis de células de Daudi-luciferasa (véase la
50 Tabla 10). -003 no induce una lisis significativa mediada por CDC de células de Daudi-luciferasa.

La Figura 26C muestra que en este experimento -005, -003 y TH-3079 median la lisis de las células diana de Daudi a través de ADCC. No se encontraron diferencias en el (log) de CE₅₀ y la lisis máxima (Tabla 11, n = 5).

Tabla 10. Valores de lisis máxima y CE50 de anticuerpos específicos para CD38 en CDC

	Células CHO-CD38 (n = 2)		Células Daudi-Luc (n = 2)	
	CE50 µg/ml	% Lisis Max	CE50 µg/ml	% Lisis Max
-005	0,15 ± 0,007	76,5 ± 3,54	0,39 ± 0,00	70,5 ± 7,78
TH-3079	0,31 ± 0,021	81,5 ± 7,78	0,34 ± 0,26	25,5 ± 12,02
-003	4,5 ± 0,933	62,0 ± 16,79	nc	12 ± 8,49

Tabla 11. Valores de lisis máxima y CE₅₀ de anticuerpos específicos para CD38 en ADCC

	Log CE50	STD log CE50	Lisis máxima (%)	STD máx. lisis
-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 **Ejemplo 25**

Inhibición de la actividad enzimática de CD38 expresado celular

10 La actividad enzimática de CD38 humana expresada en células se midió en un ensayo esencialmente como describen Graeff et al., en J. Biol. Chem. 269, 30260-30267 (1994). Brevemente, el sustrato NGD (80 µM) se incubó con 10⁵ células CHO transfectadas con CD38 humano (células CHO-CD38) en un tampón que contenía Tris-HCl 20 mM, pH 7,0 con un suplemento de 30 µg/ml de IgG1. La producción de cGDPR se puede controlar espectrofotométricamente a la longitud de onda de emisión de 410 nm (excitación a 300 nm). En este ejemplo se utilizó un filtro de excitación de 340 ± 60 nm y un filtro de emisión de 430 ± 8 nm.

15 Para someter a prueba el efecto de -005 y -003 sobre la actividad enzimática de CD38 expresado celular, las células CHO-CD38 se preincubaron durante 15' 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. La producción de cGDPR se registró en diferentes puntos de tiempo después de la adición de sustrato NGD (3, 6, 9, 12, 30, 45, 60, 112 y 156 min).

20 Después de 156 minutos, la adición de 30 y 3 µg/ml de -005 dio como resultado una reducción de la producción de cGDPR de 21% y 18%. No se observó ningún efecto inhibitor sobre la producción de cGDPR después de la adición del anticuerpo -003 o de control IgG1 (Tabla 12).

25 **Tabla 12. Producción de cGDPRibosa en presencia de anticuerpos específicos para CD38 o control de IgG1**

	Producción (% de control de NGD)			
	30 µg/ml	3 µg/ml	0,3 µg/ml	0,03 µg/ml
Control de IgG1	104	105	103	104
-003	107	106	107	105
-005	79	82	100	104

Ejemplo 26

Unión del anticuerpo -005 a células B de chimpancé transformadas con EBV

30 Después de la recogida y el recuento, las células B del chimpancé transformadas con EBV (recibidas del Biomedical Primate Research Centre, Departamento de Inmunobiología, Rijswijk, Países Bajos) se resuspendieron (1 x 10⁶ células/ml) en PBS-BSA (PBS con un suplemento de BSA al 0,1% y azida de Na al 0,02%). A continuación, las células se colocaron en placas de fondo en V de 96 pocillos (100 µl/pocillo) y se lavaron dos veces en PBS-BSA.

35 Después de eso, se añadieron 50 µl de solución de anticuerpo -005 marcado con FITC en PBS-BSA a las células (4°C, 30 min). Las células se lavaron tres veces y se detectó la unión específica de -005 a las células B de chimpancé transformadas con EBV mediante citometría de flujo. Se utilizó HuMab-KLH marcado con FITC (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 otra parte en la presente memoria)

40 como control. La Figura 27 muestra la unión dependiente de la dosis de -005 a células B de chimpancé transformadas con EBV. No se observó unión dependiente de la dosis a las células B de chimpancé transformadas

con EBV con el anticuerpo de control HuMab-KLH.

Ejemplo 27

5 Terapia combinada *in vitro* del anticuerpo -005 con dexametasona y bortezomib

El anticuerpo -005 se sometió a prueba para determinar su capacidad para inducir la muerte celular de la línea celular de mieloma múltiple UM6 *in vitro* en una configuración de combinación triple con Dexametasona (Dex) y Bortezomib (Bor; Velcade®). El resultado del tratamiento triple se comparó con los tratamientos de un solo fármaco y los tratamientos de combo doble.

10 Se incubaron 3 x 10⁵ células UM6 durante la noche a 37°C con medio solo, con Dex (20 µM), con Bor (15 pM) o con la combinación de Bor y Dex. Después de 23 horas, se añadió -005 (10 µg/ml), y 15 minutos después, se añadió suero humano normal y las muestras se incubaron durante otros 45 minutos a 37°C. Finalmente, se añadieron 10 µl de yoduro de propidio (PI; Sigma-Aldrich Chemie BV; 10 µg/ml) y se detectó la lisis celular mediante citometría de flujo utilizando un FACS Calibur™ (Becton Dickinson) mediante la medición del porcentaje de células positivas para PI.

20 Como se puede observar en la Figura 28, el tratamiento triple superó la lisis observada con cualquiera de los tratamientos de combinación simple o doble. Este efecto fue observado en dos experimentos independientes.

Ejemplo 28

Los pacientes con un diagnóstico clínico de mieloma múltiple se tratan con una combinación de anticuerpo anti-CD38 -005, melfalán y prednisona.

25 Los compuestos se administran a los pacientes de acuerdo con el siguiente esquema de dosificación:

- anticuerpo -005:	8 mg/kg administrados una vez a la semana durante 4 semanas (IV)
- melfalán	0,2 mg/kg por día IV durante 4 días cada 4-6 semanas
- prednisona:	2 mg/kg PO durante 4 días cada 4-6 semanas

30 La respuesta se determina por la disminución de la proteína M en el suero, la disminución del número de células plasmáticas en la médula ósea y la disminución de la proteína Benze-Jones en la orina y la reducción/ausencia de nuevas lesiones óseas osteolíticas.

Ejemplo 29

35 Los pacientes con diagnóstico clínico de mieloma múltiple se tratan con una combinación de anticuerpo anti-CD38 -005, talidomida y dexametasona.

Los compuestos se administran a los pacientes de acuerdo con el siguiente esquema de dosificación:

- anticuerpo -005:	8 mg/kg administrados una vez a la semana durante 4 semanas (IV)
- talidomida	200 mg/día (PO)
- dexametasona:	40 mg/día los días 1-4, 9-12 y 17-20 de cada ciclo de 28 días (PO)

40 La respuesta se determina por la disminución de la proteína M en el suero, la disminución del número de células plasmáticas en la médula ósea y la disminución de la proteína Benze-Jones en la orina y la reducción/ausencia de nuevas lesiones óseas osteolíticas.

Ejemplo 30

45 Los pacientes con un diagnóstico clínico de mieloma múltiple se tratan con una combinación de anticuerpo anti-CD38 -005, lenalidomida y dexametasona.

Los compuestos se administran a los pacientes de acuerdo con el siguiente esquema de dosificación:

- anticuerpo -005:	8 mg/kg administrados una vez a la semana durante 4 semanas (IV)
- lenalidomida:	25 mg/día (PO)
- dexametasona:	40 mg/día los días 1-4, 9-12 y 17-20 de cada ciclo de 28 días (PO)

La respuesta se determina por la disminución de la proteína M en el suero, la disminución del número de células plasmáticas en la médula ósea y la disminución de la proteína Benze-Jones en la orina y la reducción/ausencia de nuevas lesiones óseas osteolíticas.

5 **Ejemplo 31**

Los pacientes con un diagnóstico clínico de mieloma múltiple se tratan con una combinación de anticuerpo anti-CD38 -005, bortezomib y dexametasona.

10 Los compuestos se administran a los pacientes de acuerdo con el siguiente esquema de dosificación:

- anticuerpo -005:	8 mg/kg administrados una vez a la semana durante 4 semanas (IV)
- bortezomib	1,3 mg/m ² los días 1, 4, 6 y 11, cada ciclo de 21 días (IV).
- dexametasona:	40 mg/día los días 1-4, 9-12 y 17-20 de cada ciclo de 28 días (PO)

La respuesta se determina por la disminución de la proteína M en el suero, la disminución del número de células plasmáticas en la médula ósea y la disminución de la proteína Benze-Jones en la orina y la reducción/ausencia de nuevas lesiones óseas osteolíticas.

15

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo de isotipo IgG1 humano que se une a CD38 para su uso en el tratamiento del cáncer, en donde el anticuerpo es para su administración, o para ser administrado, en terapia combinada con al menos un corticosteroide, en donde dicho al menos un corticosteroide comprende un glucocorticoide, y al menos un agente quimioterapéutico no corticosteroideo, en donde dicho al menos un agente quimioterapéutico no corticosteroideo comprende (i) talidomida o un análogo de talidomida y/o (ii) un inhibidor de proteasoma, y en donde dicho anticuerpo comprende 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 expuesta en SEQ ID NO: 13, una CDR2 de VL que tiene la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 14 y una CDR3 de VL que tiene la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 15, y la región variable de la cadena pesada comprende una CDR1 de VH que tiene la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 18, una CDR2 de VH que tiene la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 19 y una CDR3 de VH que tiene la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 20.
2. Un anticuerpo para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde a dicho tratamiento le sigue un trasplante autólogo de células madre periféricas o de médula ósea.
3. El anticuerpo para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde dicho al menos un agente quimioterapéutico no corticosteroideo comprende adicionalmente un agente citotóxico y/o un inhibidor de la angiogénesis.
4. El anticuerpo para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicho al menos un agente quimioterapéutico no corticosteroideo comprende además un agente alquilante.
5. El anticuerpo para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicho al menos un agente quimioterapéutico no corticosteroideo comprende adicionalmente uno o más agentes seleccionados del grupo que consiste en: melfalán, mecloretamina, tioepa, clorambucilo, carmustina, lomustina, ciclofosfamida, busulfán, dibromomanitol, estreptoizotocina, dacarbazina, procarbazona, mitomicina C, cisplatino y otros derivados de platino.
6. El anticuerpo para su uso de acuerdo con la reivindicación 5, en donde el derivado de platino es carboplatino.
7. El anticuerpo para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicho al menos un agente quimioterapéutico no corticosteroideo comprende un análogo de talidomida que es lenalidomida o CC4047.
8. El anticuerpo su para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicho al menos un agente quimioterapéutico no corticosteroideo comprende un inhibidor de proteasoma que es bortezomib.
9. El anticuerpo para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicho al menos un agente quimioterapéutico no corticosteroideo comprende adicionalmente un alcaloide de vinca.
10. El anticuerpo para su uso de acuerdo con la reivindicación 9, en donde dicho alcaloide de vinca es vincristina.
11. El anticuerpo para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicho al menos un agente quimioterapéutico no corticosteroideo comprende adicionalmente una antraciclina.
12. El anticuerpo para su uso de acuerdo con la reivindicación 11, en donde dicha antraciclina es doxorubicina.
13. El anticuerpo para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicho al menos un corticosteroide comprende prednisona.
14. El anticuerpo para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde:
- (a) dicho al menos un corticosteroide comprende prednisona y dicho al menos un agente quimioterapéutico no corticosteroideo comprende talidomida;
 - (b) dicho al menos un corticosteroide comprende prednisona y dicho al menos un agente quimioterapéutico no corticosteroideo comprende bortezomib; o
 - (c) dicho al menos un corticosteroide comprende prednisona y dicho al menos un agente quimioterapéutico no corticosteroideo comprende bortezomib y adicionalmente comprende melfalán.
15. El anticuerpo para su uso con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicho al menos un corticosteroide comprende prednisona y dicho al menos un agente quimioterapéutico no corticosteroideo comprende melfalán y talidomida.

