

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 764 791**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.06.2011 PCT/EP2011/059507**

87 Fecha y número de publicación internacional: **15.12.2011 WO11154453**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.06.2011 E 11726381 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.10.2019 EP 2580243**

54 Título: **Anticuerpos contra la cd38 humana**

30 Prioridad:

09.06.2010 US 353082 P
09.06.2010 DK 201000498

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
04.06.2020

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

WEERS, MICHEL DE;
WALSETH, TIM;
WINKEL, JAN VAN DE;
VINK, TOM y
PARREN, PAUL

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 2 764 791 T3

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

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos contra la cd38 humana

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a anticuerpos dirigidos contra la CD38 humana y a los usos de dichos anticuerpos, en particular, usos terapéuticos.

10 Antecedentes de la invención

La CD38 es una glucoproteína transmembrana de tipo II que normalmente se encuentra en células hematopoyéticas y en tejidos sólidos. Con respecto a las células hematopoyéticas, la mayoría de los timocitos medulares son CD38+, las células T y B en reposo y circulantes son CD38⁻ y las células activadas son CD38+. La CD38 también se expresa en aproximadamente el 80 % de las células NK y monocitos en reposo y en linfoblastos de centros germinales de ganglios linfáticos, en células B plasmáticas y en algunas células intrafoliculares. Las células dendríticas también pueden expresar CD38. Una proporción significativa de células normales de la médula ósea, células precursoras particulares, expresan CD38. Además, el 50-80 % de las células sanguíneas de cordón umbilical son CD38+ y permanecen así en la sangre humana durante los dos o tres primeros años de vida. Además de en células precursoras linfoides, la CD38 también se expresa en eritrocitos y en plaquetas. Con respecto a tejidos sólidos, las células intraepiteliales y los linfocitos de la lámina propia, expresan CD38 en el intestino, las células de Purkinje y los ovillos neurofibrilares la expresan en el cerebro, las células epiteliales en la próstata, las células β en el páncreas, los osteoclastos en el hueso, las células de la retina en el ojo y en el sarcolema del músculo liso y estriado.

La CD38 también se expresa en una diversidad de enfermedades hematológicas neoplásicas, incluyendo mieloma múltiple, leucemia linfocítica crónica de linfocitos B, leucemia linfocítica aguda de linfocitos B, macroglobulinemia de Waldenström, amiloidosis sistémica primaria, linfoma de células del manto, leucemia prolinfocítica/mielocítica, leucemia mieloide aguda, leucemia mieloide crónica, linfoma folicular, leucemia de linfocitos NK y leucemia de células plasmáticas. La expresión de CD38 se ha descrito en células epiteliales/endoteliales de diferente origen, incluyendo epitelio glandular en próstata, células de los islotes del páncreas, epitelio ductal en glándulas, incluyendo la glándula parótida, células epiteliales bronquiales, células en testículo y ovario y epitelio tumoral en adenocarcinoma colorrectal. Otras enfermedades, donde podría estar implicada la expresión de CD38, incluyen, por ejemplo, carcinomas broncoepiteliales de pulmón, cáncer de mama (que evoluciona a partir de la proliferación neoplásica del revestimiento epitelial en conductos y lobulillos mamarios), tumores pancreáticos, que evolucionan a partir de las células b (insulinomas), tumores que evolucionan a partir del epitelio en el intestino (por ejemplo, adenocarcinoma y carcinoma de células escamosas), carcinoma en la glándula prostática, seminomas en testículo y cánceres de ovario. En el SNC, los neuroblastomas expresan CD38.

Otras divulgaciones también sugieren el papel de CD38 en la autoinmunidad, tal como enfermedad de Graves y tiroiditis (Antonelli A, et al., Clin. Exp. Immunol. 126, 426-431, 2001) y diabetes de tipo 1 y 2 (Mallone R y Perin PC, Diabetes Metab Res Rev 2006; 22: 284-294) e inflamación de las células del músculo liso de las vías respiratorias durante el asma (Desphande et al. 2004 Am J Respir Cell Mol Biol 31: 36-42)

CD38 es una proteína multifuncional. Las funciones atribuidas a CD38 incluyen tanto mediación del receptor en acontecimientos de adhesión y señalización como actividad (ecto) enzimática. Como una ectoenzima, CD38 utiliza NAD⁺ como sustrato para la formación de ADP-ribosa cíclica (ADPRc) y ADPR, pero también de nicotinamida y ácido nicotínico-adenina dinucleótido fosfato (NAADP). Se ha mostrado que la ADPRc actúa como segundo mensajero para la movilización de Ca²⁺ desde el retículo endoplasmático. El sistema de CD38/ADP ribosa cíclica: 1) en pulmón, contribuye al tono y la capacidad de respuesta del músculo liso de las vías respiratorias mediante sus efectos sobre el aumento inducido por agonista del Ca²⁺ intracelular (Desphande et al. 2005 Am J physiol Lung cell Mol Physiol 288: L773-L788), 2) regula la quimiotaxis de migración de neutrófilos a quimioatrayentes bacterianos, la migración de precursores de CD de la sangre a sitios periféricos y la migración de CD maduras de sitios de inflamación a ganglios linfáticos (Partida-Sanchez et al. Nat Med 7: 1209-121, 2001; Morita et al. 2008 J Pharmacol Sci. Marzo de 2008;106(3):492-504; Partida-Sanchez et al. Immunity 20: 279-291, 2004), 3) está implicado en la señalización de calcio de astrocitos que tiene implicaciones para la neuroinflamación y la demencia asociada al VIH-1 (Banerjee S. et al., J. Neurimmune Pharmacol., 3, 154-164 (2008)), 4) regula la fagocitosis mediada por FcyR en macrófagos murinos (Song E., et al., Biochem. and Biophys. Res. Comm., 367, 156-161, (2008), 5) está ligado a la secreción de insulina Okamoto, Molecular and Cellular Biochemistry, 193, 115-118, 1999 y 6) tiene un papel clave en la liberación de neuropéptidos y en la regulación de los comportamientos maternos y sociales (Jin D et al. Nature 446: 41-45, 2007). Además de señalización a través de Ca²⁺, se produce señalización de CD38 a través de interferencia con complejos de antígeno-receptor en células T y B u otros tipos de complejos receptores, por ejemplo, moléculas del MHC, y de esta manera está implicado en varias respuestas celulares, pero también en el cambio y la secreción de IgG1.

Se describen en la bibliografía varios anticuerpos anti-CD38, por ejemplo, en Lande R, et al., Cell Immunol. 220(1), 30-8 (2002), Ausiello CM, et al., Tissue Antigens. 56(6), 539-47 (2000) y Cotner T, et al., Int J Immunopharmacol.

3(3), 255-68 (1981). La unión de anticuerpos a CD38 puede tener diferentes efectos sobre las funciones de CD38. Por ejemplo, se ha mostrado que el anticuerpo IB4 de ratón anti-CD38 induce la activación de células T como indica la movilización de Ca^{2+} en células Jurkat (Zubiaur M, *et al.*, J Immunol. 159(1), 193-205 (1997), induce proliferación significativa de células mononucleares de sangre periférica (CMSP), induce la liberación de niveles significativos de IL-6 e induce la liberación de niveles detectables de IFN- γ (Lande, Zubiaur Morra, Ansello mencionado anteriormente). Hara-Yokoyama *et al.* Int Immunopharmacol 8, 59-70 (2008) describieron un anticuerpo anti-CD38 de ratón (CS/2) que inhibe la actividad NAD^+ glucosidolasa de CD38 y otro anticuerpo anti-CD38 de ratón (clon 90) que estimula la actividad NAD^+ glucosidolasa de un dominio extracelular aislado de CD38, pero tiene poco efecto sobre la actividad NAD^+ glucosidolasa del CD38 de superficie celular. Como se puede ver a partir de los datos presentados a continuación, los anticuerpos de la presente invención proporcionan actividad en la superficie de células positivas para CD38.

El documento WO2006099875 (Genmab) describe varios anticuerpos humanos anti-CD38, incluyendo 003 y 005. Se mostró que el anticuerpo 005 inhibe la producción de GDPRc a partir de NGD+ por CD38.

En vista de las múltiples funciones de la CD38 humana, existe la necesidad de nuevos anticuerpos terapéuticos que modulan de manera más específica funciones particulares de CD38.

Sumario de la invención

La invención es como se define en las reivindicaciones adjuntas.

En una realización, la invención proporciona un anticuerpo que se une a la CD38 humana (SEQ ID NO: 52), en donde el anticuerpo (i) no se une a una variante de CD38 humana en donde la Asp en la posición 202 se ha sustituido por Gly, (ii) se une a una variante de CD38 humana en donde la Gln en la posición 272 se ha sustituido por Arg, (iii) se une a una variante de CD38 humana en donde la Ser en la posición 274 se ha sustituido por Phe y (iv) se une a una variante de CD38 humana en donde la Thr en la posición 237 se ha sustituido por Ala.

En una realización, un anticuerpo según la realización anterior tiene un efecto inhibitor sobre la actividad ciclase de CD38 y un efecto estimulante sobre la actividad hidrolasa de CD38. En una realización, el efecto inhibitor es al menos 50-66 % en comparación con el efecto inhibitor sobre la actividad ciclase de CD38 en ausencia de anticuerpo, como se mide en los ensayos del ejemplo 8.

En una realización, un anticuerpo según una cualquiera de las realizaciones anteriores está codificado por un ácido nucleico de cadena pesada humana y de cadena ligera humana que comprende secuencias de nucleótidos en sus regiones variables como se expone en las SEQ ID NO: 1 y 26, 6 y 31, 11 y 36, 16 y 41 o 21 y 46, respectivamente.

En una realización, un anticuerpo según una cualquiera de las realizaciones anteriores comprende

- (a) una CDR3 de VH que comprende la secuencia como se expone en las SEQ ID NO: 5, 10, 15, 20 o 25,
- (a) una CDR3 de VH que tiene la secuencia expuesta en las SEQ ID NO: 5, 10, 15, 20 o 25, y una CDR3 de VL que tiene la secuencia expuesta en las SEQ ID NO: 30, 35, 40, 45 o 50 o
- (c) SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 30, o SEQ ID NO: 10 y SEQ ID NO: 35, o SEQ ID NO: 15 y SEQ ID NO: 40, o SEQ ID NO: 20 y SEQ ID NO: 45 o SEQ ID NO: 25 y SEQ ID NO: 50 como la CDR3 de VH y CDR3 de VL, respectivamente.

En una realización, un anticuerpo según una cualquiera de las realizaciones anteriores comprende

- (i) una CDR1 de VH que tiene la secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 3, una CDR2 de VH que tiene la secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 4, una CDR3 de VH que tiene la secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 5, una CDR1 de VL que tiene la secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 28, una CDR2 de VL que tiene la secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 29, una CDR3 de VL que tiene la secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 30,
- (ii) una CDR1 de VH que tiene la secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 8, una CDR2 de VH que tiene la secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 9, una CDR3 de VH que tiene la secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 10, una CDR1 de VL que tiene la secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 33, una CDR2 de VL que tiene la secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 34, una CDR3 de VL que tiene la secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 35,
- (iii) una CDR1 de VH que tiene la secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 13, una CDR2 de VH que tiene la secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 14, una CDR3 de VH que tiene la secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 15, una CDR1 de VL que tiene la secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 38, una CDR2 de VL que tiene la secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 39, una CDR3 de VL que tiene la secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 40,

(iv) una CDR1 de VH que tiene la secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 18, una CDR2 de VH que tiene la secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 19, una CDR3 de VH que tiene la secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 20, una CDR1 de VL que tiene la secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 43, una CDR2 de VL que tiene la secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 44, una CDR3 de VL que tiene la secuencia como se expone en la SEQ ID NO 45 o

(v) una CDR1 de VH que tiene la secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 23, una CDR2 de VH que tiene la secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 24, una CDR3 de VH que tiene la secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 25, una CDR1 de VL que tiene la secuencia como se expone en la SEQ ID NO 48, una CDR2 de VL que tiene la secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 49, una CDR3 de VL que tiene la secuencia como se expone en la SEQ ID NO 50.

En una realización, un anticuerpo según una cualquiera de las realizaciones anteriores comprende

(i) una región VH que comprende la secuencia de las SEQ ID NO: 2, 7, 12, 17 o 22, o

(ii) una región VH que tiene al menos 80 % de identidad, tal como 90 %, o 95 %, o 97 %, o 98 %, o 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de la región VH expuesta en las SEQ ID NO: 2, 7, 12, 17 o 22,

(iii) una región VL que comprende la secuencia de las SEQ ID NO: 27, 32, 37, 42 o 47 o

(iv) una región VL que tiene al menos 80 % de identidad, tal como 90 % o 95 % o 97 % o 98 % o 99 % o 100 % de identidad con una secuencia de región VL seleccionada del grupo que consiste en: las SEQ ID NO: 27, 32, 37, 42 o 47.

En una realización, un anticuerpo según una cualquiera de las realizaciones anteriores comprende

(i) una región VH que comprende la secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 2 y una región VL que comprende cualquiera de la secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 27,

(ii) una región VH que comprende la secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 7 y una región VL que comprende cualquiera de la secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 32,

(iii) una región VH que comprende la secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 12 y una región VL que comprende cualquiera de la secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 37,

(iv) una región VH que comprende la secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 17 y una región VL que comprende cualquiera de la secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 42 o

(v) una región VH que comprende la secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 22 y una región VL que comprende cualquiera de la secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 47.

En una realización, la invención proporciona un anticuerpo aislado que se une a CD38 humana (SEQ ID NO: 52), en donde el anticuerpo aislado comprende

(i) una CDR1 de VH que tiene la secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 3, una CDR2 de VH que tiene la secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 4, una CDR3 de VH que tiene la secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 5, una CDR1 de VL que tiene la secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 28, una CDR2 de VL que tiene la secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 29, una CDR3 de VL que tiene la secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 30,

(ii) una CDR1 de VH que tiene la secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 8, una CDR2 de VH que tiene la secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 9, una CDR3 de VH que tiene la secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 10, una CDR1 de VL que tiene la secuencia como se expone en la SEQ ID NO 33, una CDR2 de VL que tiene la secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 34, una CDR3 de VL que tiene la secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 35,

(iii) una CDR1 de VH que tiene la secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 13, una CDR2 de VH que tiene la secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 14, una CDR3 de VH que tiene la secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 15, una CDR1 de VL que tiene la secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 38, una CDR2 de VL que tiene la secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 39, una CDR3 de VL que tiene la secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 40,

(iv) una CDR1 de VH que tiene la secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 18, una CDR2 de VH que tiene la secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 19, una CDR3 de VH que tiene la secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 20, una CDR1 de VL que tiene la secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 43, una CDR2 de

VL que tiene la secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 44, una CDR3 de VL que tiene la secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 45,

(v) una CDR1 de VH que tiene la secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 23, una CDR2 de VH que tiene la secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 24, una CDR3 de VH que tiene la secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 25, una CDR1 de VL que tiene la secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 48, una CDR2 de VL que tiene la secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 49, una CDR3 de VL que tiene la secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 50;

(vi) una región VH que comprende la secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 2 y una región VL que comprende cualquiera de la secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 27,

(vii) una región VH que comprende la secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 7 y una región VL que comprende cualquiera de la secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 32,

(viii) una región VH que comprende la secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 12 y una región VL que comprende cualquiera de la secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 37,

(ix) una región VH que comprende la secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 17 y una región VL que comprende cualquiera de la secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 42 o

(x) una región VH que comprende la secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 22 y una región VL que comprende cualquiera de la secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 47.

En una realización, un anticuerpo aislado según la realización anterior comprende

(i) una región VH que comprende la secuencia de las SEQ ID NO: 2, 7, 12, 17 o 22, o

(ii) una región VH que tiene al menos 80 % de identidad, tal como 90 %, o 95 %, o 97 %, o 98 %, o 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de la región VH expuesta en las SEQ ID NO: 2, 7, 12, 17 o 22,

(iii) una región VL que comprende la secuencia de las SEQ ID NO: 27, 32, 37, 42 o 47 o

(iv) una región VL que tiene al menos 80 % de identidad, tal como 90 % o 95 % o 97 % o 98 % o 99 % o 100 % de identidad con una secuencia de región VL seleccionada del grupo que consiste en: las SEQ ID NO: 27, 32, 37, 42 o 47.