16. El anticuerpo para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicho al menos un corticosteroide comprende dexametasona.
17. El anticuerpo para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde:
- (a) dicho al menos un corticosteroide comprende dexametasona y dicho al menos un agente quimioterapéutico no corticosteroideo comprende talidomida y/o lenalidomida;
 - (b) dicho al menos un corticosteroide comprende dexametasona y dicho al menos un agente quimioterapéutico no corticosteroideo CC4047;
 - (c) dicho al menos un corticosteroide comprende dexametasona y dicho al menos un agente quimioterapéutico no corticosteroideo comprende bortezomib
 - (d) dicho al menos un corticosteroide comprende dexametasona y dicho al menos un agente quimioterapéutico no corticosteroideo comprende lenalidomida y adicionalmente comprende bortezomib; o
 - (e) dicho al menos un corticosteroide comprende dexametasona y dicho al menos un agente quimioterapéutico no corticosteroideo comprende talidomida y adicionalmente comprende bortezomib.
18. El anticuerpo para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicho anticuerpo es un anticuerpo que comprende una región V_L que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 12 y una región V_H que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 17.
19. El anticuerpo para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicho cáncer es mieloma múltiple o leucemia linfocítica crónica.
20. El anticuerpo para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicho cáncer es recurrente o refractario.
21. El anticuerpo para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicho individuo no ha sido sometido a un tratamiento previo contra el cáncer para el mismo cáncer.
22. El anticuerpo para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicho individuo no ha respondido a un tratamiento anterior contra el cáncer para el mismo cáncer.
23. El anticuerpo para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el anticuerpo, al menos un corticosteroide y al menos un agente quimioterapéutico no corticosteroideo se administran todos por separado.
24. El anticuerpo para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde:
- (a) dicho al menos un corticosteroide comprende dexametasona, dicho al menos un agente quimioterapéutico no corticosteroideo comprende bortezomib y el anticuerpo comprende una región V_L que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 12 y una región V_H que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 17;
 - (b) dicho al menos un corticosteroide comprende dexametasona, dicho al menos un agente quimioterapéutico no corticosteroideo comprende lenalidomida y el anticuerpo comprende una región V_L que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 12 y una región V_H que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 17;
 - (c) dicho al menos un corticosteroide comprende dexametasona, dicho al menos un agente quimioterapéutico no corticosteroideo comprende lenalidomida y adicionalmente comprende bortezomib y el anticuerpo comprende una región V_L que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 12 y una región V_H que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 17;
 - (d) dicho al menos un corticosteroide comprende dexametasona, dicho al menos un agente quimioterapéutico no corticosteroideo comprende talidomida y adicionalmente comprende bortezomib y el anticuerpo comprende una región V_L que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 12 y una V_H región que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 17;
 - (e) dicho al menos un corticosteroide comprende dexametasona, dicho al menos un agente quimioterapéutico no corticosteroideo comprende CC4047 y el anticuerpo comprende una región V_L que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 12 y una región V_H que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 17; o
 - (f) dicho al menos un corticosteroide comprende prednisona, dicho al menos un quimioterapéutico no corticosteroideo comprende bortezomib y adicionalmente comprende melfalán y el anticuerpo comprende una región V_L que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 12 y una región V_H que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 17.
25. El uso de un anticuerpo de isotipo IgG1 humano que se une a CD38 en la fabricación de un medicamento para el tratamiento del cáncer, en donde el medicamento es para su administración, o para ser administrado, en terapia combinada con al menos un corticosteroide, en donde dicho al menos un corticosteroide comprende un

- 5 glucocorticoide y al menos un agente quimioterapéutico no corticosteroideo, en donde dicho al menos un agente quimioterapéutico no corticosteroideo comprende (i) talidomida o un análogo de talidomida y/o (ii) un inhibidor de proteasoma, y en donde dicho anticuerpo comprende 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 expuesta en SEQ ID NO: 13, una CDR2 de V_L que tiene la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 14 y una CDR3 de V_L que tiene la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 15, y la región variable de la cadena pesada comprende una CDR1 de V_H que tiene la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 18, una CDR2 de V_H que tiene la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 19 y una CDR3 de V_H con la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 20.

FIGURA 1

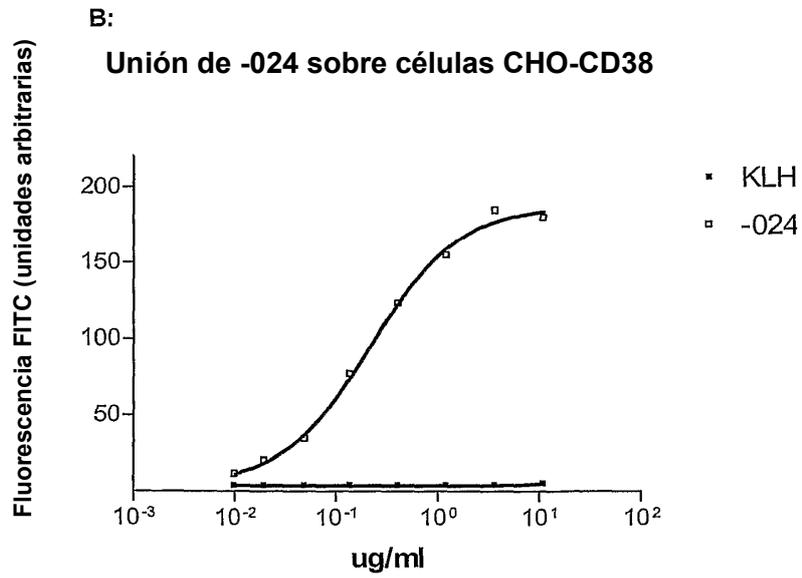
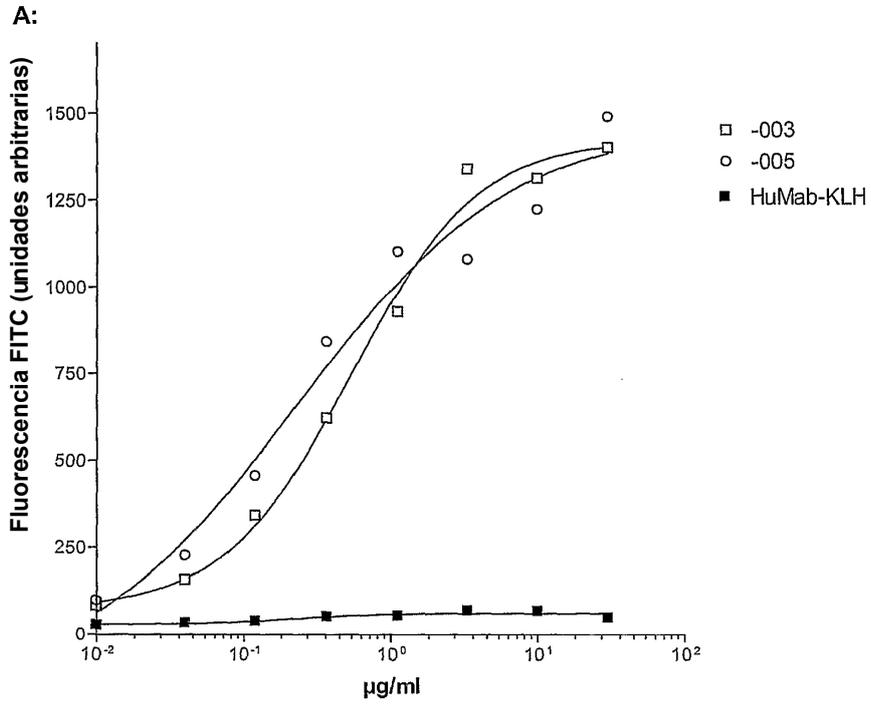
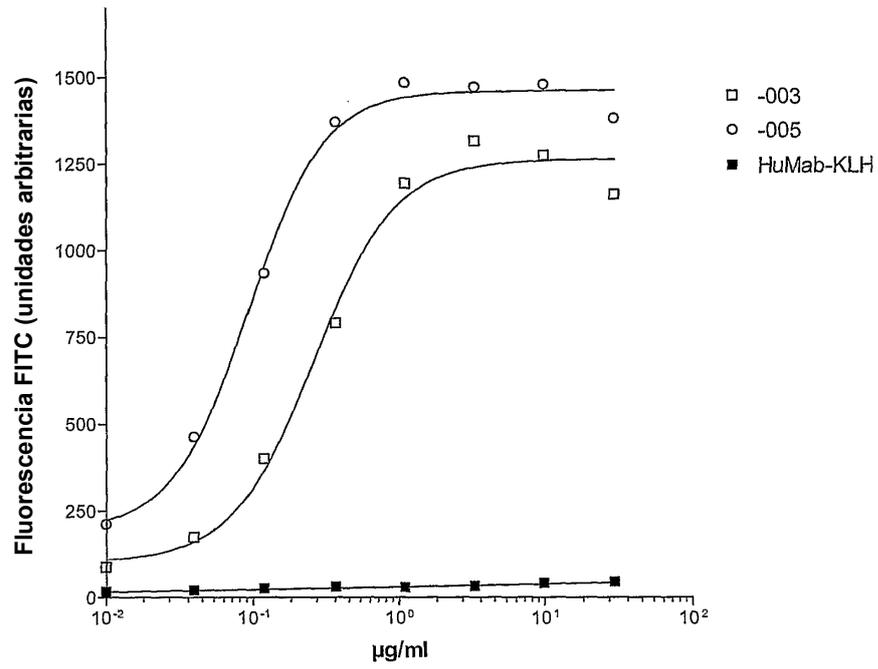


FIGURA 2

A:



B:

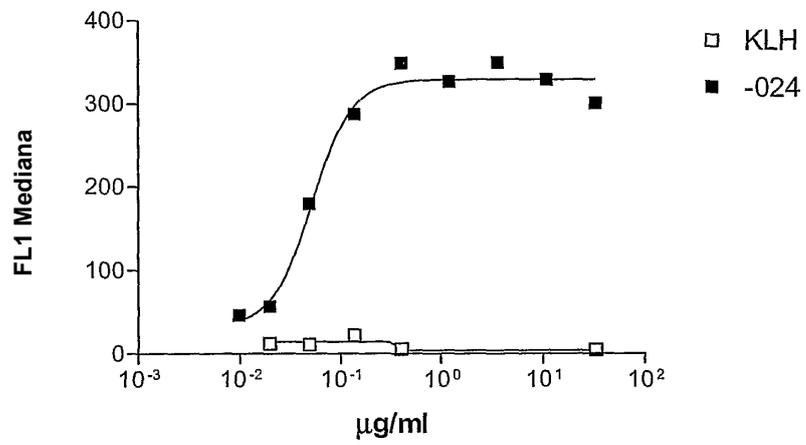


FIGURA 3

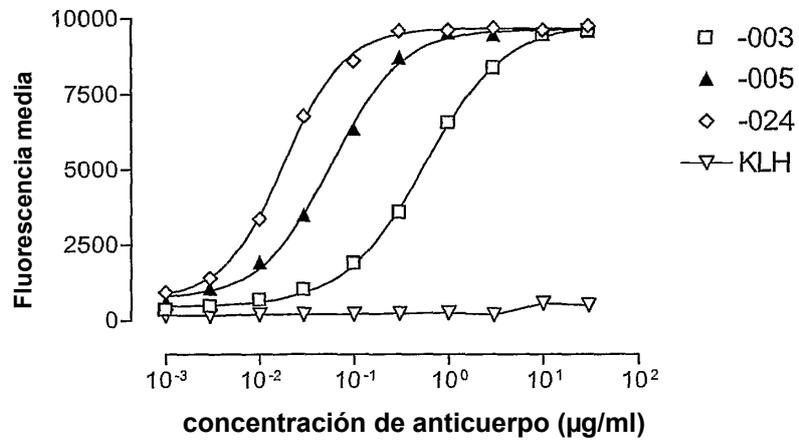
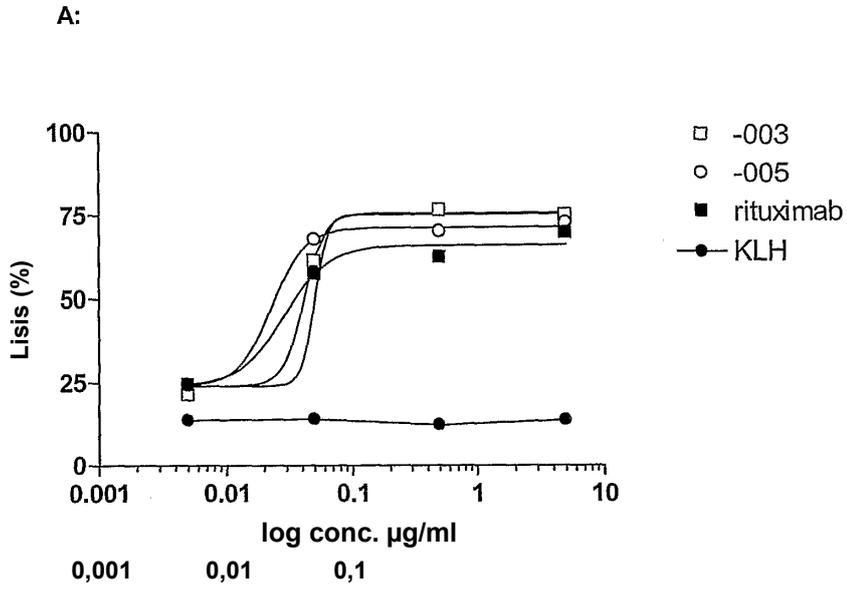


FIGURA 4



B: ADCC sobre células de Daudi

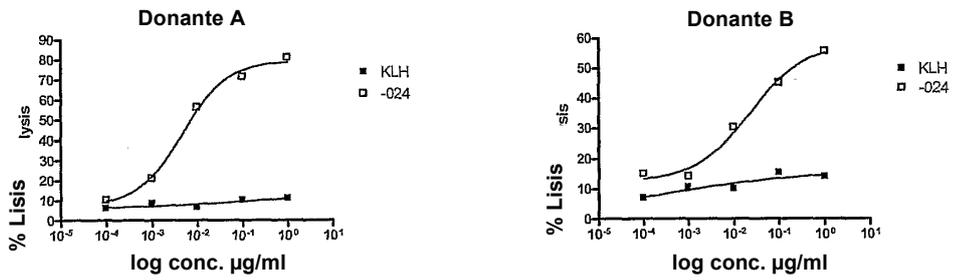
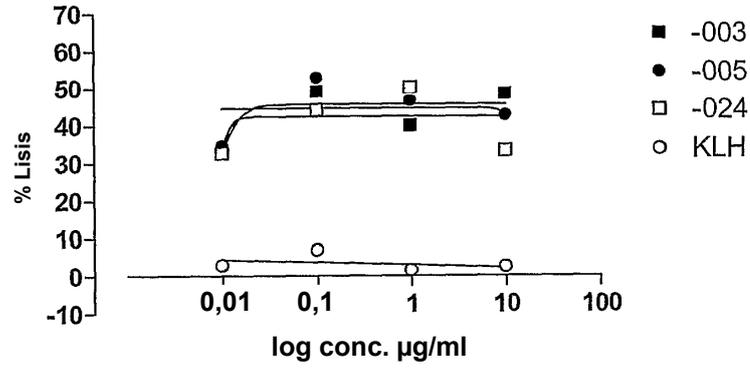


FIGURA 5

A:



B:

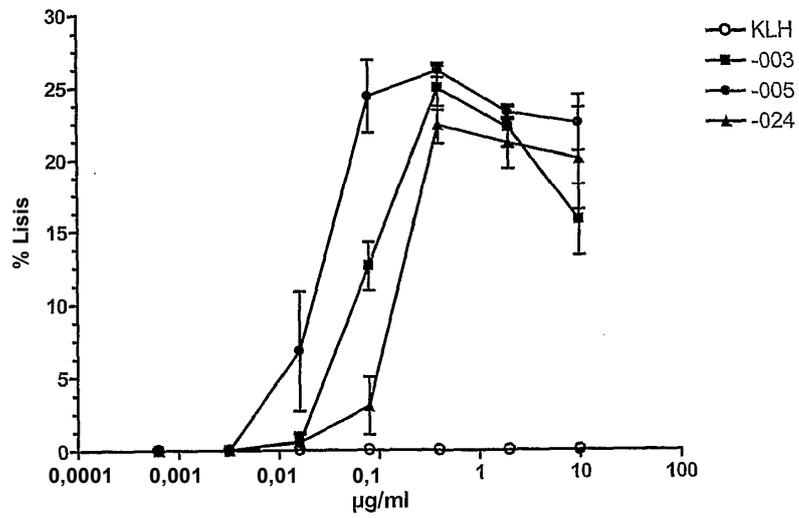


FIGURA 6

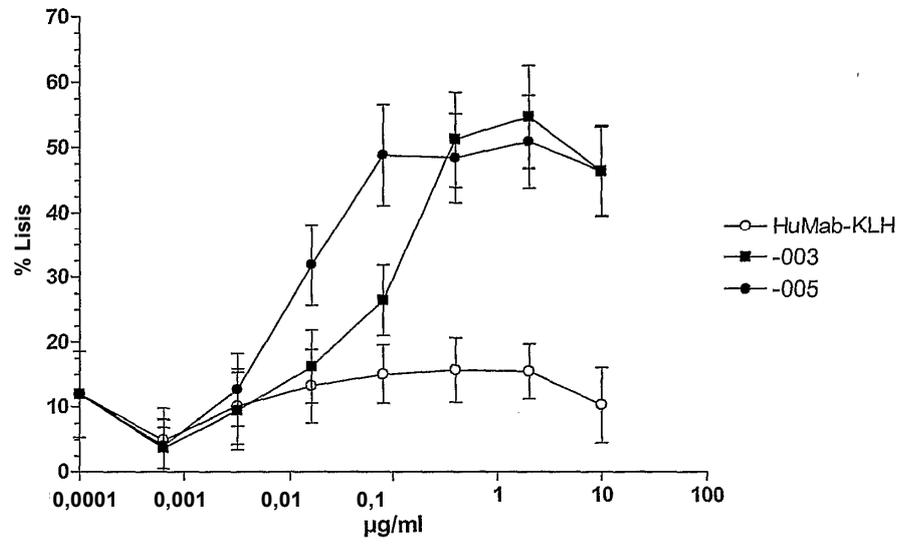


FIGURA 7

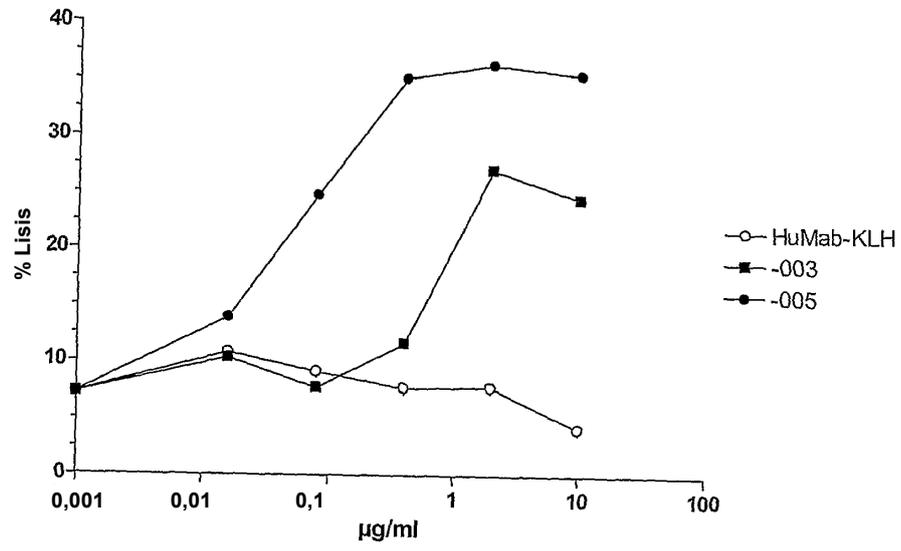


FIGURA 8

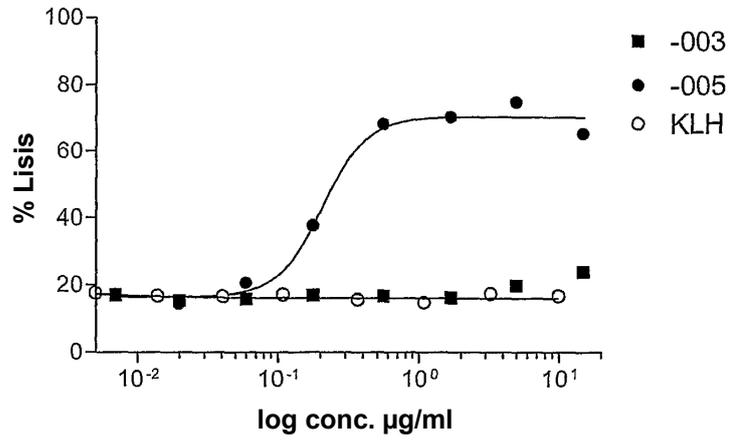
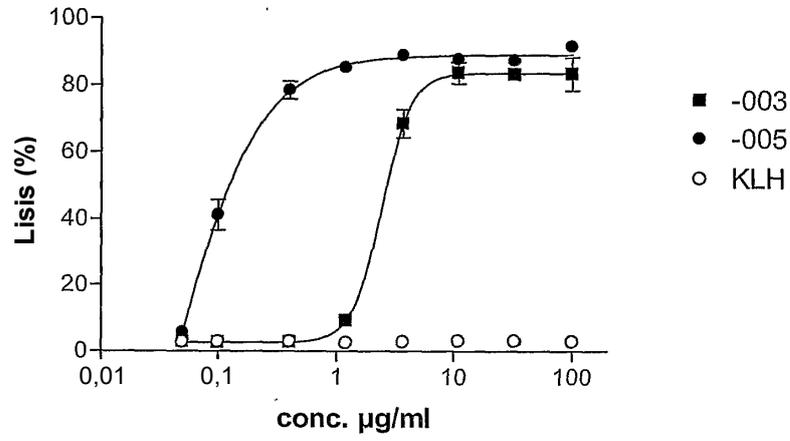


FIGURA 9

A:



B:

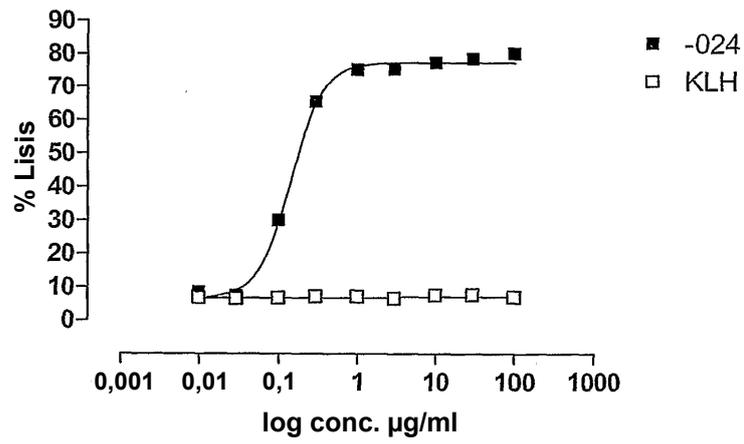
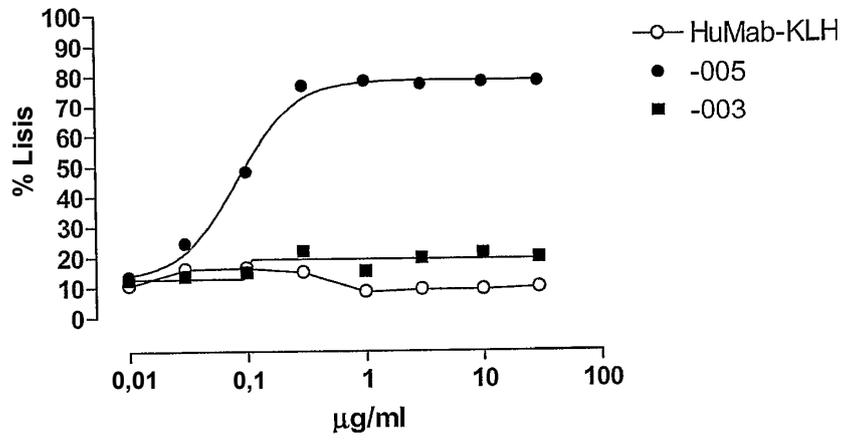


FIGURA 10 (1/3)

A:



B:

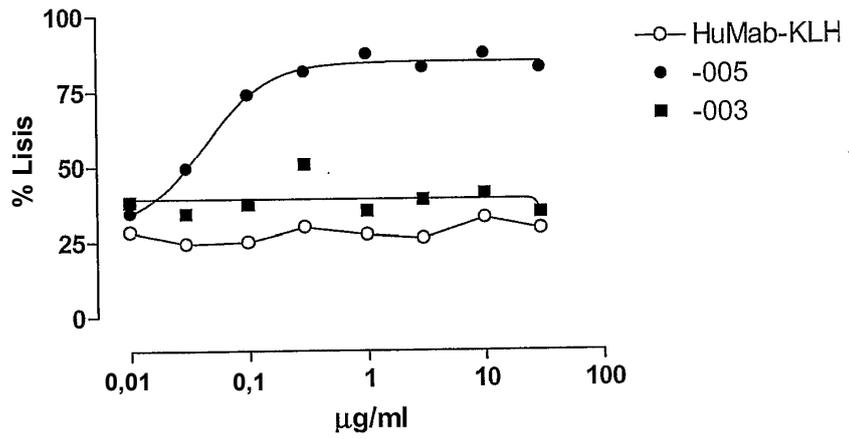
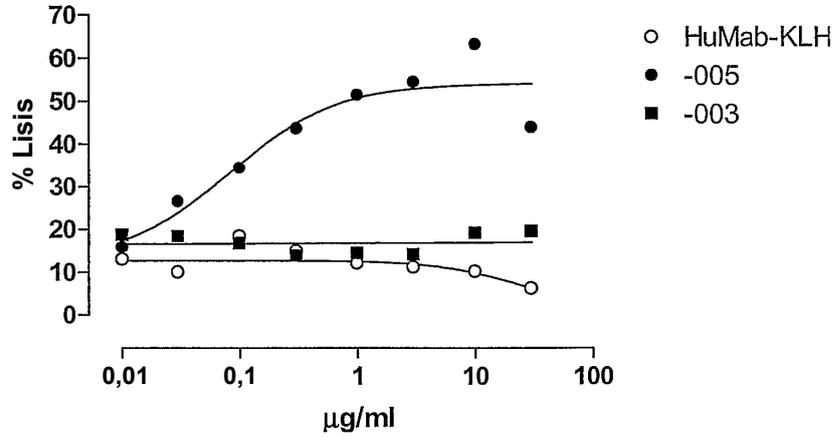


FIGURA 10 (2/3)

C:



D:

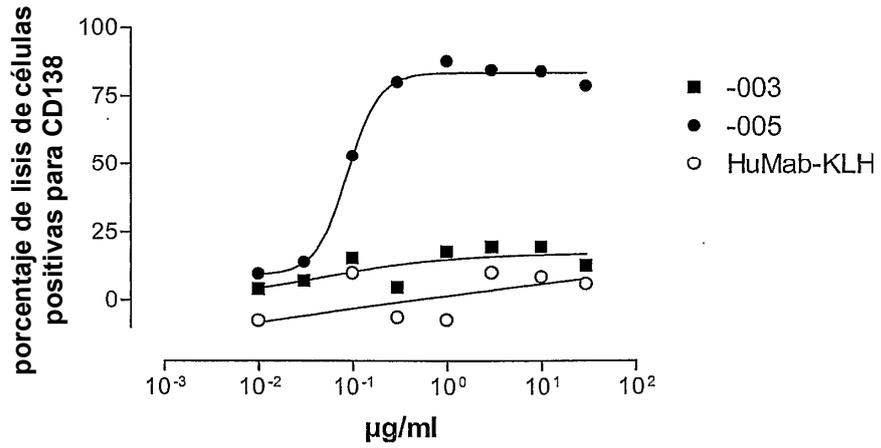
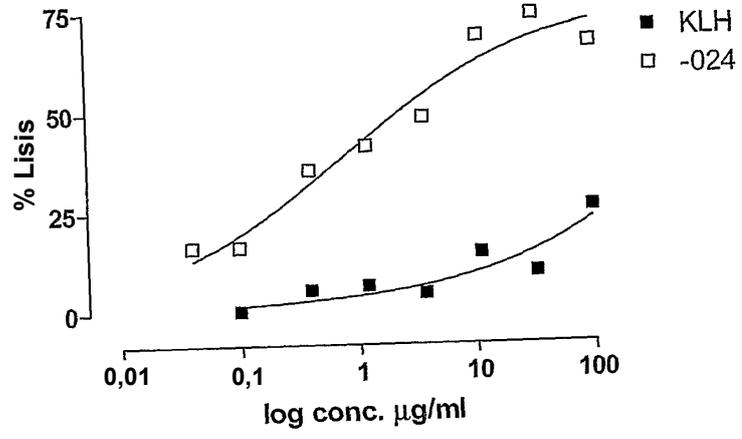


FIGURA 10 (3/3)

E:



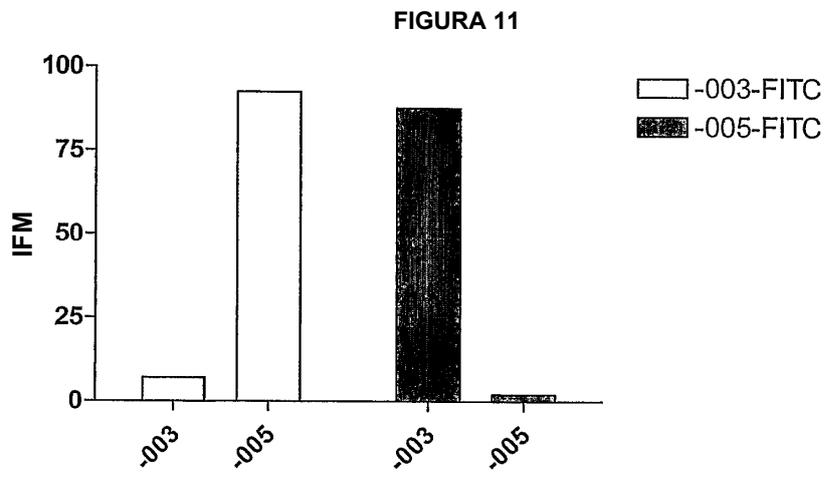


FIGURA 12

FIGURA 12A

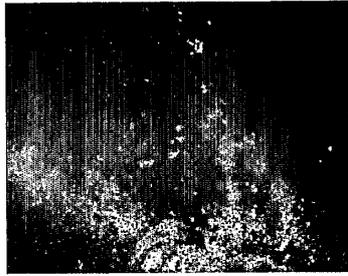


FIGURA 12B

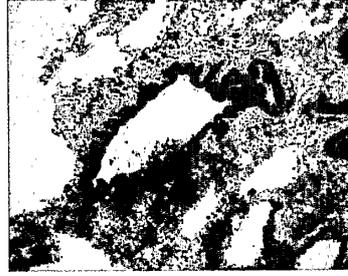


FIGURA 12C

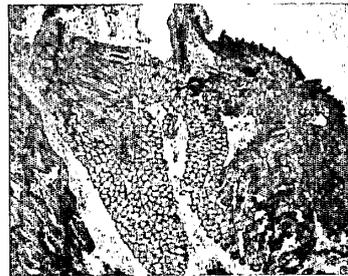


FIGURA 12D

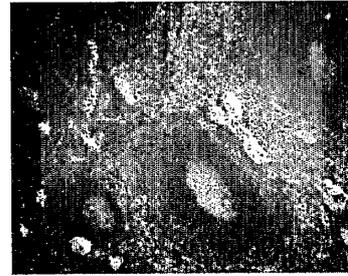


FIGURA 13

FIGURA 13A

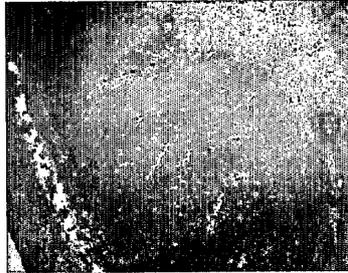


FIGURA 13B

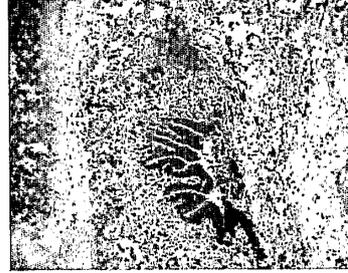


FIGURA 13C



FIGURA 13D

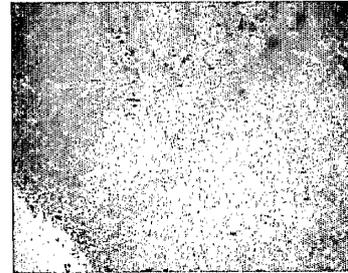
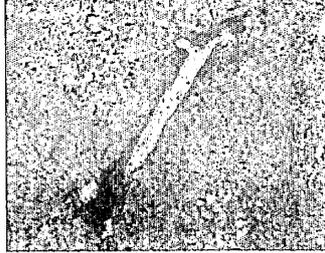


FIGURA 14

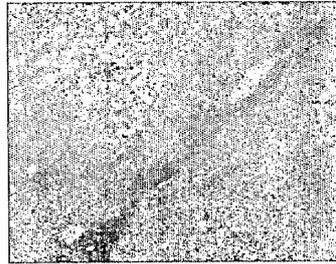
14A



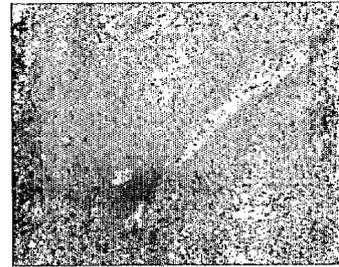
14B



14C



14D



14E

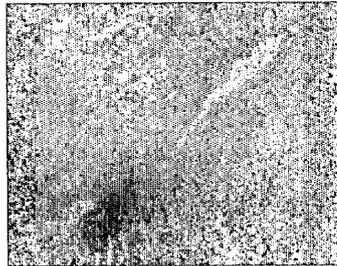


FIGURA 15 (1/2)

FIGURA 15A

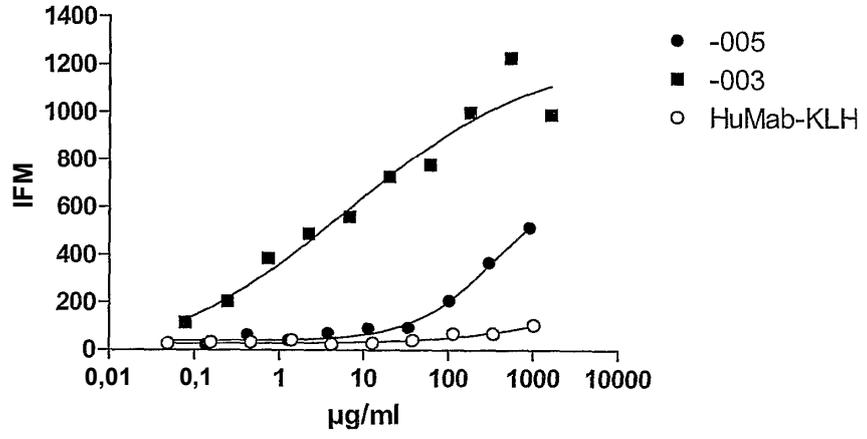


FIGURA 15B

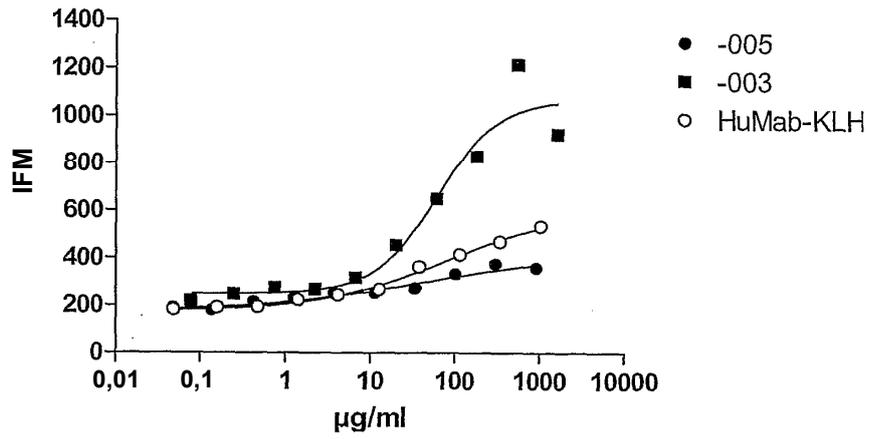


FIGURA 15 (2/2)

FIGURA 15C

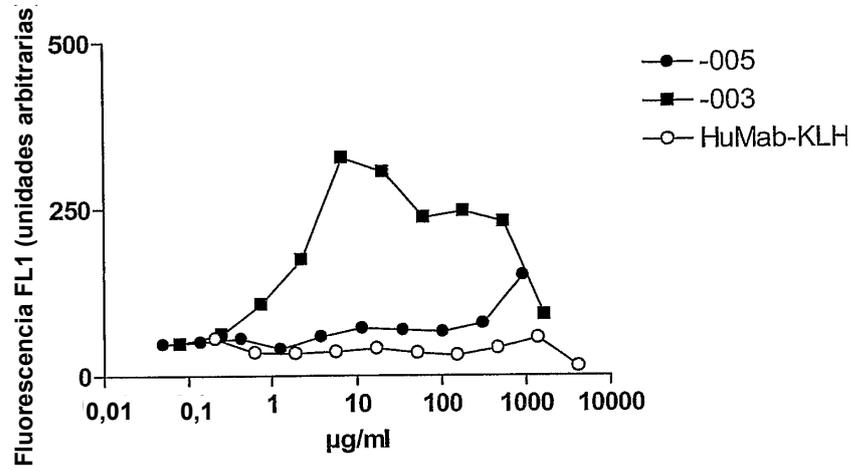


FIGURA 16

FIGURA 16A

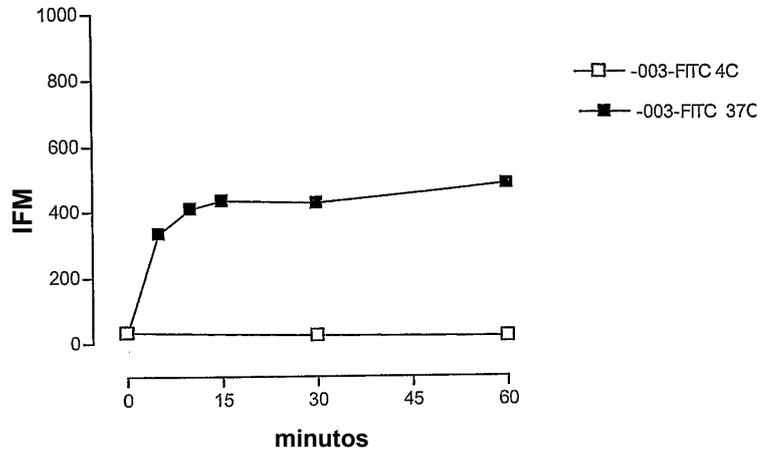


FIGURA 16B

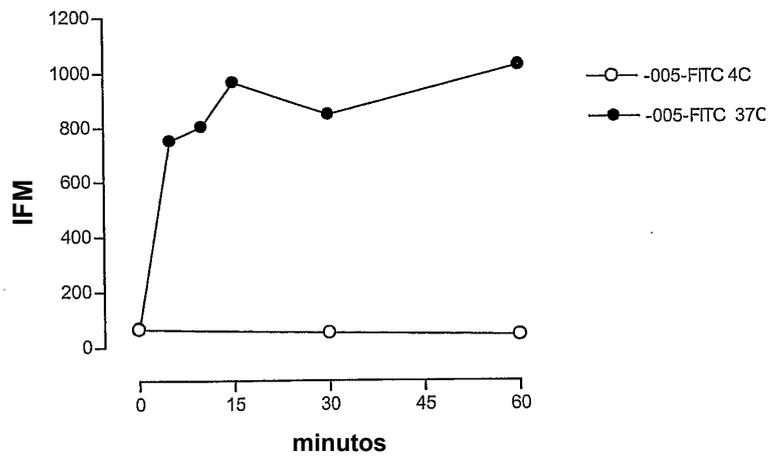


FIGURA 17 (1/2)

FIGURA 17A

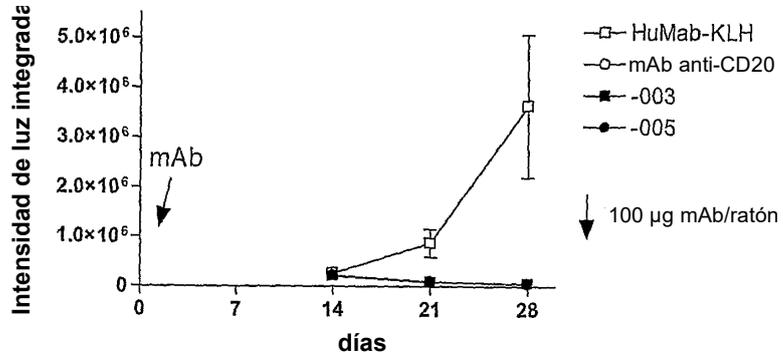


FIGURA 17B

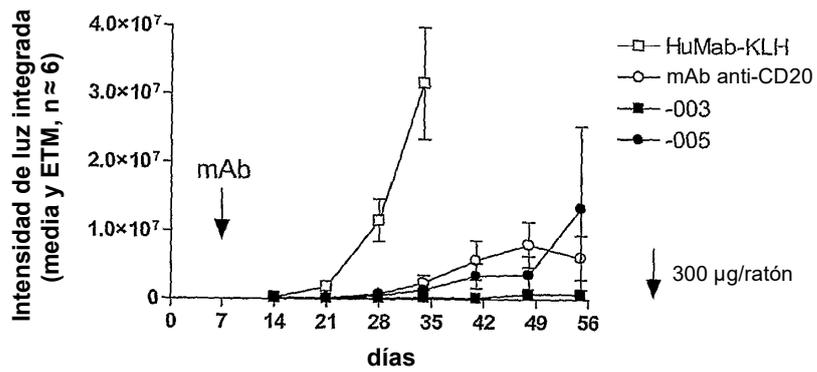


FIGURA 17 (2/2)

FIGURA 17C

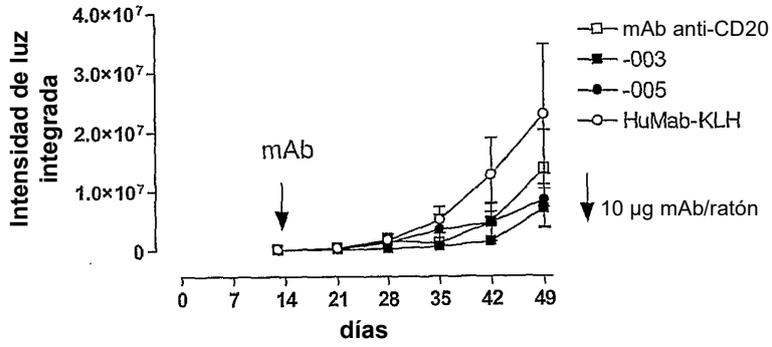


FIGURA 17D

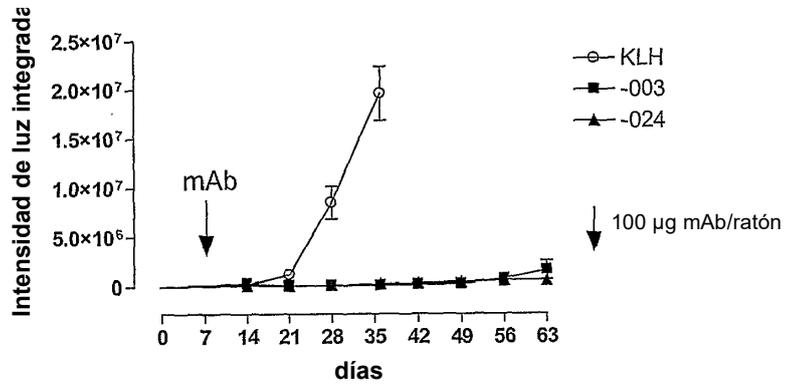
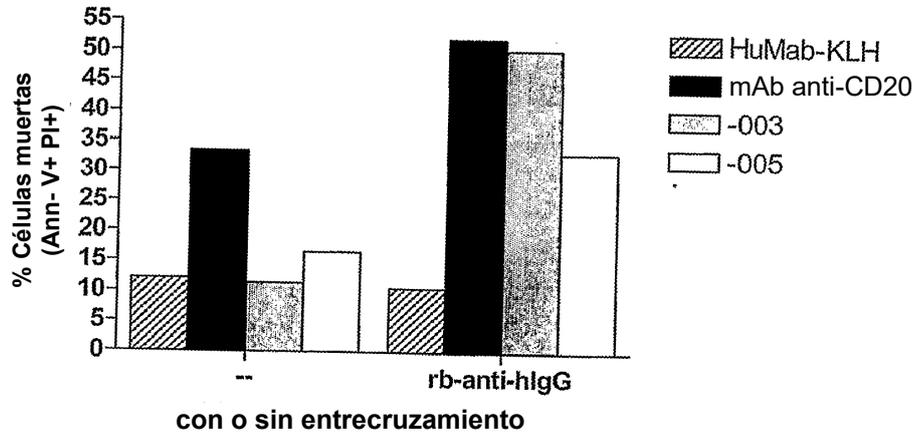


FIGURA 18



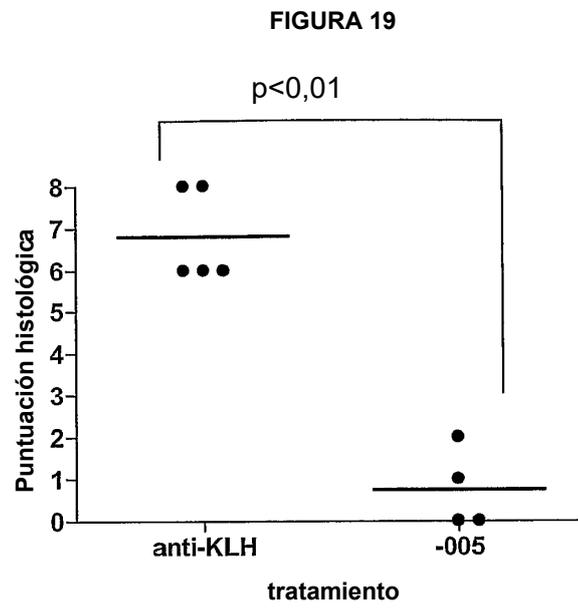
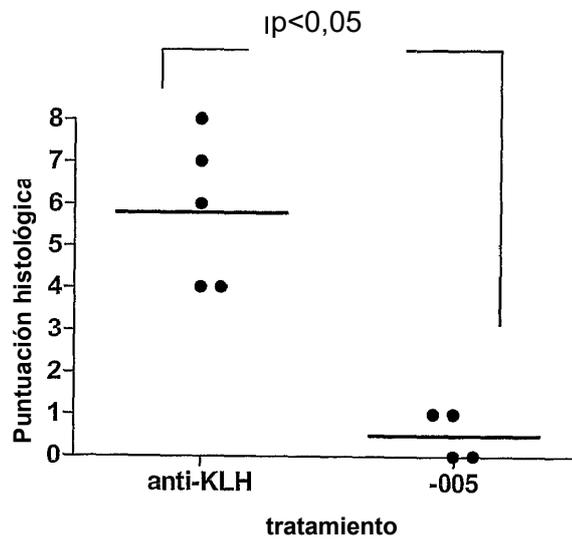


FIGURA 20



A

FIGURA 21

B

C

FIGURA 22

A

B

C

FIGURA 23 (1/3)

A:

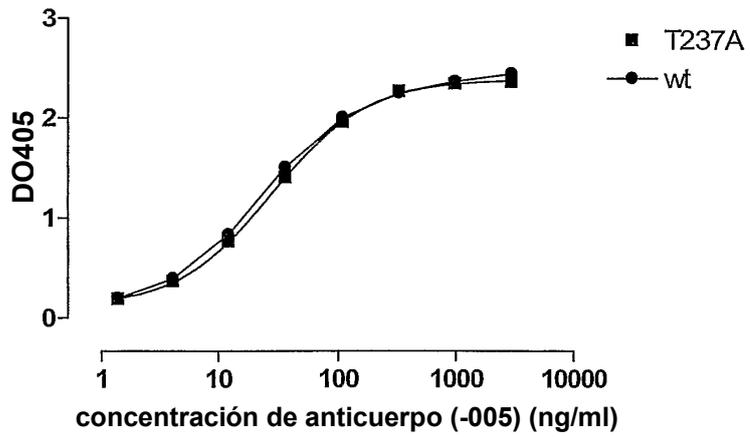
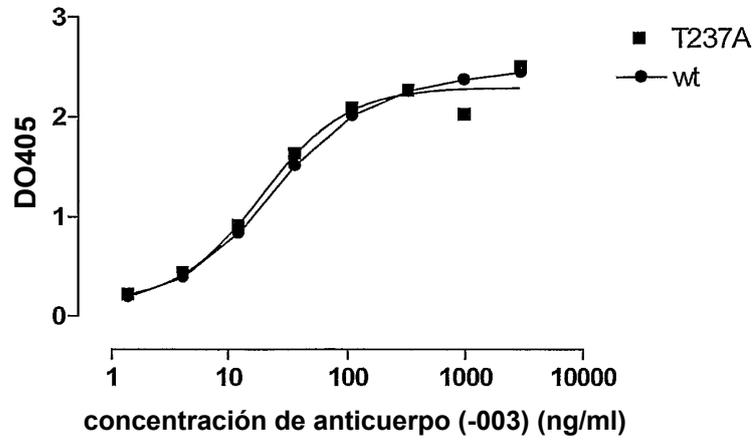


FIGURA 23 (2/3)

B:

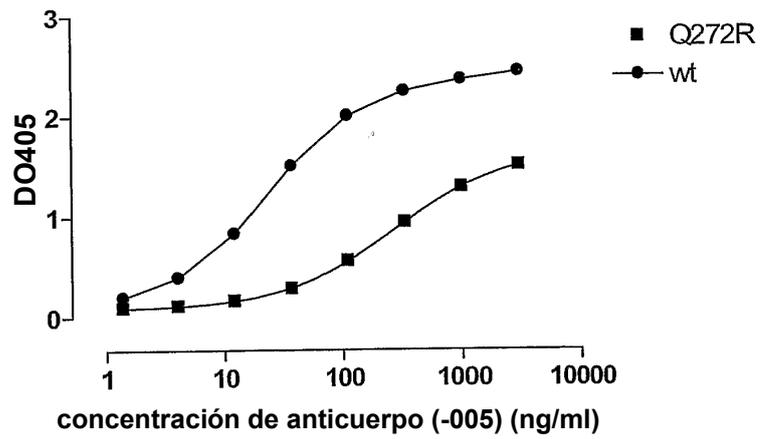
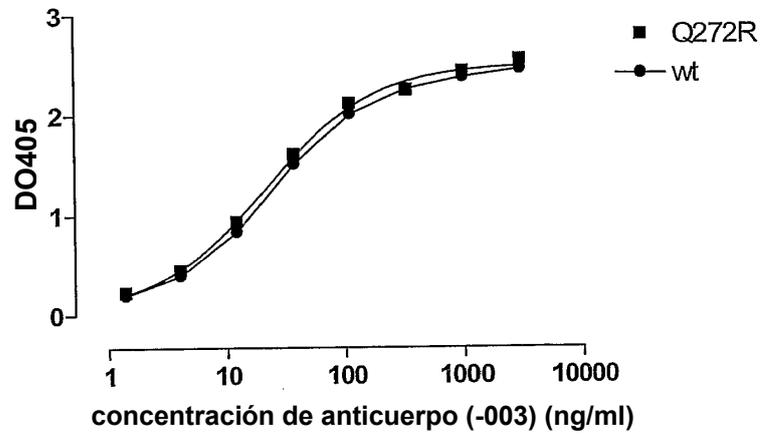