En una realización, un anticuerpo según una cualquiera de las realizaciones anteriores es capaz de inducir citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (CCDA), tal como en células Daudi, preferentemente con un valor de CE50 de 5 nM o inferior, por ejemplo, 1 nM o inferior, tal como 0,2 nM o inferior, según lo determinado por el método descrito en el ejemplo 6 en el presente documento.

En una realización, un anticuerpo según una cualquiera de las realizaciones anteriores comprende una o más de las siguientes características

(i) no es capaz de inducir citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) en células CHO-CD38,

(ii) se une a CD38 humana con una KD de 10⁻⁸ M o inferior, preferentemente con una KD de 10⁻⁹ M o inferior,

(iii) es un anticuerpo monovalente humano y/o

(iv) es un anticuerpo de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgD, IgA, IgE o IgM de longitud completa, tal como un anticuerpo IgG1, preferentemente un anticuerpo de IgG1, κ o un anticuerpo de IgM, preferentemente un anticuerpo IgM, κ .

En una realización, un anticuerpo según una cualquiera de las realizaciones anteriores comprende una o más de las siguientes características

(i) inhibe la síntesis catalizada por CD38 de GDPPr 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 8 de la memoria descriptiva,

(ii) inhibe la síntesis catalizada por CD38 de la ADPPr 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 en Munshi *et al.*, J. Biol. Chem. 275, 21566-21571 (2000), o

(iii) estimula la actividad hidrolasa de CD38 en al menos 25 %,

(iv) estimula la actividad NAD hidrolasa de CD38 en al menos 25 %,

(v) estimula la actividad ADPRc-hidrolasa de CD38 en al menos 25 % y/o

(vi) inhibe la capacidad de CD38 para catalizar la formación, a través de una reacción de intercambio de bases, de NAADP con una CI50 inferior a 0,5 µg/ml, tal como inferior a 0,2 µg/ml por el método descrito en el ejemplo 8 de la memoria descriptiva.

En una realización, la invención proporciona un conjugado de anticuerpo-fármaco que comprende un anticuerpo según una cualquiera de las realizaciones anteriores, en donde el anticuerpo se ha conjugado con un agente citotóxico, un radioisótopo o un fármaco.

En una realización, la invención proporciona un anticuerpo biespecífico que comprende un anticuerpo según una cualquiera de las realizaciones anteriores y una segunda especificidad de unión para una célula efectora humana o un antígeno canceroso.

En una realización, la invención proporciona un ácido nucleico aislado que codifica un anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores.

En una realización, la invención proporciona un vector de expresión que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una o más de las secuencias de aminoácidos según una cualquiera de las realizaciones anteriores.

En una realización, la invención proporciona una célula hospedadora recombinante eucariota o procariota que produce un anticuerpo como se define en una cualquiera de las realizaciones anteriores.

En una realización, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo, un conjugado de anticuerpo-fármaco, un anticuerpo biespecífico, o un vector de expresión según una cualquiera de las realizaciones anteriores y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

En una realización, la invención proporciona el anticuerpo como se ha definido en una cualquiera de las realizaciones anteriores para su uso como medicamento.

En una realización, la invención proporciona el anticuerpo como se ha definido en una cualquiera de las realizaciones anteriores para su uso en el tratamiento de un trastorno seleccionado de artritis reumatoide, leucemia linfocítica crónica (LLC), leucemia linfoblástica aguda (LLA), leucemia mielógena aguda (LMA) (en adultos), linfoma de células del manto, linfoma folicular, linfoma difuso de linfocitos B grandes y mieloma múltiple.

En una realización, la invención proporciona un método para producir un anticuerpo anti-CD38 de una cualquiera de las realizaciones anteriores, comprendiendo dicho método las etapas de

a) cultivar una célula hospedadora como se ha definido anteriormente y

b) purificar el anticuerpo anti-CD38 de los medios de cultivo.

En una realización, la invención proporciona un método para detectar, en una muestra, la presencia de antígeno CD38, o de una célula que exprese CD38, que comprende:

- poner en contacto la muestra con un anticuerpo de una cualquiera de las realizaciones anteriores en condiciones que permitan la formación de un complejo entre el anticuerpo y CD38; y
- analizar si se ha formado un complejo.

En una realización, la invención se refiere a un kit para detectar, en una muestra, la presencia de antígeno CD38, o de una célula que exprese CD38, comprendiendo el kit un anticuerpo de una cualquiera de las realizaciones anteriores e instrucciones para el uso del kit.

En una realización, la invención proporciona un anticuerpo antiidiotípico que se une a un anticuerpo de una cualquiera de las realizaciones anteriores.

La presente invención proporciona una nueva clase de anticuerpos anti-CD38 que al interaccionar con aminoácidos particulares de la CD38 humana, tienen un fuerte efecto estimulante sobre la actividad ADPRc hidrolasa de CD38 lo que conduce a niveles disminuidos de ADPRc. Asimismo, los anticuerpos anti-CD38 inhiben la capacidad de CD38 para catalizar la formación, a través de una reacción de intercambio de bases, de ácido nicotínico adenina dinucleótido 2'-fosfato (NAADP).

Estos anticuerpos son útiles para el tratamiento de varias enfermedades, incluyendo enfermedades autoinmunitarias e inflamatorias (crónicas), tales como diabetes de tipo 1 y 2, tiroiditis, enfermedad de Graves, artritis, neuroinflamación y asma.

El trabajo científico reciente sugiere que la ADPRc sintetizada extracelularmente por CD38, puede transportarse a las células a través de transportadores de nucleósidos y después movilizar Ca^{2+} a través de un proceso dependiente de proteínas de unión a FK506. Este proceso puede estar implicado en la señalización intracelular de Ca^{2+} inducida por fMLP y la migración en neutrófilos humanos (Morita *et al.* 2008 J Pharmacol Sci. marzo de 2008; 106(3): 492-504), migración de precursores de CD de la sangre a sitios periféricos y migración de CD maduras de sitios de inflamación a ganglios linfáticos (Partida-Sanchez *et al.* Immunity 20: 279-291, 2004). Sin quedar ligado a ninguna teoría particular, la reducción de los niveles de ADPRc obtenida por tratamiento con un anticuerpo de la presente invención puede reducir de este modo la migración de neutrófilos y células dendríticas y tener efectos antiinflamatorios. Por consiguiente, aunque los anticuerpos de la invención puedan ser útiles para diversos fines, éstos pueden ser particularmente útiles para el tratamiento de la inflamación, por ejemplo, en relación con una enfermedad autoinmunitaria, debido a sus efectos únicos sobre las actividades enzimáticas de CD38, a través de la unión en un sitio particular en CD38.

Breve descripción de los dibujos

En la **figura 1** se muestran estudios de bloqueo cruzado de los anticuerpos de la invención. Más particularmente, en la figura se muestra la unión de 005-FITC con células CHO-CD38 tratadas con exceso de anticuerpos específicos de CD38, 025, 026, 028, 049 y 056, sin marcar.

En la **figura 2** se muestra la unión de los anticuerpos anti-CD38 de la invención con CD38 ts (tipo silvestre) y mutante. En la figura 2(A) se muestra la unión de los anticuerpos anti-CD38 025, 026, 028 y 049 con CD38 de tipo silvestre (TS) y mutante (T237A, Q272R y S274F). En la figura 2(B) se muestra la unión de los anticuerpos anti-CD38 025, 028 y 049 con CD38 de tipo silvestre (TS) y mutante (D202G).

En la **figura 3** se muestra la unión de anticuerpos de la invención con células Daudi-luc y células CHO-CD38.

En la **figura 4** se muestra la lisis mediada por CCDA de células Daudi-luc causada por los anticuerpos anti-CD38 de la invención y como anticuerpo de control de isotipo anti-KLH (HuMab-KLH).

En la **figura 5** se muestra la lisis mediada por CDC de células CHO CD38 causada por los anticuerpos anti-CD38 de la invención.

En la **figura 6** se muestra la inhibición de la producción de GDPRc por la proteína CD38 etiquetada con His y CD38 expresado en células en presencia de los anticuerpos anti-CD38 de la invención. En la figura 6(A) se muestra el porcentaje de inhibición de la producción de GDPRc (por la proteína CD38 humana recombinante) en presencia de anticuerpos 025, 026, 028, 049 y 056 (3 $\mu\text{g/ml}$) específicos de CD38. En la figura 6(B) se muestra el efecto de los anticuerpos anti-CD38 sobre la producción de GDPRc a lo largo del tiempo. Los anticuerpos anti-CD38 se usaron a una concentración final de 10 $\mu\text{g/ml}$. En la figura 6(C) se muestra el efecto de los anticuerpos anti-CD38 sobre la producción de GDPRc usando diluciones en serie (0,01 - 30 $\mu\text{g/ml}$) de 028 o control de isotipo HuMab-KLH. En la figura 6(D) se muestra el porcentaje de inhibición de la producción de GDPRc (por CD38 expresado en células (células CHO-CD38)) en presencia de diluciones en serie (0,01 - 30 $\mu\text{g/ml}$) de 028 o control de isotipo IgG1 HuMab-KLH.

En la **figura 7** se muestra el efecto del anticuerpo 028 de la invención sobre la producción de 8NH₂-ADPRc. Los productos de cada reacción se analizaron mediante HPLC. En la figura 7(A) se indica la posición de la elución de los productos y sustratos. En la figura 7(B) se muestra la dependencia de la concentración de anticuerpos sobre la producción de 8NH₂-ADPRc. HuMab-KLH (círculos blancos), mAb-028 (círculos negros).

En la **figura 8** se muestra el efecto del anticuerpo 028 de la invención sobre la actividad ADPRc hidrolasa y NADasa, más particularmente el efecto del mAb (anticuerpo monoclonal) 028 sobre la actividad ADPRc hidrolasa (figura A, figura superior, B y C) y NADasa (figura A, figura inferior). En la figura 8(A) se muestran los resultados de la incubación de proteína recombinante CD38 con ADPRc o NAD en presencia de 10 μg de HuMab-KLH (CD38 + 10 μg de HuMab-KLH), 10 μg de Ab 028 (CD38 + 10 μg de Ab 028), o sin anticuerpo (control de CD38). Los productos de cada reacción se analizaron mediante HPLC. En la figura 8(B) se muestra la titulación del anticuerpo CD38 a diferentes concentraciones sobre la actividad ADPRc hidrolasa como se analizó mediante HPLC. En la figura 8(C) se muestran los resultados de incubar la proteína recombinante CD38 con ³²P-ADPRc en presencia de mAb-003, mAb-028, daratumumab (005) o HuMab-KLH. Los productos se analizaron mediante cromatografía en capa fina. HuMab-KLH (círculos blancos), mAb-028 (círculos negros). En la figura 9 se muestra el efecto de los anticuerpos anti-CD38 de la invención sobre la actividad de intercambio de bases de CD38.

En la **figura 9** (A) se muestra el efecto de los anticuerpos sobre la producción de NAADP a las concentraciones indicadas. En la figura 9(B) se muestra el efecto de la titulación de mAb-028 sobre la velocidad de formación de NAADP.

LISTADO DE SECUENCIAS

Región VH	
SEQ ID NO: 1	ADN de VH 028 cagggtccaac tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctgggtcctc ggtgaaggtc tcctgcaagg cttttggagg caccttcagc agctacgcta tcagctgggt gcgacaggcc cctggacaag ggcttgagtg gatgggaagg atcatccgtt tccttggtat agcaaactac gcacagaagt tccagggcag agtcacgctt atcgcgga aatccacgaa cacagcctac atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtt attactgtgc gggggaacct ggggagcggg accccgatgc tgttgatata tggggccaag ggacaatggt caccgtctct tca
SEQ ID NO: 2	VH 028 QVQLVQSGAE VKKPGSSVKV SCKAFGGTFS SYAISWVRQA PGQGLEWM GR IIRFLGIANYAQKFQGRVTL IADKSTNTAY MELSSLRSED TAVYYCAGEP GERDPDAVDI WGQGTMTVSS
SEQ ID NO: 3	CDR1 de VH 028 GGTSFSSYA
SEQ ID NO: 4	CDR2 de VH 028 IIRFLGIA
SEQ ID NO: 5	CDR3 de VH 028 AGEPGERDPDAVDI
SEQ ID NO: 6	ADN de VH 025 cagggtccaactggtgcagtcctggggctgaggtgaagaagcctgggtcctcgggtgaaggtc tcctgcaaggcttttggaggcaccttcagcagctatgctatcagctgggtacgacaggcc cctggacaagggttgagtggatgggaaggatcatccgttcttggtaaagcaaatacac gcacagaagttccagggcagagtcacgctaccgcggaataccacgaacacagcctac atggagctgagcagcctgagatctgaggacacggccgtttattactgtgcgggggaacct ggggatcgggaccccgatgctgttgatatactggggccaagggaatggtcaccgtctct tcag
SEQ ID NO: 7	VH 025 QVQLVQSGAEVKKPGSSVKV SCKAFGGTFSSY AISWVRQAPGQGLEWM GRIIRFLGKANHAQKFQGRVTLTADKSTNTAYMELSSLRSED TAVYYCAGE PGDRDPDAVDI WGQGTMTVSS
SEQ ID NO: 8	CDR1 de VH 025 GGTFSSY A
SEQ ID NO: 9	CDR2 de VH 025 IIRFLGKA
SEQ ID NO: 10	CDR3 de VH 025 AGEPGDRDPDAVDI
SEQ ID NO: 11	ADN de VH 026 cagggtccaactggtgcagtcctggggctgaggtgaagaagcctgggtcctcgggtgaaggtc tcctgcaaggcttttggaggcaccttcagcagttatgctattagctgggtgcgacaggcc cctggacaagggttgagtggatgggaaggatcatccgttcttggtaaaacaaatacac gcacagaagttccagggcagagtcacactaccgcggaataccacgaacacagcctac atggagctgagcagcctgagatctgaggacacggccgtttattactgtgcgggggaacct ggggatcgggaccccgatgctgttgatatactggggccaagggaatggtcaccgtctct tcag

(continuación)

Región VH	
SEQ ID NO: 12	VH 026 QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKAFGGTFSSYAISWVRQAPQGLEWMGRIIR FLGKTNHAQKFQGRVTLTADKSTNTAYMELSSLRSEDTAVYYCAGEPGDRDPD AVDIWGQGTMTVSS
SEQ ID NO: 13	CDR1 de VH 026 GGTFSSYA
SEQ ID NO: 14	CDR2 de VH 026 IIRFLGKT
SEQ ID NO: 15	CDR3 de VH 026 AGEPGDRDPDAVDI
SEQ ID NO: 16	ADN de VH 049 caggctccagctggtgcagctctggggctgaggtgatgaagcctgggtcctcggtgaaggtc tcctgcaaggcttccggaggcaccttccgcagctatgctatcagttgggtgcgacaggcc cctggacaagggttgagtggatgggaaggatcatcgtttcttggtataaaactac gcacagaagttccagggcagagtcacgcttaccgcggaataccacgaccacagcctac atggagctgagcagcctgagatctgaggacacggccgtgtattactgtacgggggaacct ggggctcgggaccccgacgctttgatctggtggccaagggaatggtcacctctct tcag
SEQ ID NO: 17	VH 049 QVQLVQSGAEVMKPGSSVKVSCKASGGTFRSYAISWVRQAPQGLEWM GRIIVFLGKTNYAQKFQGRVTLTADKSTTTAYMELSSLRSEDTAVYYCTGEP GARDPDAFDIWGQGTMTVSS
SEQ ID NO: 18	CDR1 de VH 049 GGTFRSYA
SEQ ID NO: 19	CDR2 de VH 049 IIVFLGKT
SEQ ID NO: 20	CDR3 de VH 049 TGEPEGARDPDAFDI
SEQ ID NO: 21	ADN de VH 056 caggctccagctggtgcagctctggggctgaggtgaagaagcctgggtcctcggtgaaggtc tcctgcaagccttccggaggcaccttcaggagctacgctatcagctgggtacgacaggcc cctggacaagggttgagtggatgggaaggatcatcgtttcttggtataaagtaactac gcacagaggttccagggcagagtcacgcttaccgcggaataccacgaccacagcctac atggagctgagcagcctgagatctgaggacacggccgtgtattactgtacgggggaacct ggggctcgggaccccgacgctttgatctggtggccaagggaatggtcacctctct tcag
SEQ ID NO: 22	VH 056 QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKPSGGTFRSYAISWVRQAPQGLEWMGRIIVFL GKVNYAQRFFQGRVTLTADKSTTTAYMELSSLRSEDTAVYYCTGEPGARDPDAFDI WGQGTMTVSS
SEQ ID NO: 23	CDR1 de VH 056 GGTFRSYA
SEQ ID NO: 24	CDR2 de VH 056 IIVFLGKV
SEQ ID NO: 25	CDR3 de VH 056 TGEPEGARDPDAFDI