FIGURA 23 (3/3)

C:

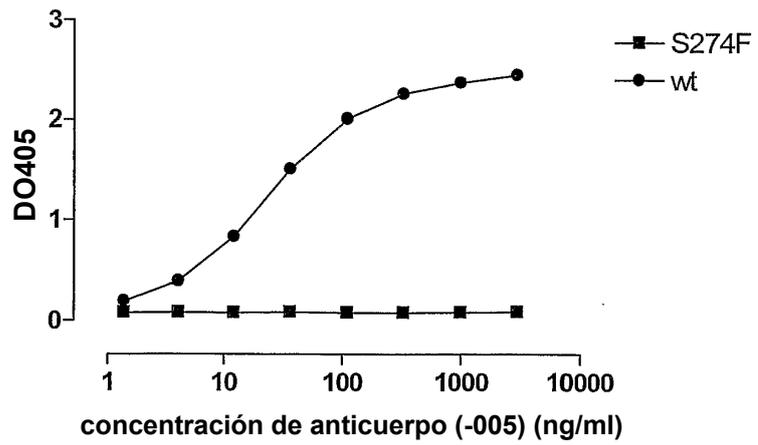
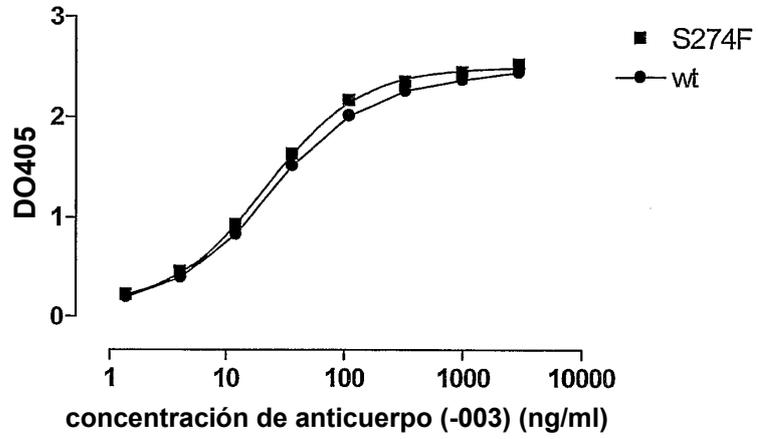
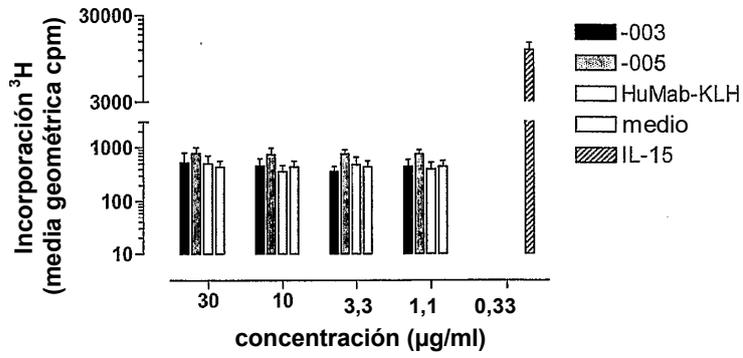
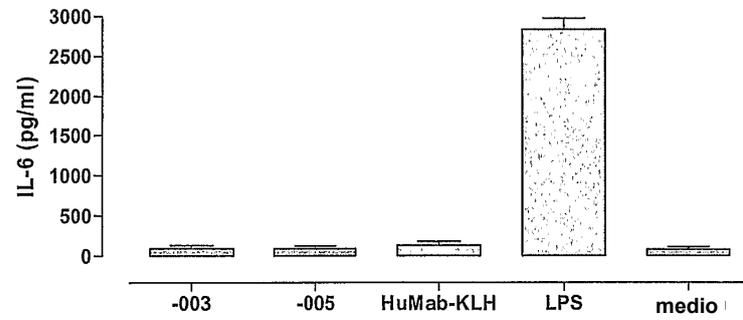


FIGURA 24

A:



B:



C:

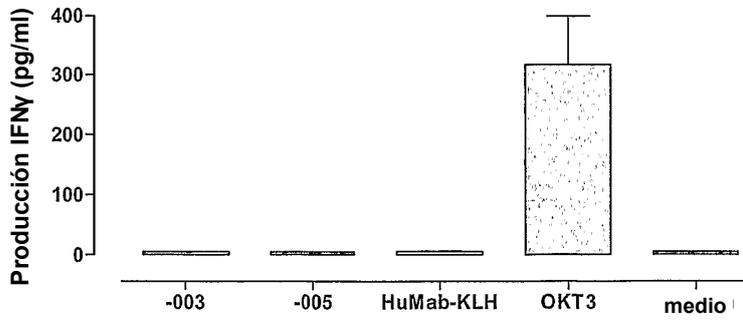
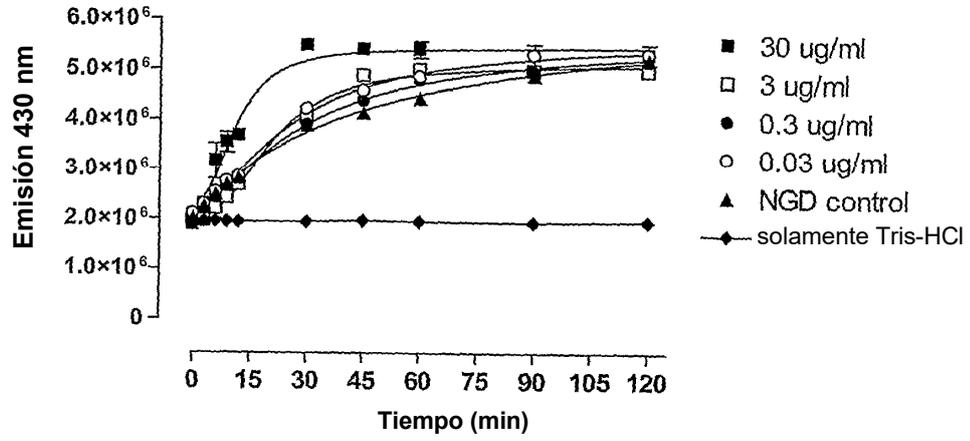


FIGURA 25 (1/2)

A



B

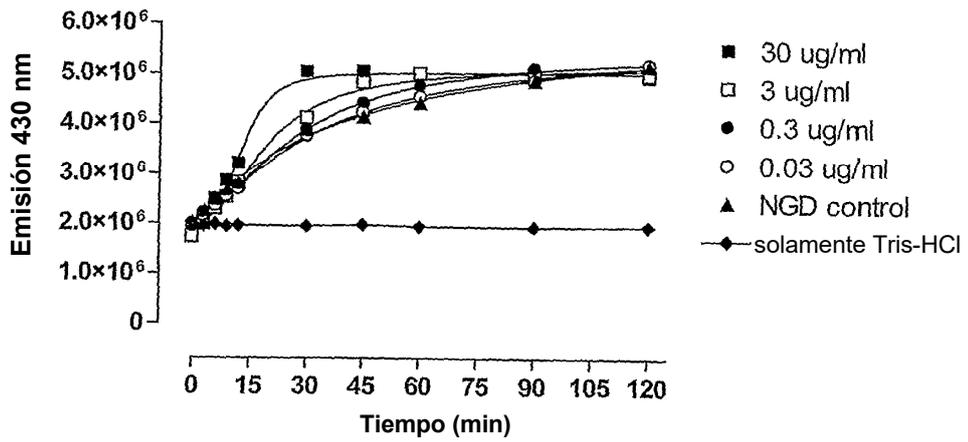
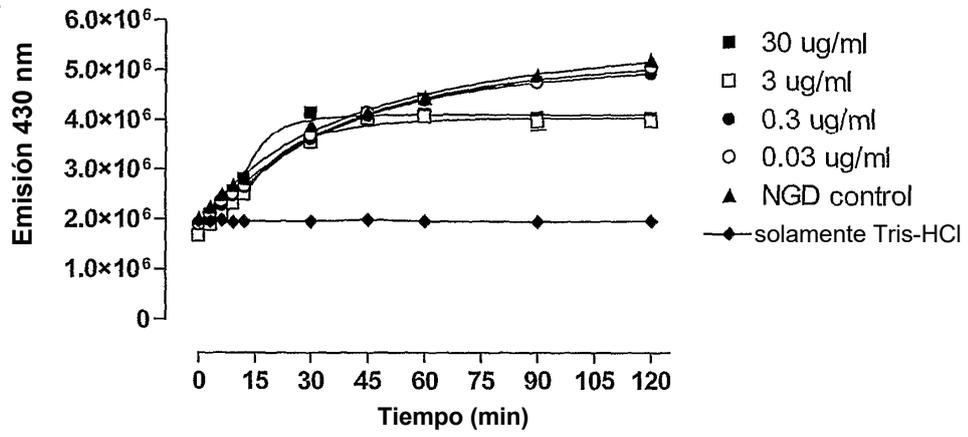


FIGURA 25 (2/2)

C



D

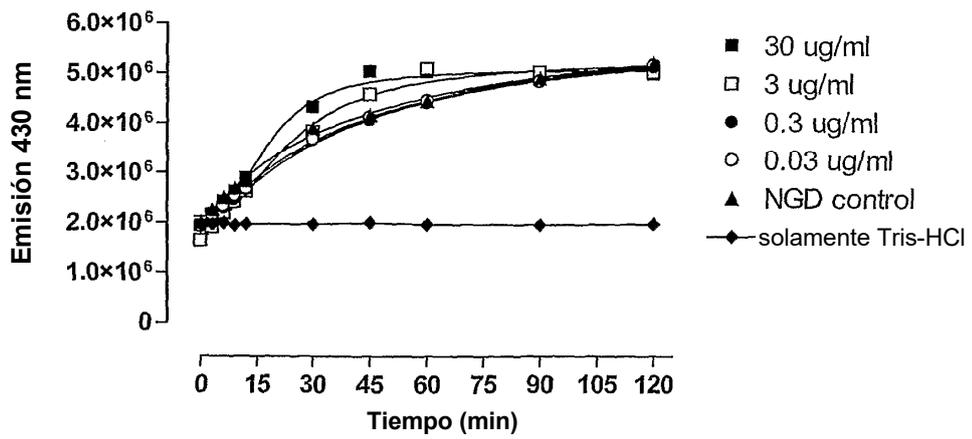
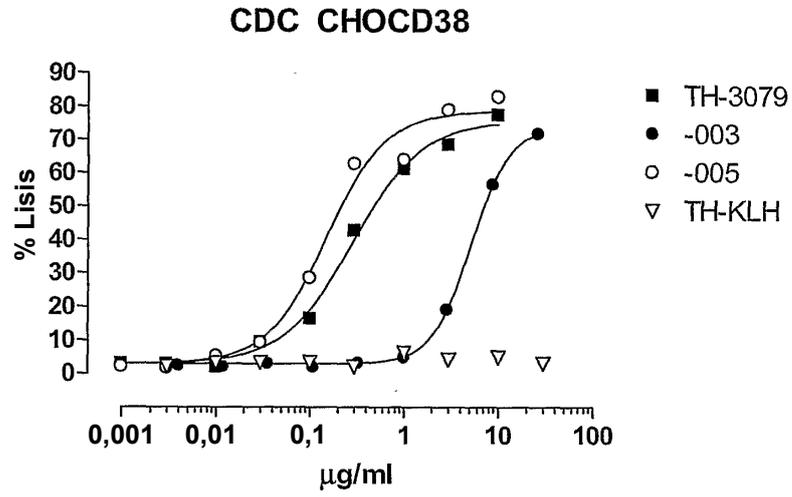