(continuación)

Región VH	
SEQ ID NO: 26	ADN de VL 028 gacatccagatgacccagctctccatcctcactgtctgcatctgtaggagacagagtcaccatcactgtcgggcgag tcagggtattcgagctggttagcctggtatcagcagaaaccagagaaagcccctaagtcctgatctatgctgcat ccagtttgcaaagtgggtcccatcaagggtcagcggcagtggtctgggacagatttcactctcaccatcagcag cctgcagcctgaagattttgcaacttattactgccaacagtataatagttacccgctcactttcggcggagggaacaa ggtggagatcaaa
SEQ ID NO: 27	VL 028 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRSWLAWYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVP SRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNSYPLTFGGGTKEIK
SEQ ID NO: 28	CDR1 de VL 028 GGIRSW
SEQ ID NO: 29	CDR2 de VL 028 AAS
SEQ ID NO: 30	CDR3 de VL 028 QQYNSYPLT
SEQ ID NO: 31	ADN de VL 025 gacatccagatgacccagctctccatcctcactgtctgcatctgtaggagacagagtcacc atcactgtcgggcgagtcagggtattcgagctggttagcctggtatcagcagaaacca gagaaagcccctaagtcctgatctatgctgcatccagtttgcaaagtgggtcccatca agggtcagcggcagtggtctgggacagatttcactctcaccatcagcagcctgcagcct gaagattttgcaacttattactgccaacagtataatagttacccgctcactttcggcgga gggaccaaggtggagatcaaac
SEQ ID NO: 32	VL 025 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRSWLAWYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVP SRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNSYPLTFGGGTKEIK
SEQ ID NO: 33	CDR1 de VL 025 QGIRSW
SEQ ID NO: 34	CDR2 de VL 025 AAS
SEQ ID NO: 35	CDR3 de VL 025 QQYNSYPLT
SEQ ID NO: 36	ADN de VL 026 gacatccagatgacccagctctccatcctcactgtctgcatctgtaggagacagagtcacc atcactgtcgggcgagtcagggtattcgagctggttagcctggtatcagcagaaacca gagaaagcccctaagtcctgatctatgctgcatccagtttgcaaagtgggtcccatca agggtcagcggcagtggtctgggacagatttcactctcaccatcagcagcctgcagcct gaagattttgcaacttattactgccaacagtataatagttacccgctcactttcggcgga gggaccaaggtggagatcaaac
SEQ ID NO: 37	VL 026 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRSWLAWYQQKPEKAPKSLIY AASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNSYPLTFGGGTKEIK
SEQ ID NO: 38	CDR1 de VL 026 QGIRSW
SEQ ID NO: 39	CDR2 de VL 026 AAS
SEQ ID NO: 40	CDR3 de VL 026 QQYNSYPLT

(continuación)

Región VH	
SEQ ID NO: 41	ADN de VL 049 gacatccagatgacccagctctccatcctcactgtctgcatctgtaggagacagagtcacc atcacttgtcggcgagtcagggtattcgagctggtagcctggtatcagcagaaacca gagaaagcccctaagtcctgatctatgctgcatccagtttgcaaagtgggtcccatca aggttcagcggcagtggtatctgggacagatttcactctcaccatcagcagcctgcagcct gaagattttgcaacttattactgccaacagtataataattatccgctcactttcggcgga gggaccaaggtggagatcaaac
SEQ ID NO: 42	VL 049 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRSWLAWYQQKPEKAPKSLIYAA SSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYNNYPLTFGGGTKEIK
SEQ ID NO: 43	CDR1 de VL 049 QGIRSW
SEQ ID NO: 44	CDR2 de VL 049 AAS
SEQ ID NO: 45	CDR3 de VL 049 QQYNNYPLT
SEQ ID NO: 46	ADN de VL 056 gacatccagatgacccagctctccatcctcactgtctgcatctgtaggagacagagtcacc atcacttgtcggcgagtcagggtattcgagctggtagcctggtatcagcagaaacca gagaaagcccctaagtcctgatctatgctgcatccagtttgcaaagtgggtcccatca aggttcagcggcagtggtatctgggacagatttcactctcaccatcagcagcctgcagcct gaagattttgcaacttattactgccaacagtataataattatccgctcactttcggcgga gggaccaaggtggagatcaaac
SEQ ID NO: 47	VL 056 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRSWLAWYQQKPEKAPKSLIYAASS LQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYNNYPLTFGGGTKEIK
SEQ ID NO: 48	CDR1 de VL 056 QGIRSW
SEQ ID NO: 49	CDR2 de VL 056 AAS
SEQ ID NO: 50	CDR3 de VL 056 QQYNNYPLT
SEQ ID NO: 51	CD38 humana mutante MANCEFSPVSGDKPCCRLSRAQLCLGVSILVLILVVVLAVVPRWRQQWSGPGTTKRF PETVLARCVKYTEIHPEMRHVDCQSVWDAFKGAFISKHPCNITEEDYQPLMKLGTQTP CNKILLWSRIKDLAHQFTQVQRDMFTLEDTLGLYADDLTWCGEFNISKINYQSCPDWR KDCSNNPVSVFWKTVSRRFAEAACGVVHVMLNGSRSKIFDKNSTFGSVEVHNLQPEKV QTLEAWVIHGGREDSRDLCDPTIKELESIIISKRNIFSCKNIYRPDKFLQCVKNPEDSS CTSEI
SEQ ID NO: 52	CD38 humana MANCEFSPVSGDKPCCRLSRAQLCLGVSILVLILVVVLAVVPRWRQQWSGPGTTKRF PETVLARCVKYTEIHPEMRHVDCQSVWDAFKGAFISKHPCNITEEDYQPLMKLGTQTP CNKILLWSRIKDLAHQFTQVQRDMFTLEDTLGLYADDLTWCGEFNISKINYQSCPDWR KDCSNNPVSVFWKTVSRRFAEAACDVVHVMLNGSRSKIFDKNSTFGSVEVHNLQPEKV QTLEAWVIHGGREDSRDLCDPTIKELESIIISKRNIFSCKNIYRPDKFLQCVKNPEDSS CTSEI

Las regiones CDR se indican según el IMGT (siglas de *International ImmunoGeneTics*).

La secuencia de CD38 humana se describe en la secuencia 52. Un mutante de CD38 humana en donde S se mutó a F en la posición 274 se ha descrito en el documento WO2006099875 como la SEQ. ID NO: 34, y una mutación en donde Q se mutó a R en la posición 272 se describió en el documento WO2006099875 como la SEQ. ID NO: 33. Un mutante de CD38 humana en donde D se mutó a G en la posición 202 se ha descrito anteriormente como la SEQ. ID NO: 51.

Descripción detallada de la invención

Definiciones

La expresión "CD38 humana" cuando se usa en el presente documento incluye cualquier variante, isoforma y homólogo de especie de la CD38 humana (Swissprot: locus CD38_HUMAN, referencia P28907) que las células expresan de manera natural o se expresan en células transfectadas con el gen de CD38 humana.

El término "inmunoglobulina" se refiere a una clase de glucoproteínas estructuralmente relacionadas 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* C. 7 (Paul, W., ed., 2ª ed. Raven Press, N.Y. (1989)). Resumiendo, cada cadena pesada está compuesta normalmente por una región variable de cadena pesada (abreviada en el presente documento como V_H o VH) y una región constante de cadena pesada. La región constante de cadena pesada está compuesta normalmente por tres dominios, C_{H1} , C_{H2} y C_{H3} . Cada cadena ligera está compuesta normalmente por una región variable de cadena ligera (abreviada en el presente documento como V_L o VL) y una región constante de cadena ligera. La región constante de cadena ligera está compuesta normalmente por un dominio, C_L . Las regiones V_H y V_L pueden subdividirse adicionalmente en regiones de hipervariabilidad (o regiones hipervariables que pueden ser hipervariables en su secuencia y/o forma de bucles estructuralmente definidos), también denominadas regiones determinantes de complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas regiones marco conservadas (FR). Cada V_H y V_L se compone normalmente por tres CDR y cuatro FR, dispuestas desde el extremo amino al extremo carboxilo 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 restos de aminoácidos en esta región se realiza mediante el método descrito en Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991) (expresiones tales como la numeración de restos de dominio variable como en Kabat o según Kabat en el presente documento se refieren a este sistema de numeración para dominios variables de cadena pesada o dominios variables de cadena ligera). Usando este sistema de numeración, la secuencia de aminoácidos lineal real de un péptido puede contener menos aminoácidos o aminoácidos adicionales correspondientes a un acortamiento de, o 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 único (resto 52a según Kabat) después del resto 52 de CDR2 de V_H y restos insertados (por ejemplo, restos 82a, 82b y 82c, etc. según Kabat) después del resto 82 de FR de cadena pesada. Puede determinarse la numeración de Kabat de los restos para un anticuerpo dado mediante la alineación en regiones de homología de la secuencia del anticuerpo con una secuencia numerada por Kabat "convencional".

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 uno de los mismos, que tiene la capacidad de unirse específicamente con un antígeno en condiciones fisiológicas normales con una semivida de periodos de tiempo significativos, tales como al menos aproximadamente 30 minutos, al menos aproximadamente 45 minutos, al menos aproximadamente una hora, al menos aproximadamente dos horas, al menos aproximadamente cuatro horas, al menos aproximadamente 8 horas, al menos aproximadamente 12 horas, aproximadamente 24 horas o más, aproximadamente 48 horas o más, aproximadamente 3, 4, 5, 6, 7 o más días, etc., o cualquier otro periodo relevante definido funcionalmente (tal como un tiempo suficiente para inducir, promover, potenciar y/o modular una respuesta fisiológica asociada con la unión del anticuerpo con el antígeno y/o tiempo suficiente para que el anticuerpo reclute una actividad efectora mediada por Fc). Las regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras de la molécula de inmunoglobulina contienen un dominio de unión que interacciona con un antígeno. Las regiones constantes de los anticuerpos (Ab) pueden mediar en la unión de la inmunoglobulina con tejidos o factores del hospedador, incluyendo diversas células del sistema inmunitario (tales como células efectoras) y componentes del sistema del complemento tales como C1q, el primer componente en la ruta clásica de activación del complemento. Un anticuerpo anti-CD38 también puede ser un anticuerpo biespecífico, diacuerpo o 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, proporcionado por la presente invención, puede unirse con cualquier diana adecuada además de una parte de CD38. Como se ha indicado anteriormente, el término anticuerpo en el presente documento, a menos que se indique otra cosa o se contradiga claramente por el contexto, incluye fragmentos de un anticuerpo que conservan la capacidad de unirse específicamente con el antígeno. Se ha mostrado que la función de unión a antígeno de un anticuerpo puede realizarse mediante fragmentos de un anticuerpo de longitud completa. Los ejemplos de fragmentos de unión abarcados por el término "anticuerpo" incluyen (i) un fragmento Fab' o Fab, un fragmento monovalente que consiste en los dominios V_L , V_H , C_L y C_{H1} , o un anticuerpo monovalente como se describe en el documento WO2007059782 (Genmab); (ii) fragmentos $F(ab')_2$, fragmentos bivalentes que

comprenden dos fragmentos Fab' unidos mediante un enlace disulfuro en la región de 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 una sola rama de un anticuerpo, (v) un fragmento dAb (Ward *et al.*, Nature 341, 544-546 (1989)), que consiste esencialmente en un dominio V_H y también denominado anticuerpo de dominio (Holt *et al.*; Trends Biotechnol. noviembre de 2003; 21 (11): 484-90); (vi) camélidos o nanocuerpos (Reverts *et al.*; Expert Opin Biol Ther. ene 2005; 5 (1): 111-24) y (vii) una región determinante de complementariedad (CDR) aislada. Asimismo, aunque los dos dominios del fragmento Fv, V_L y V_H , están codificados por genes separados, se pueden unir, usando métodos recombinantes, mediante un enlazador sintético que les permite constituirse como una sola cadena proteica, en la que las regiones V_L y V_H se emparejan para formar moléculas monovalentes (conocidas como anticuerpos monocatenarios o Fv monocatenarios (scFv, siglas del inglés *single chain Fv*), véase, por ejemplo, Bird *et al.*, Science 242, 423-426 (1988) y Huston *et al.*, PNAS USA 85, 5879-5883 (1988)). Dichos anticuerpos monocatenarios están abarcados dentro del término anticuerpo a menos que se indique otra cosa o se indique claramente por el contexto. Aunque dichos fragmentos se incluyen en general dentro del significado de anticuerpo, colectivamente y cada uno de manera independiente son elementos únicos de la presente invención, que presentan diferentes propiedades biológicas y utilidad. Estos y otros fragmentos de anticuerpos útiles en el contexto de la presente invención se analizan adicionalmente en el presente documento. También debe entenderse que el término anticuerpo, salvo que se especifique otra cosa, también incluye anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales (mAb), polipéptidos de tipo anticuerpo, tales como anticuerpos quiméricos y anticuerpos humanizados, y fragmentos de anticuerpos que conservan la capacidad de unirse específicamente con el antígeno (fragmentos de unión a antígeno) proporcionado por cualquier técnica conocida, tal como escisión enzimática, síntesis de péptidos y técnicas recombinantes. Un anticuerpo generado puede poseer cualquier isotipo. Como se usa en el presente documento, "isotipo" se refiere a la clase de inmunoglobulina (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgD, IgA, IgE o IgM) que está codificada por genes de región constante de cadena pesada. Un "anticuerpo anti-CD38" es un anticuerpo que se une con el antígeno CD38.

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

En una realización preferida, el anticuerpo de la invención está aislado. Se entiende que un "anticuerpo aislado" como se usa en el presente documento, se refiere a un anticuerpo que está sustancialmente libre de otros anticuerpos que tienen diferentes especificidades antigénicas (por ejemplo, un anticuerpo aislado que se une específicamente con CD38 está sustancialmente libre de anticuerpos que se unen específicamente con antígenos distintos de CD38). Un anticuerpo aislado que se une específicamente con un epítipo, isoforma o variante de CD38 humana puede, sin embargo, tener reactividad cruzada con otros antígenos relacionados, por ejemplo, de otra especie (tales como homólogos de especie de CD38). Por otra parte, un anticuerpo aislado puede estar sustancialmente libre de otro material celular y/o productos químicos. En una realización de la presente invención, una combinación de anticuerpos monoclonales "aislados" que tienen diferentes especificidades se combina en una composición bien definida.

Las expresiones "anticuerpo monoclonal" o "composición de anticuerpo monoclonal" como se usan en el presente documento se refieren a una preparación de moléculas de anticuerpo de composición molecular única. Una composición de anticuerpo monoclonal presenta una única especificidad y afinidad de unión por un epítipo particular. Por consiguiente, la expresión "anticuerpo monoclonal humano" se refiere a anticuerpos que presentan una única especificidad de unión que tienen regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana. Los anticuerpos monoclonales humanos pueden ser generados por un hibridoma que incluye un linfocito B obtenido 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, fusionado con una célula inmortalizada.

Como se usa en el presente documento, el término "unión", en el contexto de la unión de un anticuerpo con un antígeno predeterminado, es normalmente una unión con una afinidad correspondiente a una K_D de aproximadamente 10^{-7} M o inferior, tal como de aproximadamente 10^{-8} M o inferior, tal como de aproximadamente 10^{-9} M o inferior, de aproximadamente 10^{-10} M o inferior, o de aproximadamente 10^{-11} M o incluso inferior, cuando se determina, por ejemplo, mediante tecnología de resonancia de plasmón superficial (RPS) en un instrumento BIAcore 3000 que usa el antígeno como ligando y el anticuerpo como analito, y se une con el antígeno predeterminado con una afinidad correspondiente a una K_D que es al menos diez veces menor, tal como al menos 100 veces menor, por ejemplo, al menos 1 000 veces menor, tal como al menos 10 000 veces menor, por ejemplo, al menos 100 000 veces menor, que su afinidad para unirse con un antígeno inespecífico (p. ej., BSA, caseína) distinto del antígeno predeterminado o un antígeno estrechamente relacionado. La cantidad con la que la afinidad por el antígeno es menor depende de la K_D del anticuerpo, de modo que cuando la K_D del anticuerpo es muy baja (es decir, el

anticuerpo es muy específico), entonces la cantidad con la que la afinidad por el antígeno es menor que la afinidad por un antígeno inespecífico puede ser al menos de 10 000 veces.

El término " k_d " (s^{-1}), como se usa en el presente documento, se refiere a la constante de velocidad de disociación de una interacción de antígeno-anticuerpo concreta. Dicho valor también se denomina valor de k_{off} .

El término " k_a " ($M^{-1} \times s^{-1}$), como se usa en el presente documento, se refiere a la constante de velocidad de asociación de una interacción de anticuerpo-antígeno concreta.

El término " K_D " (M), como se usa en el presente documento, se refiere a la constante de disociación en equilibrio de una interacción de antígeno-anticuerpo concreta.

El término " K_A " (M^{-1}), como se usa en el presente documento, se refiere a la constante de asociación en equilibrio de una interacción de anticuerpo-antígeno concreta y se obtiene dividiendo la k_a entre la k_d .

Los anticuerpos de la presente invención tienen un efecto sobre los sistemas enzimáticos como se describe en la sección de ejemplos. Los anticuerpos se describen mediante efectos estimuladores o efectos inhibidores sobre diferentes parámetros. Los efectos estimuladores e inhibidores pueden medirse como se desvela en los ejemplos en el presente documento.

Un anticuerpo como se describe y reivindica en el presente documento también puede ser una variante funcional de cualquiera de los anticuerpos específicos descritos en el presente documento. Dicho anticuerpo variante es un anticuerpo que difiere de un anticuerpo específico descrito en el presente documento por una o más alteraciones de restos de aminoácidos adecuadas, es decir, sustituciones, supresiones, inserciones o adiciones de secuencia terminal, por ejemplo, en el dominio constante, y/o las regiones variables (o una o más CDR cualesquiera de las mismas) en un único anticuerpo variante. Una variante funcional de una región V_L , V_H o CDR usada en el contexto de un anticuerpo anti-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 original y, en algunos casos, dicho anticuerpo anti-CD38 puede estar asociado con mayor afinidad, selectividad y/o especificidad que el anticuerpo original.

Dichas variantes funcionales normalmente conservan una identidad de secuencia significativa con el anticuerpo original. El porcentaje de identidad entre dos secuencias está en función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias (es decir, % de homología = n° de posiciones idénticas/ n° total de posiciones $\times$ 100), teniendo en cuenta el número de huecos, y la longitud de cada hueco, que es necesario introducir para la alineación óptima de las dos secuencias. La comparación de secuencias y la determinación del porcentaje de identidad entre dos secuencias se puede lograr usando un algoritmo matemático, como se describe en los ejemplos no limitantes a continuación.

El porcentaje de identidad entre dos secuencias de nucleótidos puede determinarse usando el programa GAP en el paquete de software GCG (disponible en <http://www.gcg.com>), usando una matriz NWSgapdna.CMP y un peso de huecos de 40, 50, 60, 70 u 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 puede determinarse usando 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), usando una tabla de peso de restos PAM120, una penalización por longitud de hueco de 12 y una penalización por hueco de 4. Además, el porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos se puede determinar usando Needleman y Wunsch, J. Mol. Biol. 48, 444-453 (1970)) algoritmo que se ha incorporado al programa GAP en el paquete de software GCG (disponible en <http://www.gcg.com>), usando una matriz Blossum 62 o una matriz PAM250, y un peso de hueco 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 variantes de CDR puede diferir de la secuencia de la CDR de las secuencias de anticuerpos originales por sustituciones principalmente conservadoras; 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 restos de aminoácidos conservadores. En el contexto de la presente invención, las sustituciones conservadoras pueden definirse por sustituciones dentro de las clases de aminoácidos reflejadas en una o más de las siguientes tres tablas:

Clases de restos de aminoácidos para sustituciones conservadoras

Restos ácidos	Asp (D) y Glu (E)
Restos básicos	Lys (K), Arg (R) y His (H)
Restos hidrófilos sin carga	Ser (S), Thr (T), Asn (N) y Gln (Q)
Restos alifáticos sin carga	Gly (G), Ala (A), Val (V), Leu (L) e Ile (I)

(continuación)

Restos no polares sin carga	Cys (C), Met (M) y Pro (P)
Restos aromáticos	Phe (F), Tyr (Y) y Trp (W)

Clases alternativas de sustituciones de restos de aminoácidos conservadoras

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

5

Clasificaciones físicas y funcionales alternativas de restos de aminoácidos

Restos que contienen grupos de alcohol	S y T
Restos alifáticos	I, L, V y M
Restos asociados a cicloalqueno	F, H, W e Y
Restos hidrófobos	A, C, F, G, H, I, L, M, R, T, V, W e Y
Restos con carga negativa	D y E
Restos polares	C, D, E, H, K, N, Q, R, S y T
Restos con carga positiva	H, K y R
Restos pequeños	A, C, D, G, N, P, S, T y V
Restos muy pequeños	A, G y S
Restos implicados en la formación de giros	A, C, D, E, G, H, K, N, Q, R, S, P y T
Restos flexibles	Q, T, K, S, G, P, D, E y R

Más agrupaciones de sustituciones conservadoras incluyen: valina-leucina-isoleucina, fenilalanina-tirosina, lisina-arginina, alanina-valina y asparagina-glutamina.

- 10 También se pueden formular grupos adicionales de aminoácidos usando los principios descritos en, por ejemplo, Creighton (1984) *Proteins: Structure and Molecular Properties* (2ª Ed. 1993), W.H. Freeman and Company.

15 Como se ha explicado anteriormente, normalmente, las alteraciones de la secuencia de aminoácidos, convenientemente no cambian sustancialmente las características estructurales de la secuencia original (por ejemplo, un aminoácido de reemplazo no debe tender a alterar la estructura secundaria que caracteriza la función de la secuencia original), pero pueden estar asociadas con propiedades ventajosas, tales como cambiar las propiedades funcionales o farmacocinéticas de los anticuerpos, por ejemplo, aumentar la semivida, alterar la inmunogenicidad, proporcionar un sitio para la unión covalente o no covalente con otra molécula, reducir la susceptibilidad a la proteólisis, reducir la susceptibilidad a la oxidación o alterar el patrón de glucosilación.

20 Son ejemplos de propiedades funcionales de anticuerpos, que se pueden alterar o conservar en anticuerpos anti-CD38 variantes de la presente invención en comparación con los anticuerpos de la técnica anterior son, por ejemplo:

- 25 (1) unión de alta afinidad con CD38 y/o
 (2) unión con células transfectadas, por ejemplo, células CHO o HEK293 que expresan CD38 y/o
 (3) inducción de CDC y/o
 (4) inducción de CCDA y/o
 (5) alteración de la actividad enzimática y/o
 (6) inducción de apoptosis después de la reticulación secundaria y/o
 30 (7) fagocitosis

35 El término "epítipo" significa una proteína determinante capaz de unirse específicamente con un anticuerpo. Los epítipos consisten habitualmente en agrupamientos de superficie de moléculas tales como aminoácidos o cadenas laterales de azúcar y habitualmente tienen características estructurales tridimensionales específicas, así como características de carga específicas. Los epítipos conformacionales y no conformacionales se distinguen porque la unión a los primeros pero no a los segundos se pierde en presencia de disolventes desnaturizantes. El epítipo puede comprender restos de aminoácidos directamente implicados en la unión (también denominado componente inmunodominante del epítipo) y otros restos de aminoácidos, que no están directamente implicados en la unión, tales como restos de aminoácidos que están efectivamente bloqueados por el péptido de unión específica a antígeno
 40 (en otras palabras, el resto de aminoácido está dentro de la huella del péptido de unión específica a antígeno).

Como se usa en el presente documento, un anticuerpo humano "procede de" una secuencia particular de línea

germinal si el anticuerpo se obtiene de un sistema que usa secuencias de inmunoglobulina humana, por ejemplo, inmunizando un ratón transgénico que porta genes de inmunoglobulina humana o explorando una biblioteca de genes de inmunoglobulina humana y en donde el anticuerpo humano seleccionado 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 % idéntico en secuencia de aminoácidos a la secuencia de aminoácidos codificada por el gen de inmunoglobulina de línea germinal. Normalmente, fuera de la CDR3 de cadena pesada, un anticuerpo humano derivado de una secuencia particular de línea germinal humana no presentará más de 20 diferencias de aminoácidos, por ejemplo, no más de 10 diferencias de aminoácidos, tales como no más de 5, por ejemplo, no más de 4, 3, 2 o 1 diferencia de aminoácidos de la secuencia de aminoácidos codificada por el gen de inmunoglobulina de línea germinal.

Como se usa en el presente documento, se entiende que la expresión "inhibe el crecimiento" (p. ej., en referencia a células, tales como células tumorales) incluye cualquier disminución medible en el crecimiento celular cuando se pone en contacto con un anticuerpo anti-CD38 en comparación con el crecimiento de las mismas células que no están en contacto con un anticuerpo anti-CD38, por ejemplo, la inhibición del crecimiento de un cultivo celular en al menos aproximadamente 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 99 % o 100 %. Dicha disminución del crecimiento celular puede producirse mediante una diversidad de mecanismos, por ejemplo, fagocitosis de células efectoras, CCDA, CDC y/o apoptosis.

Se entiende que la expresión "anticuerpo biespecífico" incluye cualquier anticuerpo que tenga dos especificidades de unión diferentes. La expresión "anticuerpos biespecíficos" también incluye diacuerpos (véase, por ejemplo, Holliger, P. *et al.*, PNAS USA 90, 6444-6448 (1993), Poljak, R.J. *et al.*, Structure 2, 1121-1123 (1994)).

Un "anticuerpo deficiente en la función efectora" o un "anticuerpo deficiente en la función efectora" se refiere a un anticuerpo que tiene una capacidad significativamente reducida o nula para activar uno o más mecanismos efectoras inmunitarios, tales como activación del complemento o unión con el receptor de Fc. Por tanto, los anticuerpos deficientes en la función efectora tienen una capacidad significativamente reducida o nula para mediar en la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (CCDA) y/o citotoxicidad dependiente del complemento (CDC).

La expresión "anticuerpo monovalente" significa en el contexto de la presente invención que una molécula de anticuerpo es capaz de unirse con una sola molécula del antígeno y por tanto no tiene capacidad de reticulación con el antígeno.

Como se usa en el presente documento, la expresión "célula efectora" se refiere a una célula inmunitaria que está implicada en la fase efectora de una respuesta inmunitaria, a diferencia de las fases cognitiva y de activación de una respuesta inmunitaria. Las células inmunitarias ejemplares incluyen una célula de origen mieloide o linfoide, por ejemplo, linfocitos (tales como células B y células T, incluyendo células T citolíticas (CTL, siglas del inglés *cytolytic T cells*)), linfocitos citolíticos, linfocitos citolíticos naturales, macrófagos, monocitos, eosinófilos, células polimorfonucleares, tales como neutrófilos, 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 anticuerpo (CCDA), tal como un linfocito citolítico natural, capaz de inducir CCDA. Por ejemplo, monocitos, macrófagos, que expresan FcR están implicados en la destrucción específica de células diana y en la presentación de antígenos a otros componentes del sistema inmunitario, o en la unión a células que presentan antígenos. En algunas realizaciones, una célula efectora puede fagocitar un antígeno diana o una célula diana.

Se entiende que el término "vector", como se usa en el presente documento, se refiere a una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico al que se ha unido. Diversos tipos de vectores son bien conocidos en la técnica. Un tipo de vector es un plásmido.

Se entiende que la expresión "célula hospedadora recombinante" (o simplemente "célula hospedadora"), como se usa en el presente documento, se refiere a una célula en la que se ha introducido un vector de expresión. Debería entenderse que se pretende que dichos términos se refieran no solo a la célula objeto particular, sino también a la descendencia de dicha célula. Debido a que pueden producirse determinadas modificaciones en generaciones sucesivas debido a mutaciones o influencias ambientales, dicha descendencia puede, de hecho, no ser idéntica a la célula principal, pero todavía se incluyen dentro del alcance de la expresión "célula hospedadora" como se usa en el presente documento. Las células hospedadoras recombinantes incluyen, por ejemplo, transfectomas, tales como células CHO, células HEK293, células NS/0 y células linfocíticas.

La expresión "animal no humano transgénico" se refiere a un animal no humano que tiene un genoma que comprende uno o más transgenes o transcromosomas de cadena pesada y/o ligera humana (integrados o no integrados en el ADN genómico natural del animal) y que es capaz de expresar anticuerpos completamente humanos. Por ejemplo, un ratón transgénico puede tener un transgén de cadena ligera humana y un transgén de cadena pesada humana o un transcromosoma de cadena pesada humana, de modo que el ratón produce anticuerpos humanos anti-CD38 cuando se inmuniza con antígeno CD38 y/o células que expresan CD38. El transgén de la cadena pesada humana puede integrarse en el ADN cromosómico del ratón, como sucede para

ratones transgénicos, por ejemplo, ratones HuMAb, tales como ratones HCo7 o HCo12, o el transgén de cadena pesada humana puede mantenerse extracromosómicamente, como sucede para ratones KM transcromosómicos como se describe en el documento WO02/43478. Dichos ratones transgénicos y transcromosómicos (denominados colectivamente en el presente documento "ratones transgénicos") son capaces de producir múltiples isotipos de anticuerpos monoclonales humanos para un antígeno dado (tal como IgG, IgA, IgM, IgD y/o IgE) sometidos a recombinación V-D-J y cambio de isotipo. También pueden usarse animales no humanos, transgénicos, para la producción de anticuerpos contra un antígeno específico mediante la introducción de genes que codifican dicho anticuerpo específico, por ejemplo, uniendo operativamente los genes a un gen que se expresa en la leche del animal.

Las expresiones "neoplasias de linfocitos B" o "neoplasias de linfocitos B maduros" en el contexto de la presente invención incluyen linfoma linfocítico pequeño, linfoma prolinfocítico de linfocitos B, leucemia linfocítica crónica de linfocitos B, linfoma de células del manto, linfoma de Burkitt, linfoma folicular, linfoma difuso de linfocitos B grandes, mieloma múltiple, linfoma linfoplasmacítico, linfoma esplénico de la zona marginal, neoplasias de células plasmáticas, tales como mieloma de células plasmáticas, plasmacitoma, enfermedad por depósito de inmunoglobulina monoclonal, enfermedad de cadena pesada, linfoma MALT, linfoma de linfocitos B marginal ganglionar, linfoma intravascular de células B grandes, linfoma de derrame primario, granulomatosis linfomatoide, linfoma no Hodgkin, linfoma de Hodgkin, tricoleucemia, linfoma de derrame primario y linfoma no Hodgkin relacionado con el SIDA.

"Tratamiento" se refiere a la administración de una cantidad eficaz de un anticuerpo terapéuticamente activo de la presente invención con el fin de facilitar, aliviar, detener o erradicar (curar) síntomas o patologías.