FIGURA 26 (1/2)

A



B

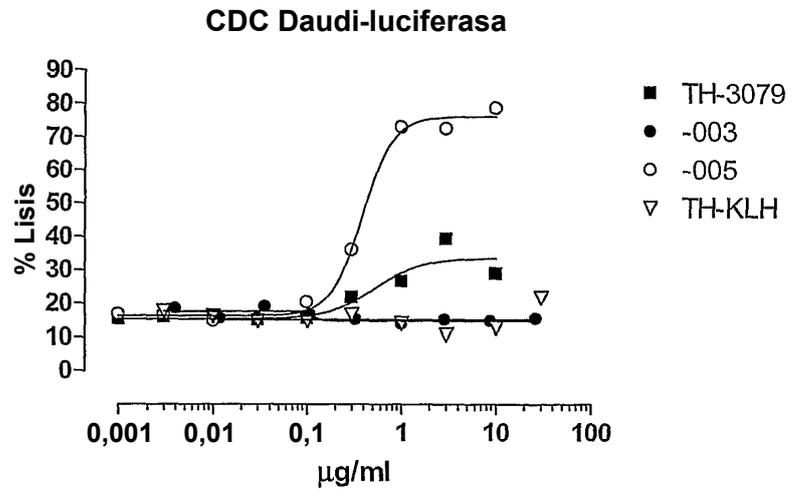
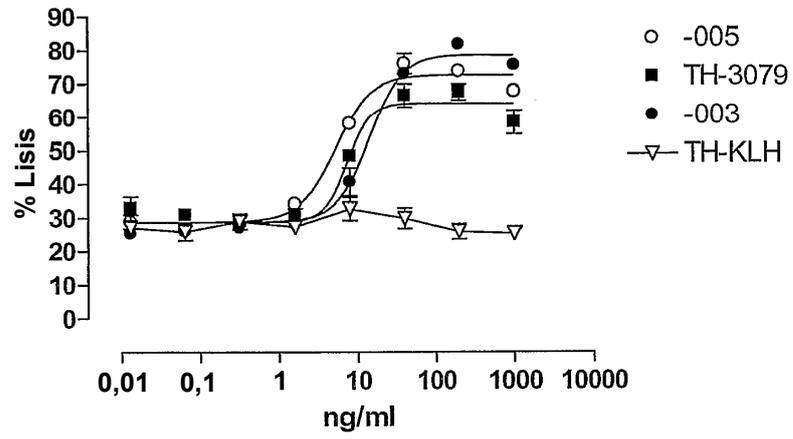


FIGURA 26 (2/2)

C

Donante B de células Daudi



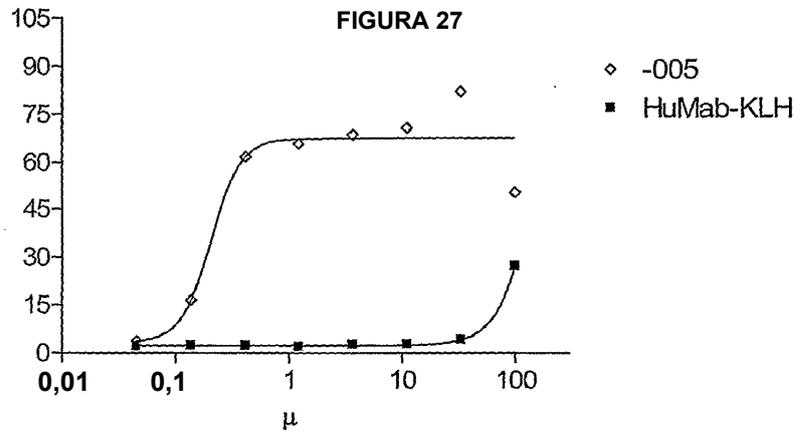
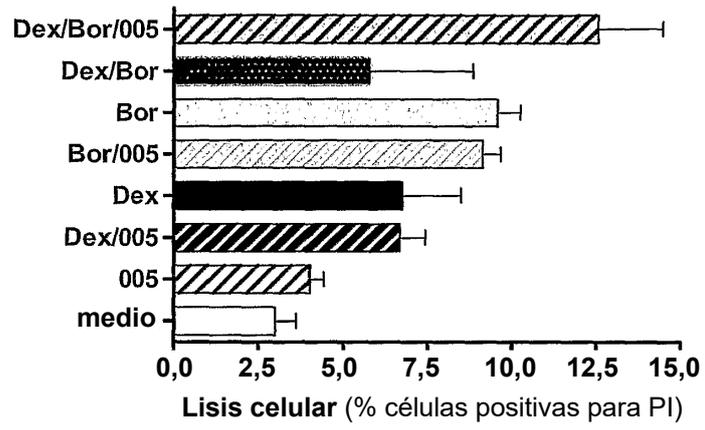


FIGURA 28



ES 2 732 278 T3

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

<210> 3
<211> 11
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 3

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp Leu Ala
1 5 10

<210> 4
<211> 7
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 4

ES 2 732 278 T3

Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser
 1 5

<210> 5
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> homo sapiens

<400> 5

Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Arg Thr
 1 5

<210> 6
 <211> 366
 <212> ADN
 <213> homo sapiens

<400> 6

caggtccagc tggcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctgggtcctc ggtgaaggtc	60
tcctgcaagg ctctggagg caccttcagc agctatgctt tcagctgggt gcgacaggcc	120
cctggacaag gacttgagtg gatgggaagg gtcacccctt tccttggtat agcaaactcc	180
gcacagaaat tccagggcag agtcacaatt accgcggaca aatccacgag cacagcctac	240
atggacctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtat attactgtgc gagagatgat	300
atagcagcac ttggtccttt tgactactgg ggccagggaa ccctgggtcac cgtctcctca	360
gcctcc	366

<210> 7
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> homo sapiens

<400> 7

ES 2 732 278 T3

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 Ala Ser
 115 120

- <210> 8
- <211> 5
- <212> PRT
- <213> homo sapiens

<400> 8

Ser Tyr Ala Phe Ser
 1 5

ES 2 732 278 T3

<210> 9
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> homo sapiens

<400> 9

Arg Val Ile Pro Phe Leu Gly Ile Ala Asn Ser Ala Gln Lys Phe Gln
 1 5 10 15

Gly

<210> 10
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> homo sapiens

<400> 10

Asp Asp Ile Ala Ala Leu Gly Pro Phe Asp Tyr
 1 5 10

<210> 11
 <211> 321
 <212> ADN
 <213> homo sapiens

<400> 11
 gaaattgtgt tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
 ctctcctgca gggccagtca gagtgtagc agctacttag cctggtacca acagaaacct 120
 ggccaggctc ccaggctcct catctatgat gcatccaaca gggccactgg catcccagcc 180
 aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagac ttcactctca ccatcagcag cctagagcct 240
 gaagattttg cagtttatta ctgtcagcag cgtagcaact ggcctccgac gttcggccaa 300
 gggaccaag tggaaatcaa a 321

ES 2 732 278 T3

<210> 12
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> homo sapiens

<400> 12

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 .

<210> 13
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> homo sapiens

<400> 13

ES 2 732 278 T3

attctctggt tcggggagcc cgtctttgac tactggggcc agggaaccct ggtcaccgtc 360

tcctcagcct cc 372

<210> 17

<211> 122

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 17

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

ES 2 732 278 T3

<210> 18
<211> 5
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 18

Ser Phe Ala Met Ser
1 5

<210> 19
<211> 17
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 19

Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Gly Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 20
<211> 13
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 20

Asp Lys Ile Leu Trp Phe Gly Glu Pro Val Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 21
<211> 321
<212> ADN
<213> homo sapiens

ES 2 732 278 T3

<400> 21
 gaaattgtgt tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
 ctctcctgca gggccagtca gagtgtagc agctacttag cctggtacca acagaaacct 120
 ggccaggctc ccgggctcct catctatgat gcttccaaca ggcctctgg catcccagcc 180
 aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagac ttcactctca ccatcagcag cctagagcct 240
 gaagattttg cagtttatta ctgtcagcag cgtagcaact ggcctctcac tttcggcgga 300
 gggaccaagg tggagatcaa a 321

<210> 22
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> homo sapiens

<400> 22

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

ES 2 732 278 T3

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

<210> 23
<211> 11
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 23

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 24
<211> 7
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 24

Asp Ala Ser Asn Arg Ala Ser
1 5

<210> 25
<211> 9
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 25

Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Leu Thr
1 5

<210> 26
<211> 366
<212> ADN
<213> homo sapiens

ES 2 732 278 T3

<400> 26
gaggtgcagc tgggtgcagtc tggagcagag gtgaaaaagc ccggggagtc tctgaagatc 60
tcctgtaagg gttctggata cagcttttcc aactactgga tcggctgggt gcgccagatg 120
cccgggaaag gcctggagtg gatggggatc atctatcctc atgactctga tgccagatac 180
agcccgtcct tccaaggcca ggtcaccttc tcagccgaca agtccatcag caccgcctac 240
ctgcagtgga gcagcctgaa ggcctcggac accgcatgt attactgtgc gagacatgta 300
gggtggggat cgcggtactg gtacttcgat ctctggggcc gtggcaccct ggtcactgtc 360
tctca 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

ES 2 732 278 T3

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

<210> 29
<211> 17
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 29

Ile Ile Tyr Pro His Asp Ser Asp Ala Arg Tyr Ser Pro Ser Phe Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 30
<211> 13
<212> PRT
<213> homo sapiens

ES 2 732 278 T3

<400> 30

His Val Gly Trp Gly Ser Arg Tyr Trp Tyr Phe Asp Leu
1 5 10

<210> 31

<211> 300

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 31

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

ES 2 732 278 T3

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
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
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

ES 2 732 278 T3

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

<210> 32
 <211> 300
 <212> PRT
 <213> homo sapiens

<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

ES 2 732 278 T3

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 Gln 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

ES 2 732 278 T3

<210> 33
 <211> 300
 <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

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

ES 2 732 278 T3

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

<400> 34

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