Una "cantidad eficaz" se refiere a una cantidad eficaz, a las dosis y durante los periodos de tiempo necesarios, para lograr un resultado terapéutico deseado. Una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo anti-CD38 puede variar según factores tales como la patología, la edad, el sexo y el peso del individuo, y la capacidad del anticuerpo anti-CD38 para inducir una respuesta deseada en el individuo. Una cantidad terapéuticamente eficaz también es una en la que cualquier efecto tóxico o perjudicial del anticuerpo o la parte de anticuerpo son compensados por los efectos terapéuticamente beneficiosos.

Un anticuerpo "antiidiotípico" (Id) es un anticuerpo que reconoce determinantes únicos generalmente asociados con el sitio de unión a antígeno de un anticuerpo.

Anticuerpos de la invención

La invención se refiere a un anticuerpo como se define en la reivindicación 1. El anticuerpo no se une a una variante de CD38 humana en donde Asp en la posición 202 se ha sustituido por Gly. En una realización, la CE50 de la unión del anticuerpo con la variante de CD38 humana en donde Asp en la posición 202 se ha sustituido por Gly es menor del 50 %, tal como menos del 10 %, menor del 5 % o menor del 1 % de la CE50 de la unión del anticuerpo con la CD38 humana.

El anticuerpo como se ha definido anteriormente se une a una variante de CD38 humana en donde la Gln en la posición 272 se ha sustituido por Arg. En una realización, la CE50 de la unión del anticuerpo con la variante de CD38 humana en donde la Gln en la posición 272 se ha sustituido por Arg es de al menos 80 %, tal como al menos 90 %, tal como al menos 95 %, tal como al menos 98 % de la CE50 de la unión del anticuerpo con CD38 humana.

El anticuerpo como se ha definido anteriormente se une a una variante de CD38 humana en donde la Ser en la posición 274 se ha sustituido por Phe. En una realización, la CE50 de la unión del anticuerpo con una variante de CD38 humana es al menos 75 %, tal como al menos 80 %, tal como al menos 90 %, tal como al menos 95 %, tal como al menos 98 % de la CE50 de la unión del anticuerpo con CD38 humana.

El anticuerpo como se ha definido anteriormente posee las siguientes características de unión: (i) no se une a una variante de CD38 humana en donde Asp en la posición 202 se ha sustituido por Gly, (ii) se une a una variante de CD38 humana en donde la Gln en la posición 272 se ha sustituido por Arg, (ii) se une a una variante de CD38 humana en donde la Ser en la posición 274 se ha sustituido por Phe.

En una realización, el anticuerpo como se ha definido en cualquiera de las realizaciones anteriores se une a CD38 humana y tiene un efecto inhibidor sobre la actividad ciclase de CD38 y un efecto estimulante sobre la actividad hidrolasa de CD38 como se mide en los ensayos del ejemplo 8, tal como en donde el efecto inhibidor es al menos 50-66 % en comparación con el efecto inhibidor sobre la actividad ciclase de CD38 en ausencia de anticuerpo.

En una realización, el anticuerpo como se ha definido en cualquiera de las realizaciones anteriores está codificado por un ácido nucleico de cadena pesada humana que comprende una secuencia de nucleótidos en su región variable como se expone en las SEQ ID NO: 1, 6, 11, 16 o 21 y un ácido nucleico de cadena ligera humana que comprende una secuencia de nucleótidos en su región variable como se expone en las SEQ ID NO: 26, 31, 36, 41 o 46.

En una realización, el anticuerpo como se ha definido en cualquiera de las realizaciones anteriores está codificado por una cadena pesada humana y un ácido nucleico de cadena ligera humana que comprende secuencias de nucleótidos en sus regiones variables como se expone en las SEQ ID NO: 1 y 26, 6 y 31, 11 y 36, 16 y 41 o 21 y 46, respectivamente.

En una realización, el anticuerpo como se ha definido en cualquiera de las realizaciones anteriores comprende una CDR3 de VH que comprende

- a) la secuencia como se expone en las SEQ ID NO: 5, 10, 15, 20 o 25 o
- b) una variante de dicha secuencia, tal como una variante que tiene como máximo 1, 2 o 3 modificaciones de aminoácidos, preferentemente sustituciones, tales como sustituciones conservadoras.

En una realización, el anticuerpo como se ha definido en cualquiera de las realizaciones anteriores comprende una CDR3 de VH que tiene la secuencia expuesta en las SEQ ID NO: 5, 10, 15, 20 o 25, y que comprende una CDR3 de VL que tiene la secuencia expuesta en las SEQ ID NO: 30, 35, 40, 45 o 50.

En una realización, el anticuerpo como se ha definido en cualquiera de las realizaciones anteriores comprende las SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 30, o SEQ ID NO: 10 y SEQ ID NO: 35, o SEQ ID NO: 15 y SEQ ID NO: 40, o SEQ ID NO: 20 y SEQ ID NO: 45, o SEQ ID NO: 25 y SEQ ID NO: 50 como las CDR3 de VH y CDR3 de VL, respectivamente.

En una realización, el anticuerpo como se ha definido en cualquiera de las realizaciones anteriores comprende

- (i) una CDR1 de VH que tiene la secuencia como se expone en cualquiera de las secuencias SEQ ID NO: 3, 8, 13, 18 y 23, una CDR2 de VH que tiene la secuencia como se expone en cualquiera de las secuencias SEQ ID NO: 4, 9, 14, 19 y 24, una CDR3 de VH que tiene la secuencia como se expone en cualquiera de las secuencias SEQ ID NO: 5, 10, 15, 20 y 25, una CDR1 de VL que tiene la secuencia como se expone en cualquiera de las secuencias SEQ ID NO: 28, 33, 38, 43 y 48, una CDR2 de VL que tiene la secuencia como se expone en cualquiera de las secuencias SEQ ID NO: 29, 34, 39, 44 y 49, una CDR3 de VL que tiene la secuencia como se expone en cualquiera de las secuencias SEQ ID NO: 30, 35, 40, 45 y 50,
- (ii) una CDR1 de VH que tiene la secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 3, una CDR2 de VH que tiene la secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 4, una CDR3 de VH que tiene la secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 5, una CDR1 de VL que tiene la secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 28, una CDR2 de VL que tiene la secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 29, una CDR3 de VL que tiene la secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 30,
- (iii) una CDR1 de VH que tiene la secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 8, una CDR2 de VH que tiene la secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 9, una CDR3 de VH que tiene la secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 10, una CDR1 de VL que tiene la secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 33, una CDR2 de VL que tiene la secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 34, una CDR3 de VL que tiene la secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 35,
- (iv) una CDR1 de VH que tiene la secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 13, una CDR2 de VH que tiene la secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 14, una CDR3 de VH que tiene la secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 15, una CDR1 de VL que tiene la secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 38, una CDR2 de VL que tiene la secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 39, una CDR3 de VL que tiene la secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 40,
- (v) una CDR1 de VH que tiene la secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 18, una CDR2 de VH que tiene la secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 19, una CDR3 de VH que tiene la secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 20, una CDR1 de VL que tiene la secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 43, una CDR2 de VL que tiene la secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 44, una CDR3 de VL que tiene la secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 45,
- (vi) una CDR1 de VH que tiene la secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 23, una CDR2 de VH que tiene la secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 24, una CDR3 de VH que tiene la secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 25, una CDR1 de VL que tiene la secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 48, una CDR2 de VL que tiene la secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 49, una CDR3 de VL que tiene la secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 50 o
- (vii) una variante de cualquiera de los anticuerpos definidos anteriormente, en donde dicha variante tiene preferentemente como máximo 1, 2 o 3 modificaciones de aminoácidos, más preferentemente sustituciones de aminoácidos, tales como sustituciones conservadoras de aminoácidos en una o más de dichas secuencias.

En una realización, el anticuerpo como se ha definido en cualquiera de las realizaciones anteriores comprende una región VH

- (i) que comprende la secuencia de las SEQ ID NO: 2, 7, 12, 17 o 22, o
- (ii) que tiene al menos 80 % de identidad, tal como 90 %, o 95 %, o 97 %, o 98 %, o 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de la región VH expuesta en las SEQ ID NO: 2, 7, 12, 17 o 22.

En una realización, el anticuerpo como se ha definido en cualquiera de las realizaciones anteriores comprende una región VL

- 5 (i) que comprende la secuencia de las SEQ ID NO: 27, 32, 37, 42 o 47 o
(ii) que tiene al menos 80 % de identidad, tal como 90 % o 95 % o 97 % o 98 % o 99 % o 100 % de identidad con una secuencia de región VL seleccionada del grupo que consiste en: las SEQ ID NO: 27, 32, 37, 42 o 47.

- 10 En una realización, el anticuerpo como se ha definido en cualquiera de las realizaciones anteriores comprende una región VH que comprende cualquiera de las secuencias de SEQ ID NO: 2, 7, 12, 17 y 22 y una región VL que comprende cualquiera de las secuencias de las SEQ ID NO: 27, 32, 37, 42 y 47.

En una realización, el anticuerpo como se ha definido en cualquiera de las realizaciones anteriores comprende

- 15 (i) una región VH que comprende la secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 2 y una región VL que comprende cualquiera de la secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 27,
(ii) una región VH que comprende la secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 7 y una región VL que comprende cualquiera de la secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 32,
20 (iii) una región VH que comprende la secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 12 y una región VL que comprende cualquiera de la secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 37,
(iv) una región VH que comprende la secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 17 y una región VL que comprende cualquiera de la secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 42 o
(v) una región VH que comprende la secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 22 y una región VL que comprende cualquiera de la secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 47.

- 25 La descripción también se refiere a un anticuerpo anti-CD38 que se une con el mismo epítipo en CD38 que un anticuerpo anti-CD38 como se ha descrito en una cualquiera de las realizaciones anteriores.

- 30 La divulgación también se refiere a un anticuerpo anti-CD38 que tiene sustancialmente las mismas características de unión específica para la unión con la CD38 humana que se han descrito en una cualquiera de las realizaciones anteriores.

- 35 En una realización, el anticuerpo como se ha definido en cualquiera de las realizaciones anteriores, es capaz de inducir citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (CCDA), tal como en células Daudi, preferentemente con un valor de CE_{50} de 5 nM o inferior, por ejemplo, 1 nM o inferior, tal como 0,2 nM o inferior, según lo determinado por el método descrito en el ejemplo 6 en el presente documento.

- 40 En una realización, el anticuerpo como se ha definido en cualquiera de las realizaciones anteriores, no es capaz de inducir CCDA en células Daudi según el método descrito en el ejemplo 6 en el presente documento.

- En una realización, el anticuerpo como se ha definido en cualquiera de las realizaciones anteriores no es capaz de inducir citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) en células CHO-CD38.

- 45 En una realización, el anticuerpo, como se ha definido en cualquiera de las realizaciones anteriores, se une a CD38 humana con una K_D de 10^{-8} M o inferior, preferentemente con una K_D de 10^{-9} M o inferior.

En una realización, el anticuerpo como se ha definido en cualquiera de las realizaciones anteriores es un anticuerpo monovalente humano.

- 50 En una realización, el anticuerpo como se ha definido en cualquiera de las realizaciones anteriores es un anticuerpo de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgD, IgA, IgE o IgM de longitud completa, tal como un anticuerpo IgG1, preferentemente un anticuerpo de IgG1, κ o un anticuerpo de IgM, preferentemente un anticuerpo IgM, κ .

- 55 En una realización, el anticuerpo como se ha definido en cualquiera de las realizaciones anteriores es un fragmento de anticuerpo o un anticuerpo de cadena sencilla.

En una realización, el anticuerpo como se ha definido en cualquiera de las realizaciones anteriores es un anticuerpo deficiente en función efectora, tal como un anticuerpo IgG4 humano estabilizado.

- 60 En una realización, dicho anticuerpo IgG4 estabilizado es un anticuerpo en donde la arginina en la posición 409 en la región constante de cadena pesada de IgG4 humana está sustituida con lisina, treonina, metionina o leucina, preferentemente lisina. En una realización, dicho anticuerpo comprende un resto de Lys en la posición correspondiente a 409 o la región CH3 del anticuerpo se ha reemplazado por la región CH3 de IgG1 humana, de IgG2 humana o de IgG3 humana. En una realización, dicho anticuerpo no comprende una secuencia Cys-Pro-Pro-Cys en la región de bisagra. En otra realización, dicho anticuerpo sí comprende una secuencia Cys-Pro-Pro-Cys en la región de bisagra.
- 65

En una realización, el anticuerpo como se ha definido en cualquiera de las realizaciones anteriores es un anticuerpo monovalente.

5 En una realización, dicho anticuerpo monovalente se construye mediante un método que comprende:

- i) proporcionar una construcción de ácido nucleico que codifica la cadena ligera de dicho anticuerpo monovalente, comprendiendo dicha construcción una secuencia de nucleótidos que codifica la región VL de las SEQ ID NO: 27, 32, 37, 42 o 47 y una secuencia de nucleótidos que codifica la región CL constante de una Ig, en donde dicha secuencia de nucleótidos que codifica la región VL de un anticuerpo específico de antígeno seleccionado y dicha secuencia de nucleótidos que codifica la región CL de una Ig están unidas operativamente entre sí, y en donde, en caso de un subtipo IgG1, la secuencia de nucleótidos que codifica la región CL se ha modificado de modo que la región CL no contenga ningún aminoácido capaz de formar enlaces disulfuro o enlaces covalentes con otros péptidos que comprendan una secuencia de aminoácidos idéntica de la región CL en presencia de IgG policlonal humana o cuando se administra a un animal o ser humano;
- 10 ii) proporcionar una construcción de ácido nucleico que codifica la cadena pesada de dicho anticuerpo monovalente, comprendiendo dicha construcción una secuencia de nucleótidos que codifica la región VH de las SEQ ID NO: 2, 7, 12, 17 o 22 y una secuencia de nucleótidos que codifica una región CH constante de una Ig humana, en donde la secuencia de nucleótidos que codifica la región CH se ha modificado de manera que la región correspondiente a la región de bisagra y, según lo requiera el subtipo de Ig, otras regiones de la región CH, tales como la región CH3, no comprenda ningún resto de aminoácido que participe en la formación de enlaces disulfuro o enlaces entre cadenas pesadas covalentes o no covalentes estables con otros péptidos que comprenden una secuencia de aminoácidos idéntica de la región CH de la Ig humana en presencia de IgG policlonal humana o cuando se administra a un ser humano o animal, en donde dicha secuencia de nucleótidos que codifica la región VH de un anticuerpo específico de antígeno seleccionado y dicha secuencia de nucleótidos que codifica la región CH de dicha Ig están unidas operativamente entre sí;
- 15 iii) proporcionar un sistema de expresión celular para producir dicho anticuerpo monovalente;
- iv) producir dicho anticuerpo monovalente coexpresando las construcciones de ácido nucleico de (i) y (ii) en células del sistema de expresión celular de (iii).

30 En una realización, la región C_H que comprende las regiones C_H2 y C_H3 se ha modificado de modo que la región correspondiente a la región de bisagra y, si la inmunoglobulina no es un subtipo IgG4, otras regiones de la región C_H, tales como la región C_H3, no comprendan ningún resto de aminoácido, que sean capaces de formar enlaces disulfuro con una región C_H idéntica u otros enlaces entre cadenas pesadas covalentes o no covalentes estables con una región C_H idéntica en presencia de IgG policlonal humana.

40 En una realización, dicho anticuerpo monovalente es del subtipo IgG4, pero la región C_H3 se ha modificado para que se hayan realizado una o más de las siguientes sustituciones de aminoácidos: Thr (T) en la posición 366 se ha reemplazado por Ala (A); Leu (L) en la posición 368 se ha reemplazado por Ala (A); Leu (L) en la posición 368 se ha reemplazado por Val (V); Phe (F) en la posición 405 se ha reemplazado por Ala (A); Phe (F) en la posición 405 se ha reemplazado por Leu (L); Tyr (Y) en la posición 407 se ha reemplazado por Ala (A); Arg (R) en la posición 409 se ha reemplazado por Ala (A).

45 En una realización, la cadena pesada de dicho anticuerpo monovalente se ha modificado de modo que se ha suprimido la bisagra completa.

En una realización, la secuencia de dicho anticuerpo monovalente se ha modificado de modo que no comprenda ningún sitio aceptor para glucosilación ligada a N.

50 En una realización, el anticuerpo como se ha definido en cualquiera de las realizaciones anteriores inhibe la síntesis catalizada por CD38 de GDP^{Rc} en al menos 25 %, tal como al menos 30 % después de 90 minutos a una concentración de 3 µg/ml según lo determinado por el método espectrofotométrico descrito en el ejemplo 8 de la memoria descriptiva.

55 En una realización, el anticuerpo como se ha definido en cualquiera de las realizaciones anteriores inhibe la síntesis catalizada por CD38 de ADP^{Rc} en al menos 25 %, tal como al menos 30 % después de 90 minutos a una concentración de 3 µg/ml según lo determinado por el método de HPLC descrito en Munshi *et al.*, J. Biol. Chem. 275, 21566-21571 (2000).

60 En una realización, el anticuerpo estimula la actividad hidrolasa de CD38 en al menos 25 %.

En una realización, el anticuerpo estimula la actividad NAD hidrolasa de CD38 en al menos 25 %.

65 En una realización, el anticuerpo como se ha definido en cualquiera de las realizaciones anteriores estimula la actividad ADP^{Rc}-hidrolasa de CD38 en al menos 25 %.

En una realización, el anticuerpo como se ha definido en cualquiera de las realizaciones anteriores inhibe la capacidad de CD38 para catalizar la formación, a través de una reacción de intercambio de bases, de NAADP con una CI50 inferior a 0,5 µg/ml, tal como inferior a 0,2 µg/ml por el método descrito en el ejemplo 8 de la memoria descriptiva.

5 En una realización, la invención se refiere a un conjugado de anticuerpo-fármaco que comprende un anticuerpo como se define en cualquiera de las realizaciones anteriores, en donde el anticuerpo se ha conjugado con un agente citotóxico, un radioisótopo o un fármaco. En una realización, el anticuerpo se ha conjugado con una auristatina o un análogo peptídico funcional o derivado del mismo a través de un conector.

10 En una realización, la invención se refiere a un anticuerpo biespecífico que comprende un anticuerpo como se ha definido en cualquiera de las realizaciones anteriores y una segunda especificidad de unión para una célula efectora humana o un antígeno canceroso. En una realización, la segunda especificidad de unión es para un receptor de Fc humano o para un receptor de linfocitos T, tal como CD3.

15 En una realización, la invención se refiere a un ácido nucleico aislado que codifica un anticuerpo como se ha definido en cualquiera de las realizaciones anteriores.

20 En una realización, la invención se refiere a un vector de expresión que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una o más de las secuencias de aminoácidos como se ha definido en cualquiera de las realizaciones anteriores.

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

25 En una realización, la invención se refiere a una célula hospedadora recombinante eucariota o procariota que produce un anticuerpo como se ha definido en cualquiera de las realizaciones anteriores.

30 En una realización, la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo, un inmunoconjugado, un anticuerpo biespecífico o un vector de expresión como se ha definido en cualquiera de las realizaciones anteriores y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

En una realización, la invención se refiere a un anticuerpo como se ha definido en cualquiera de las realizaciones anteriores para su uso como medicamento.

35 La divulgación también se refiere a un anticuerpo como se ha definido en cualquiera de las realizaciones anteriores para su uso en la inhibición del crecimiento y/o la proliferación, migración o inducción de fagocitosis de una célula tumoral que expresa CD38.

40 En una realización, la invención se refiere a un anticuerpo como se ha definido en cualquiera de las realizaciones anteriores para su uso en el tratamiento de la artritis reumatoide.

45 En una realización, la invención se refiere a un anticuerpo como se ha definido en cualquiera de las realizaciones anteriores para su uso en el tratamiento de un trastorno seleccionado de leucemia linfocítica crónica (LLC), leucemia linfoblástica aguda (LLA), leucemia mielógena aguda (LMA) (en adultos), linfoma de células del manto, linfoma folicular y linfoma difuso de linfocitos B grandes.

En una realización, la invención se refiere a un anticuerpo como se ha definido en cualquiera de las realizaciones anteriores para su uso en el tratamiento del mieloma múltiple.

50 En una realización, la invención se refiere a un método para producir un anticuerpo anti-CD38 como se ha definido en cualquiera de las realizaciones anteriores, comprendiendo dicho método las etapas de

- 55 a) cultivar una célula hospedadora como se ha definido en cualquiera de las realizaciones anteriores, y
b) purificar el anticuerpo anti-CD38 de los medios de cultivo.

La divulgación también se refiere a una composición de diagnóstico que comprende un anticuerpo como se ha definido en cualquiera de las realizaciones anteriores.

60 En una realización, la invención se refiere a un método para detectar, en una muestra, la presencia de antígeno CD38, o de una célula que exprese CD38, que comprende:

- 65 - poner en contacto la muestra con un anticuerpo anti-CD38 como se ha definido en cualquiera de las realizaciones anteriores, en condiciones que permitan la formación de un complejo entre el anticuerpo o moléculas biespecíficas y CD38; y
- analizar si se ha formado un complejo.

En una realización, la invención se refiere a un kit para detectar, en una muestra, la presencia de antígeno CD38, o de una célula que exprese CD38, comprendiendo el kit un anticuerpo anti-CD38 como se ha definido en cualquiera de las realizaciones anteriores e instrucciones para el uso del kit.

5 En una realización, la invención se refiere a un anticuerpo antiidiotípico que se une con un anticuerpo anti-CD38 como se ha definido en cualquiera de las realizaciones anteriores.

10 La divulgación también se refiere a un método para inhibir el crecimiento y/o la proliferación, migración o inducción de la fagocitosis de una célula que expresa CD38, que comprende administración de un anticuerpo, un inmunoconjugado, un anticuerpo biespecífico, un vector de expresión o una composición farmacéutica como se ha definido en cualquiera de las realizaciones anteriores, de modo que se inhiban el crecimiento y/o la proliferación, la migración o la fagocitosis de la célula.

15 La divulgación también se refiere a un método para tratar una enfermedad o trastorno que implica células que expresan CD38 en un sujeto, comprendiendo dicho método la administración de un anticuerpo, un inmunoconjugado, un anticuerpo biespecífico, un vector de expresión o una composición farmacéutica como se ha definido en cualquiera de las realizaciones anteriores a un sujeto que lo necesite.

20 En una realización, la enfermedad o el trastorno es artritis reumatoide.

En otra realización, la enfermedad o el trastorno se selecciona de leucemia linfocítica crónica (LLC), leucemia linfoblástica aguda (LLA), leucemia mielógena aguda (LMA) (en adultos), linfoma de células del manto, linfoma folicular y linfoma difuso de linfocitos B grandes.

25 En otra realización más, la enfermedad o el trastorno es mieloma múltiple.

En una realización, el método como se ha definido en cualquiera de las realizaciones anteriores comprende la administración de uno o más agentes terapéuticos adicionales al sujeto, tales como uno o más agentes terapéuticos adicionales se seleccionan de un agente quimioterapéutico, un agente antiinflamatorio o un agente inmunosupresor y/o inmunomodulador. En una realización, el o los agentes terapéuticos adicionales se seleccionan de un grupo que consiste en cisplatino, gefitinib, cetuximab, rituximab, ofatumumab, bevacizumab, erlotinib, bortezomib, talidomida, pamidronato, ácido zoledrónico, clodronato, risendronato, ibandronato, etidronato, alendronato, tiludronato, trióxido de arsénico, lenalidomida, dexametasona, prednisolona, filgrastim, pegfilgrastim, sargramostim, ácido hidroxámico de suberoilánilida y SCIO-469.

30 El anticuerpo de la invención no se une a una variante de CD38 humana en donde Asp en la posición 202 se ha sustituido por Gly.

40 Una realización de la invención proporciona un anticuerpo según la realización anterior, en donde la CE50 de la unión del anticuerpo con una variante de CD38 humana es menor del 50 %, tal como menos del 10 %, menor del 5 % o menor del 1 % de la CE50 de la unión del péptido con la CD38 humana.

45 El anticuerpo de la invención se une a una variante de CD38 humana en donde la Gln en la posición 272 se ha sustituido por Arg al mismo grado que se une con la CD38 humana.

Una realización de la invención proporciona un anticuerpo según la realización anterior, en donde la CE50 de la unión del anticuerpo con una variante de CD38 humana es al menos 80 %, tal como al menos 90 %, tal como al menos 95 %, tal como al menos 98 % de la CE50 de la unión del péptido con la CD38 humana.

50 El anticuerpo de la invención se une a una variante de CD38 humana en donde la Ser en la posición 274 se ha sustituido por Phe al mismo grado que se une con la CD38 humana.

55 Una realización de la invención proporciona un anticuerpo según la realización anterior, en donde la CE50 de la unión del anticuerpo con una variante de CD38 humana es al menos 75 %, tal como al menos 80 %, tal como al menos 90 %, tal como al menos 95 %, tal como al menos 98 % de la CE50 de la unión del péptido con la CD38 humana.

60 El anticuerpo de la invención posee las siguientes características de unión: (i) no se une a una variante de CD38 humana en donde la Asp en la posición 202 se ha sustituido por Gly (ii) se une a una variante de CD38 humana en donde la Gln en la posición 272 se ha sustituido por Arg (iii) se une a una variante de CD38 humana en donde la Ser en la posición 274 se ha sustituido por Phe.

65 Una realización de la invención proporciona un anticuerpo según cualquiera de las realizaciones anteriores, que se une con CD38 humana y tiene un efecto inhibidor sobre la actividad ciclasa de CD38 y un efecto estimulante sobre la actividad hidrolasa de CD38 como se mide en los ensayos del ejemplo 8.

- Una realización de la invención proporciona un anticuerpo según la realización anterior, en donde el efecto inhibidor es al menos 50-66 % en comparación con CD38 solo. En una realización, el anticuerpo de la invención está codificado por un ácido nucleico de cadena pesada humana que comprende secuencias de nucleótidos en sus regiones variables como se expone en las SEQ ID NO: 1, 6, 11, 16 o 21 y una cadena ligera humana que comprende secuencias de nucleótidos en sus regiones variables como se expone en las SEQ ID NO: 26, 31, 36, 41 o 46 y que comprende modificaciones de secuencia conservadoras de las secuencias expuestas anteriormente.
- Una realización de la invención proporciona un anticuerpo según la realización anterior, codificado por ácidos nucleicos de una cadena pesada humana y una cadena ligera humana que comprenden secuencias de nucleótidos en sus regiones variables como se expone en las SEQ ID NO: 1 y 26, 6 y 31, 11 y 36, 16 y 41 o 21 y 46, respectivamente, y que comprende modificaciones de secuencia conservadoras de las secuencias expuestas anteriormente.
- En una realización, la invención de anticuerpos de la invención comprende una región CDR3 de VH que tiene
- la secuencia como se expone en las SEQ ID NO: 5, 10, 15, 20 o 25, 30 o
 - una variante de dicha secuencia, tal como una variante que tiene como máximo 1, 2 o 3 modificaciones de aminoácidos, preferentemente sustituciones, tales como sustituciones conservadoras.
- En una realización, el anticuerpo de la invención comprende una región CDR3 de VH que tiene la secuencia como se expone en las SEQ ID NO: 5, 10, 15, 20, 25 o 30 y que comprende una CDR3 de VL que tiene la secuencia expuesta en las SEQ ID NO: 30, 35, 40, 45 o 50;
- En una realización, el anticuerpo de la invención comprende una región CDR3 de VH que tiene la secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 5 y una región CDR3 de VL que comprende la SEQ ID NO: 30, o la SEQ ID NO: 10 y la SEQ ID NO: 35, o la SEQ ID NO: 15 y la SEQ ID NO: 40, o la SEQ ID NO: 20 y la SEQ ID NO: 45, o la SEQ ID NO: 25 y la SEQ ID NO: 45 o la SEQ ID NO: 30 y la SEQ ID NO: 50, como región CDR3 de VH y región CDR3 de VL, respectivamente.
- Una realización de la invención proporciona un anticuerpo anti-CD38 según cualquiera de las realizaciones anteriores, en donde el anticuerpo comprende una región CDR1 de VH que tiene la secuencia como se expone en cualquiera de las secuencias SEQ ID NO: 3, 8, 13, 18 o 23, una región CDR2 de VH que tiene la secuencia como se expone en cualquiera de las secuencias SEQ ID NO: 4, 9, 14, 19 o 24, una región CDR3 de VL que tiene la secuencia como se expone en cualquiera de las secuencias SEQ ID NO: 30, 35, 40, 45 o 50 y una región CDR3 de VH que tiene la secuencia expuesta en las SEQ ID NO: 5, 10, 15, 20 o 25.
- En una realización, el anticuerpo de la invención comprende una región CDR1 de VH que tiene la secuencia como se expone en cualquiera de las secuencias SEQ ID NO: 3, 8, 13, 18 o 23, una región CDR2 de VH que tiene la secuencia como se expone en cualquiera de las secuencias SEQ ID NO: 4, 9, 14, 19 o 24, una región CDR3 de VH que tiene la secuencia como se expone en las SEQ ID NO: 5, 10, 15, 20 o 25, una región CDR1 de VL como se expone en las SEQ ID NO: 28, 33, 38, 43 o 48, una región CDR2 de VL como se expone en las SEQ ID NO: 29, 34, 39, 44 o 49, una región CDR3 de VL que tiene la secuencia como se expone en cualquiera de las secuencias SEQ ID NO: 30, 35, 40, 45 o 50 o una variante de dicho anticuerpo, en donde dicha variante tiene preferentemente como máximo 1, 2 o 3 modificaciones de aminoácidos, más preferentemente sustituciones de aminoácidos, tales como sustituciones de aminoácidos conservadoras en dichas secuencias.
- En una realización, el anticuerpo de la invención comprende una región CDR1 de VH que tiene la secuencia como se expone en cualquiera de las secuencias SEQ ID NO: 3, 8, 13, 18 o 23, una región CDR2 de VH que tiene la secuencia como se expone en cualquiera de las secuencias SEQ ID NO: 4, 9, 14, 19 o 24, una región CDR3 de VH que tiene la secuencia como se expone en las SEQ ID NO: 5, 10, 15, 20 o 25, una región CDR1 de VL como se expone en las SEQ ID NO: 28, 33, 38, 43 o 48, una región CDR2 de VL como se expone en las SEQ ID NO: 29, 34, 39, 44 o 49, una región CDR3 de VL que tiene la secuencia como se expone en cualquiera de las secuencias SEQ ID NO: 30, 35, 40, 45 o 50;
- Una realización de la invención proporciona un anticuerpo anti-CD38 según cualquiera de las realizaciones anteriores, que comprende un VH que tiene al menos 80 % de identidad, tal como 90 %, o 95 %, o 97 %, o 98 %, o 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de la región VH expuesta en las SEQ ID NO: 2, 7, 12, 17 o 22.
- Una realización de la invención proporciona un anticuerpo anti-CD38 según cualquiera de las realizaciones anteriores, que comprende un VL que tiene al menos 80 % de identidad, tal como 90 % o 95 % o 97 % o 98 % o 99 % o 100 % de identidad con una secuencia de región VL seleccionada del grupo que consiste en: las SEQ ID NO: 27, 32, 37, 42 o 47.

Una realización de la invención proporciona un anticuerpo anti-CD38 según cualquiera de las realizaciones anteriores, que comprende una región VH que comprende la secuencia de las SEQ ID NO: 2, 7, 12, 17 o 22 y una región VL que comprende la secuencia de las SEQ ID NO: las SEQ ID NO: 27, 32, 37, 42 o 47.

- 5 Una realización de la divulgación proporciona un anticuerpo que compite con un anticuerpo según cualquiera de las realizaciones anteriores por la unión con CD38.

- 10 Una realización de la divulgación proporciona un anticuerpo anti-CD38, que compite por la unión de CD38 con un anticuerpo anti-CD38 que comprende una región VH que comprende cualquiera de las secuencias de las SEQ ID NO: 2, 7, 12, 17 o 22 y una región VL que comprende cualquiera de las secuencias de las SEQ ID NO: 27, 32, 37, 42 o 47.

- 15 La divulgación también proporciona un anticuerpo anti-CD38 según cualquiera de las realizaciones anteriores, en donde el anticuerpo se une con el mismo epítipo en CD38 que un anticuerpo anti-CD38 como se ha descrito en cualquiera de las realizaciones anteriores.

La divulgación también proporciona un anticuerpo que tiene sustancialmente las mismas características de unión específica para unir la CD38 humana que tiene un anticuerpo según cualquiera de las realizaciones anteriores.

- 20 Una realización de la invención proporciona un anticuerpo anti-CD38 según cualquiera de las realizaciones anteriores, en donde el anticuerpo es capaz de inducir citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) en células CHO-CD38.

- 25 Una realización de la invención proporciona un anticuerpo anti-CD38 según cualquiera de las realizaciones anteriores, en donde el anticuerpo es capaz de inducir citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (CCDA).

En el presente documento también se desvela un anticuerpo anti-CD38, en donde dicho anticuerpo induce CCDA en células Daudi, preferentemente con un valor de CE_{50} de 5 nM o inferior, por ejemplo, 1 nM o inferior, tal como 0,2 nM o inferior, según lo determinado por el método descrito en el ejemplo 6 en el presente documento.

- 30 Una realización de la invención proporciona un anticuerpo anti-CD38 según cualquiera de las realizaciones anteriores, en donde el anticuerpo no es capaz de inducir CCDA.

- 35 Una realización de la invención proporciona un anticuerpo anti-CD38 según cualquiera de las realizaciones anteriores, en donde el anticuerpo no es capaz de inducir citotoxicidad dependiente del complemento (CDC).

Una realización de la invención proporciona un anticuerpo anti-CD38 según cualquiera de las realizaciones anteriores, en donde el anticuerpo se une a la CD38 humana con una K_D de 10^{-8} M o inferior, preferentemente con una K_D de 10^{-9} M o inferior.

- 40 Una realización de la invención proporciona un anticuerpo anti-CD38 según cualquiera de las realizaciones anteriores, en donde el anticuerpo comprende:

- 45 - una región variable de cadena pesada procedente de una secuencia de V_H de línea germinal humana seleccionada del grupo que consiste en: IGHV1-69*04 y/o IGHJ3*02
- una región variable de cadena ligera procedente de una secuencia de V_k de línea germinal humana seleccionada del grupo que consiste en: IGKV1D-16*01 y/o IGKJ4*01.

- 50 Una realización de la invención proporciona un anticuerpo anti-CD38 según cualquiera de las realizaciones anteriores, que es un anticuerpo humano.

- 55 Una realización de la invención proporciona un anticuerpo según cualquiera de las realizaciones anteriores, caracterizado por que es un anticuerpo de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgD, IgA, IgE o IgM de longitud completa, tal como un anticuerpo IgG1, preferentemente un anticuerpo de IgG1, κ o un anticuerpo de IgM, preferentemente un anticuerpo IgM, κ .

Una realización de la invención proporciona un anticuerpo anti-CD38 según cualquiera de las realizaciones anteriores, en donde el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo o un anticuerpo de cadena sencilla.

- 60 Una realización de la invención proporciona un anticuerpo anti-CD38 según cualquiera de las realizaciones anteriores, en donde el anticuerpo se conjuga con otro resto, tal como un resto citotóxico, un radioisótopo o un fármaco.

- 65 Una realización de la invención proporciona un anticuerpo anti-CD38 según cualquiera de las realizaciones anteriores, en donde el anticuerpo es un anticuerpo deficiente en función efectora.

Una realización de la invención proporciona un anticuerpo anti-CD38 de la realización anterior, en donde el anticuerpo anti-CD38 deficiente en función efectora es un anticuerpo IgG4 humano estabilizado.

5 Una realización de la invención proporciona un anticuerpo anti-CD38 de la realización anterior, en donde el anticuerpo IgG4 estabilizado es un anticuerpo en donde la arginina en la posición 409 en la región constante de cadena pesada de IgG4 humana está sustituida con lisina, treonina, metionina o leucina, preferentemente lisina.

10 Una realización de la invención proporciona un anticuerpo anti-CD38 de la realización anterior, en donde dicho anticuerpo comprende un resto de Lys en la posición correspondiente a 409 o la región CH3 del anticuerpo se ha reemplazado por la región CH3 de IgG1 humana, de IgG2 humana o de IgG3 humana.

Una realización de la invención proporciona un anticuerpo anti-CD38 de las realizaciones anteriores, en donde dicho anticuerpo no comprende una secuencia Cys-Pro-Pro-Cys en la región de bisagra.

15 Una realización de la invención proporciona un anticuerpo anti-CD38 de las realizaciones anteriores, en donde dicho anticuerpo sí comprende una secuencia Cys-Pro-Pro-Cys en la región de bisagra.

20 Una realización de la invención proporciona un anticuerpo anti-CD38 según cualquiera de las realizaciones anteriores, en donde el anticuerpo es un anticuerpo monovalente.

Una realización de la invención proporciona un anticuerpo anti-CD38 de la realización anterior, en donde dicho anticuerpo monovalente se construye mediante un método que comprende:

25 i) proporcionar una construcción de ácido nucleico que codifica la cadena ligera de dicho anticuerpo monovalente, comprendiendo dicha construcción una secuencia de nucleótidos que codifica la región VL de un anticuerpo específico de antígeno seleccionado y una secuencia de nucleótidos que codifica la región CL constante de una Ig, en donde dicha secuencia de nucleótidos que codifica la región VL de un anticuerpo específico de antígeno seleccionado y dicha secuencia de nucleótidos que codifica la región CL de una Ig están unidas operativamente entre sí, y en donde, en caso de un subtipo IgG1, la secuencia de nucleótidos que

30 codifica la región CL se ha modificado de modo que la región CL no contenga ningún aminoácido capaz de formar enlaces disulfuro o enlaces covalentes con otros péptidos que comprendan una secuencia de aminoácidos idéntica de la región CL en presencia de IgG policlonal humana o cuando se administra a un animal o ser humano;

35 ii) proporcionar una construcción de ácido nucleico que codifica la cadena pesada de dicho anticuerpo monovalente, comprendiendo dicha construcción una secuencia de nucleótidos que codifica la región VH de un anticuerpo específico de antígeno seleccionado y una secuencia de nucleótidos que codifica una región CH constante de una Ig humana, en donde la secuencia de nucleótidos que codifica la región CH se ha modificado de manera que la región correspondiente a la región de bisagra y, según lo requiera el subtipo de Ig, otras regiones de la región CH, tales como la región CH3, no comprenda ningún resto de aminoácido que participe en

40 la formación de enlaces disulfuro o enlaces entre cadenas pesadas covalentes o no covalentes estables con otros péptidos que comprenden una secuencia de aminoácidos idéntica de la región CH de la Ig humana en presencia de IgG policlonal humana o cuando se administra a un ser humano o animal, en donde dicha secuencia de nucleótidos que codifica la región VH de un anticuerpo específico de antígeno seleccionado y dicha secuencia de nucleótidos que codifica la región CH de dicha Ig están unidas operativamente entre sí;

45 iii) proporcionar un sistema de expresión celular para producir dicho anticuerpo monovalente;

iv) producir dicho anticuerpo monovalente coexpresando las construcciones de ácido nucleico de (i) y (ii) en células del sistema de expresión celular de (iii).

50 Una realización de la invención proporciona un anticuerpo anti-CD38 de la realización anterior, en donde el anticuerpo monovalente comprende

(i) una región variable de un anticuerpo según cualquiera de las realizaciones anteriores, o una parte de unión a antígeno de dicha región, y

55 (ii) una región C_H de una inmunoglobulina o un fragmento de la misma que comprende las regiones C_H2 y C_H3, en donde la región C_H o fragmento de la misma se ha modificado de modo que la región correspondiente a la región de bisagra y, si la inmunoglobulina no es un subtipo IgG4, otras regiones de la región C_H, tales como la región C_H3, no comprendan ningún resto de aminoácido, que sean capaces de formar enlaces disulfuro con una región C_H idéntica u otros enlaces entre cadenas pesadas covalentes o no covalentes estables con una región C_H idéntica en presencia de IgG policlonal humana.

60 Una realización de la invención proporciona un anticuerpo anti-CD38 de las realizaciones anteriores en donde dicho anticuerpo monovalente es del subtipo IgG4, pero la región C_H3 se ha modificado para que se hayan realizado una o más de las siguientes sustituciones de aminoácidos: Thr (T) en la posición 366 se ha reemplazado por Ala (A); Leu (L) en la posición 368 se ha reemplazado por Ala (A); Leu (L) en la posición 368 se ha reemplazado por Val (V); Phe (F) en la posición 405 se ha reemplazado por Ala (A); Phe (F) en la posición 405 se ha reemplazado por Leu (L); Tyr (Y) en la posición 407 se ha reemplazado por Ala (A); Arg (R) en la posición 409 se ha reemplazado por Ala (A).

Una realización de la invención proporciona un anticuerpo anti-CD38 de cualquiera de las realizaciones anteriores, la cadena pesada se ha modificado de modo que se haya suprimido la bisagra completa.

- 5 Una realización de la invención proporciona un anticuerpo anti-CD38 de cualquiera de las realizaciones anteriores, en donde la secuencia de dicho anticuerpo monovalente se ha modificado de modo que no comprenda ningún sitio aceptor para glucosilación ligada a N.

- 10 Una realización de la invención proporciona un anticuerpo según cualquiera de las realizaciones anteriores, que inhibe la síntesis de GDPRc en al menos 25 %, tal como al menos 30 % después de 90 minutos según lo determinado por el método espectrofotométrico descrito en el ejemplo 8 de la memoria descriptiva.

- 15 Una realización de la invención proporciona un anticuerpo según cualquiera de las realizaciones anteriores que inhibe la síntesis de ADPRc en al menos 25 %, tal como al menos 30 % después de 90 minutos a una concentración de 3 µg/ml según lo determinado por el método de HPLC descrito en Munshi *et al.*, J. Biol. Chem. 275, 21566-21571 (2000).

- 20 Una realización de la invención proporciona un anticuerpo según cualquiera de las realizaciones anteriores, que estimula la actividad hidrolasa de CD38 en al menos 25 %.

Una realización de la invención proporciona un anticuerpo según cualquiera de las realizaciones anteriores, que estimula la actividad NAD hidrolasa en al menos 25 %.

- 25 Una realización de la invención proporciona un anticuerpo según cualquiera de las realizaciones anteriores, que estimulan la actividad ADPRc-hidrolasa en al menos 25 %.

Una realización de la invención proporciona un ácido nucleico aislado que codifica un anticuerpo según cualquiera de las realizaciones anteriores.

- 30 Una realización la invención proporciona un vector de expresión que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una o más de las secuencias de aminoácidos según cualquiera de las realizaciones anteriores.

- 35 Una realización de la invención proporciona un vector de expresión según la realización anterior, que comprende además una secuencia de nucleótidos que codifica la región constante de una cadena ligera, una cadena pesada o cadenas tanto ligera como pesada de un anticuerpo humano.

Una realización de la invención proporciona una célula hospedadora recombinante eucariota o procariota que produce un anticuerpo como se ha definido en una cualquiera de las realizaciones anteriores.

- 40 La divulgación también proporciona un hibridoma que produce un anticuerpo como se ha definido en cualquiera de las realizaciones anteriores.

- 45 Una realización de la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo como se ha definido en cualquiera de las realizaciones anteriores y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Una realización de la invención proporciona un anticuerpo como se ha definido en cualquiera de las realizaciones anteriores para su uso como medicamento.

- 50 La divulgación también proporciona un anticuerpo como se ha definido en cualquiera de las realizaciones anteriores para su uso en la inhibición del crecimiento y/o la proliferación, migración o inducción de fagocitosis de una célula tumoral que expresa CD38.

- 55 Una realización de la invención proporciona un anticuerpo como se ha definido en cualquiera de las realizaciones anteriores para su uso en el tratamiento de la artritis reumatoide.

Una realización de la invención proporciona un anticuerpo como se ha definido en cualquiera de las realizaciones anteriores para su uso en el tratamiento de mieloma múltiple.

- 60 Una realización de la invención proporciona un anticuerpo como se ha definido en cualquiera de las realizaciones anteriores para su uso en el tratamiento de la esclerosis múltiple.

- 65 Una realización de la invención proporciona un anticuerpo como se ha definido en cualquiera de las realizaciones anteriores para su uso en el tratamiento de neoplasias de linfocitos B, tales como cualquiera de las siguientes: linfoma linfocítico pequeño, linfoma prolinfocítico de linfocitos B, leucemia linfocítica crónica de linfocitos B, linfoma de células del manto, linfoma de Burkitt, linfoma folicular, linfoma difuso de linfocitos B grandes, mieloma múltiple, linfoma linfoplasmacítico, linfoma esplénico de la zona marginal, neoplasias de células plasmáticas, tales como

mieloma de células plasmáticas, plasmacitoma, enfermedad por depósito de inmunoglobulina monoclonal, enfermedad de cadena pesada, linfoma MALT, linfoma de linfocitos B marginal ganglionar, linfoma intravascular de células B grandes, linfoma de derrame primario, granulomatosis linfomatoide, linfoma no Hodgkin, linfoma de Hodgkin, tricoleucemia, linfoma de derrame primario o linfoma no Hodgkin relacionado con SIDA

5 La divulgación también proporciona un método para inhibir el crecimiento y/o la proliferación, migración o inducción de fagocitosis de una célula tumoral que expresa CD38, que comprende administración, a un individuo que lo necesite, de un anticuerpo de cualquiera de las realizaciones anteriores.

10 La divulgación también proporciona un método para producir un anticuerpo anti-CD38 de cualquiera de las realizaciones anteriores, comprendiendo dicho método las etapas de

- a) cultivar una célula hospedadora o un hibridoma de la realización anterior y
- b) purificar el anticuerpo anti-CD38 de los medios de cultivo.

15 La divulgación también proporciona una composición de diagnóstico que comprende un anticuerpo como se ha definido en cualquiera de las realizaciones anteriores.

20 Una realización de la invención proporciona un método para detectar, en una muestra, la presencia de antígeno CD38, o de una célula que exprese CD38, que comprende:

- poner en contacto la muestra con un anticuerpo anti-CD38 de cualquiera de las realizaciones anteriores en condiciones que permitan la formación de un complejo entre el anticuerpo o moléculas biespecíficas y CD38; y
- analizar si se ha formado un complejo.

25 Una realización de la invención proporciona a un kit para detectar, en una muestra, la presencia de antígeno CD38, o de una célula que exprese CD38, comprendiendo el kit

- un anticuerpo anti-CD38 de cualquiera de las realizaciones anteriores e
- 30 - instrucciones para el uso del kit.

Una realización de la invención proporciona un anticuerpo antiidiotípico que se une con un anticuerpo anti-CD38 de cualquiera de las realizaciones anteriores.

35 La divulgación también proporciona un método para inhibir el crecimiento y/o la proliferación de una célula que expresa CD38, que comprende la administración de un péptido según cualquiera de las realizaciones anteriores, un inmunocombinado según la realización anterior, una composición farmacéutica según las realizaciones anteriores o un vector de expresión mencionado en las realizaciones anteriores, de modo que se inhiban el crecimiento y/o la proliferación, la migración o la fagocitosis de la célula.

40 La divulgación también proporciona un método para tratar una enfermedad o trastorno que implica células que expresan CD38 en un sujeto, comprendiendo dicho método la administración de un péptido según cualquiera de las realizaciones anteriores, un inmunocombinado según una realización anterior, una composición farmacéutica según una realización anterior o un vector de expresión según una cualquiera de las realizaciones anteriores a un sujeto que lo necesite.

45 La divulgación también proporciona un método para prevenir una enfermedad o trastorno que implica células que expresan CD38 en un sujeto, comprendiendo dicho método la administración de un péptido según cualquiera de las realizaciones anteriores, un inmunocombinado según una realización anterior, una composición farmacéutica según una realización anterior o un vector de expresión según una cualquiera de las realizaciones anteriores a un sujeto que lo necesite.

50 La divulgación también proporciona un método según las realizaciones anteriores en donde la enfermedad o el trastorno es artritis reumatoide.

55 La divulgación también proporciona un método según las realizaciones anteriores en donde la enfermedad o el trastorno son neoplasias de linfocitos B tales como una cualquiera de los siguientes: linfoma linfocítico pequeño, linfoma prolinfocítico de linfocitos B, leucemia linfocítica crónica de linfocitos B, linfoma de células del manto, linfoma de Burkitt, linfoma folicular, linfoma difuso de linfocitos B grandes, mieloma múltiple, linfoma linfoplasmacítico, linfoma esplénico de la zona marginal, neoplasias de células plasmáticas, tales como mieloma de células plasmáticas, plasmacitoma, enfermedad por depósito de inmunoglobulina monoclonal, enfermedad de cadena pesada, linfoma MALT, linfoma de linfocitos B marginal ganglionar, linfoma intravascular de células B grandes, linfoma de derrame primario, granulomatosis linfomatoide, linfoma no Hodgkin, linfoma de Hodgkin, tricoleucemia, linfoma de derrame primario y linfoma no Hodgkin relacionado con el SIDA.

60 La divulgación también proporciona un método según las realizaciones anteriores en donde la enfermedad o el

trastorno es mieloma múltiple

La divulgación también proporciona un método según las realizaciones anteriores en donde la enfermedad o el trastorno es enfermedad autoinmunitaria.

5 La divulgación también proporciona un método según las realizaciones anteriores en donde la enfermedad o el trastorno es diabetes.

10 La divulgación también proporciona un método según las realizaciones anteriores en donde la enfermedad o el trastorno es esclerosis múltiple.

La divulgación también proporciona un método según las realizaciones anteriores en donde la enfermedad o el trastorno es enfermedad de Graves.

15 La divulgación también proporciona un método según las realizaciones anteriores en donde la enfermedad o el trastorno es neuroinflamación.

La divulgación también proporciona un método según las realizaciones anteriores en donde la enfermedad o el trastorno es inflamación de células del músculo liso de las vías respiratorias durante el asma.

20 La divulgación también proporciona un método según las realizaciones anteriores, en donde el método comprende la administración de uno o más agentes terapéuticos adicionales al sujeto.

25 La divulgación también proporciona un método según la realización anterior, en donde el o los agentes terapéuticos adicionales se seleccionan de un agente quimioterapéutico, un agente antiinflamatorio o un agente inmunosupresor y/o inmunomodulador.

30 La divulgación también proporciona un método según la realización anterior, en donde el o los agentes terapéuticos adicionales se seleccionan de un grupo que consiste en cisplatino, gefitinib, cetuximab, rituximab, bevacizumab, erlotinib, bortezomib, talidomida, pamidronato, ácido zoledrónico, clodronato, risendronato, ibandronato, etidronato, alendronato, tiludronato, trióxido de arsénico, lenalidomida, filgrastim, pegfilgrastim, sargramostim, ácido hidroxámico de suberoilánilida y SCIO-469.

35 Los anticuerpos monoclonales de la presente invención pueden producirse, por ejemplo, mediante el método de hibridoma descrito por primera vez por Kohler *et al.*, Nature 256, 495 (1975) o pueden producirse mediante métodos de ADN recombinante. Los anticuerpos monoclonales también pueden aislarse de bibliotecas de anticuerpos de fago usando las técnicas descritas en, por ejemplo, Clackson *et al.*, Nature 352, 624-628 (1991) y Marks *et al.*, J. Mol. Biol. 222, 581-597 (1991). Se pueden obtener anticuerpos monoclonales de cualquier fuente adecuada. Por tanto, por ejemplo, los anticuerpos monoclonales pueden obtenerse a partir de hibridomas preparados de células B

40 esplénicas murinas obtenidos de ratones inmunizados con un antígeno de interés, por ejemplo, en forma de células que expresan el antígeno en la superficie, o un ácido nucleico que codifica un antígeno de interés.

En una realización, el anticuerpo de la invención es un anticuerpo humano. Pueden generarse anticuerpos monoclonales humanos dirigidos contra CD38 usando ratones transgénicos o transcromosómicos que portan partes del sistema inmunitario humano en lugar del sistema de ratón. Dichos ratones transgénicos y transcromosómicos incluyen ratones denominados en el presente documento ratones HuMAb y ratones KM, respectivamente, y se denominan colectivamente en el presente documento como "ratones transgénicos".

45

El ratón HuMAb contiene un minilocus de gen de inmunoglobulina humana que codifica secuencias de inmunoglobulina de cadena pesada (μ y γ) y ligera k humanas no reordenadas, junto con mutaciones dirigidas que inactivan los locus endógenos de cadena μ y k (Lonberg, N. *et al.*, Nature 368, 856-859 (1994)). Por consiguiente, los ratones presentan expresión reducida de IgM de ratón o k y, en respuesta a la inmunización, los transgenes humanos de cadena pesada y ligera introducidos, experimentan cambio de clase y mutación somática para generar anticuerpos monoclonales humanos IgG, κ de alta afinidad (Lonberg, N. *et al.* (1994), mencionado anteriormente; revisado en Lonberg, N. Handbook of Experimental Pharmacology 113, 49-101 (1994), Lonberg, N. y Huszar, D., Intern. Rev. Immunol. Vol. 13 65-93 (1995) y Harding, F. y Lonberg, N. Ann. N.Y. Acad. Sci 764 536-546 (1995)). La preparación de ratones HuMAb se describe en detalle en Taylor, L. *et al.*, Nucleic Acids Research 20, 6287-6295 (1992), Chen, J. *et al.*, International Immunology 5, 647-656 (1993), Tuailon *et al.*, J. Immunol. 152, 2912-2920 (1994), Taylor, L. *et al.*, International Immunology 6, 579-591 (1994), Fishwild, D. *et al.*, Nature Biotechnology 14, 845-851 (1996). Véanse también los documentos US 5 545 806, US 5 569 825, US 5 625 126, US 5 633 425, US 5 789 650, US 5 877 397, US 5 661 016, US 5 814 318, US 5 874 299, US 5 770 429, US 5 545 807, WO 98/24884, WO 94/25585, WO 93/1227, WO 92/22645, WO 92/03918 y WO 01/09187.

50

55

60

Los ratones HCo7 tienen una alteración de JKD en sus genes de cadena ligera endógena (κ) (como se describe en Chen *et al.*, EMBO J. 12, 821-830 (1993)), una alteración de CMD en sus genes de cadena pesada endógena (como se describe en el ejemplo 1 del documento WO 01/14424), un transgén de cadena ligera κ humana

65

KCo5 (como se describe en Fishwild et al., 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 endógena (kappa) (como se describe en Chen *et al.*, EMBO J. 12, 821-830 (1993)), una alteración de CMD en sus genes de cadena pesada endógena (como se describe en el ejemplo 1 del documento WO 01/14424), un transgén de cadena ligera kappa humana KCo5 (como se describe en Fishwild *et al.*, 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 endógeno de cadena ligera kappa de ratón se ha alterado de manera homocigota como se describe en Chen *et al.*, EMBO J. 12, 811-820 (1993) y el gen endógeno de cadena pesada de ratón se ha alterado de manera homocigota como se describe en el ejemplo 1 del documento WO 01/09187. Esta cepa de ratón porta un transgén de cadena ligera kappa humana, KCo5, como se describe en Fishwild *et al.*, Nature Biotechnology 14, 845-851 (1996). Esta cepa de ratón también porta un transcromosoma de cadena pesada humana compuesto por el fragmento de cromosoma 14 hCF (SC20) como se describe en el documento WO 02/43478.

Pueden usarse esplenocitos de estos ratones transgénicos para generar hibridomas que secretan anticuerpos monoclonales humanos según técnicas bien conocidas.

También se pueden generar anticuerpos monoclonales o policlonales humanos de la presente invención o anticuerpos de la presente invención que se originan de otras especies de forma transgénica mediante la generación de otro mamífero no humano o planta que sea transgénico para las secuencias de interés de la cadena pesada y ligera de inmunoglobulina y producción del anticuerpo en una forma recuperable del mismo. En relación con la producción transgénica en mamíferos, pueden producirse anticuerpos en, y recuperarse de, la leche de cabras, vacas u otros mamíferos. Véase, por ejemplo, documentos US 5.827.690, US 5.756.687, US 5.750.172 y US 5.741.957.

Además, pueden generarse anticuerpos humanos de la presente invención o anticuerpos de la presente invención de otras especies e identificarse mediante tecnologías de tipo presentación, incluyendo, sin limitación, presentación en fagos, presentación retroviral, presentación ribosómica y otras técnicas, usando técnicas bien conocidas en este campo y las moléculas resultantes pueden someterse a maduración adicional, tal como maduración de afinidad, ya que dichas técnicas son bien conocidas en este campo (véase, por ejemplo, Hoogenboom *et al.*, J. Mol. Biol. 227, 381 (1991) (presentación en fagos), Vaughan *et al.*, Nature Biotech 14, 309 (1996) (presentación en fagos), Hanes y Plutchau, PNAS USA 94, 4937-4942 (1997) (presentación ribosómica), Parmley y Smith, Gene 73, 305-318 (1988) (presentación en fagos), Scott TIBS 17, 241-245 (1992), Cwirla *et al.*, PNAS USA 87, 6378-6382 (1990), Russel *et al.*, Nucl. Acids Research 21, 1081-1085 (1993), Hogenboom *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, dichos anticuerpos pueden ser humanizados.

La competencia por unión a CD38 o una parte de CD38 por dos o más anticuerpos anti-CD38 puede determinarse mediante cualquier técnica adecuada. Competencia, en el contexto de la presente divulgación, se refiere a cualquier reducción significativamente detectable en la propensión de una molécula particular para unirse a un compañero de unión particular en presencia de otra molécula que se une al compañero de unión. Normalmente, competencia significa una reducción de al menos aproximadamente 10 %, tal como una reducción de al menos aproximadamente 15 % o al menos aproximadamente 20 % en la unión entre un anticuerpo anti-CD38 y

- (a) una forma de CD38 (por ejemplo, CD38 "procesado", "maduro", "sin procesar", "no procesado" o "inmaduro");
- (b) una forma de CD38 libre (por ejemplo, un fragmento de CD38 producido por procesamiento *in vivo*);
- (c) un péptido heterodimérico compuesto por otro péptido asociado con CD38, tal como CD31 asociado con CD38;
- (d) un complejo de CD38 y uno o más sustratos, tales como AMPc, NAD⁺ y/o ADPRc;
- (e) un dímero dimerizado, asociado y/o procesado de CD38 con un ligando soluble, tal como CD31; o
- (f) una parte de CD38,

provocada por la presencia de otro anticuerpo anti-CD38 según lo determinado por, por ejemplo, análisis de ELISA o análisis de FACS (como se describe en la sección de ejemplos) usando cantidades suficientes de los dos o más anticuerpos anti-CD38 en competición y la molécula CD38. También puede darse el caso de que pueda existir competencia entre anticuerpos anti-CD38 con respecto a más de una forma de CD38 y/o una parte de CD38, por ejemplo, en un contexto donde las propiedades de unión a anticuerpos de una región particular de CD38 se conservan en fragmentos del mismo, tal como en el caso de un epítipo lineal bien presentado ubicado en diversos fragmentos probados o un epítipo conformacional que se presenta en fragmentos de CD38 suficientemente grandes así como en CD38.

La evaluación de la competencia normalmente implica una evaluación de la unión inhibidora relativa usando una primera cantidad de una primera molécula; una segunda cantidad de una segunda molécula; y una tercera cantidad de una tercera molécula (o un patrón determinado por estudios de unión que pueden compararse razonablemente

con nuevos datos de unión con respecto a la primera y segunda moléculas como un sustituto de datos contemporáneos reales), en donde la primera, segunda y tercera cantidades son suficientes para realizar una comparación que transmita información acerca de la selectividad y/o especificidad de las moléculas en cuestión con respecto a las otras moléculas presentes. La primera, segunda y tercera cantidades pueden variar con la naturaleza del anticuerpo anti-CD38 y las dianas potenciales por lo tanto en cuestión. Por ejemplo, para evaluaciones de ELISA, similares a las descritos en la sección de ejemplos, se necesitan aproximadamente 5-50 µg (por ejemplo, aproximadamente 10-50 µg, aproximadamente 20-50 µg, aproximadamente 5-20 µg, aproximadamente 10-20 µg, etc.) de anticuerpo anti-CD38 y/o dianas CD38 para evaluar si existe competencia. Las condiciones también deberían ser adecuadas para la unión. Normalmente, las condiciones fisiológicas o casi fisiológicas (p. ej., temperaturas de aproximadamente 20-40 °C, pH de aproximadamente 7-8, etc.) son adecuadas para la unión de anticuerpo anti-CD38:CD38. Con frecuencia, la competencia está marcada por una inhibición relativa significativamente mayor de aproximadamente 5 % según lo determinado por el análisis de ELISA y/o FACS. Puede ser deseable establecer un umbral más alto de inhibición relativa como criterio/determinante de cuál es un nivel adecuado de competencia en un contexto particular (por ejemplo, en el que el análisis de competencia se usa para seleccionar o explorar nuevos anticuerpos diseñados con la función pretendida de bloquear la unión de otro péptido o molécula que se una a CD38 (por ejemplo, los compañeros de unión naturales de CD38, tales como CD31, también denominado antígeno CD31, EndoCAM, GPIIA', PECAM-1, molécula de adhesión de plaquetas/células endoteliales o anticuerpo anti-CD38 de origen natural)). Por tanto, por ejemplo, es posible establecer un criterio de competitividad en donde se detecta al menos aproximadamente 10 % de inhibición relativa; se detecta al menos aproximadamente 15 % de inhibición relativa; o se detecta al menos aproximadamente 20 % de inhibición relativa antes de que un anticuerpo se considere suficientemente competitivo. En los casos donde los epítomos pertenecientes a anticuerpos en competición están ubicados cerca en un antígeno, la competencia puede estar marcada por más de aproximadamente 40 % de inhibición relativa de la unión a CD38 (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 mayor nivel de inhibición relativa).

La competencia puede considerarse la inversa de reactividad cruzada entre una molécula y dos posibles compañeros de unión. En determinadas realizaciones de la divulgación, un anticuerpo anti-CD38 de la presente invención se une específicamente a uno o más restos o regiones en CD38 pero tampoco reacciona de forma cruzada con otros péptidos, regiones peptídicas o moléculas, por ejemplo, la presente divulgación proporciona un anticuerpo anti-CD38 que no reacciona de forma cruzada con proteínas con homología con CD38, tales como BST-1 (antígeno de células estromales de médula ósea-1) y Mo5, también denominado CD157; o anticuerpos anti-CD38 que no reaccionan de forma cruzada con CD38 en el contexto de tejido normal, tales como tejidos que no están implicados en mieloma múltiple. Normalmente, una falta de reactividad cruzada significa menos de aproximadamente 5 % de inhibición competitiva relativa entre las moléculas cuando se evalúa mediante análisis de ELISA y/o FACS usando cantidades suficientes de las moléculas en condiciones de ensayo adecuadas.

En una realización, la presente divulgación proporciona un anticuerpo anti-CD38 que compite con un anticuerpo que tiene una secuencia de V_L de la SEQ ID NO: 27 y una secuencia de V_H de la SEQ ID NO: 2, tal como el anticuerpo 028, por la unión a CD38 o una parte del mismo.

En una realización, la presente divulgación proporciona un anticuerpo anti-CD38 que compite con un anticuerpo que tiene una secuencia de V_L de la SEQ ID NO: 32 y una secuencia de V_H de la SEQ ID NO: 7, tal como el anticuerpo 025, por la unión a CD38 o una parte del mismo.

En una realización, la presente divulgación proporciona un anticuerpo anti-CD38 que compite con un anticuerpo que tiene una secuencia de V_L de la SEQ ID NO: 37 y una secuencia de V_H de la SEQ ID NO: 12, tal como el anticuerpo 026, por la unión a CD38 o una parte del mismo.

En una realización, la presente divulgación proporciona un anticuerpo anti-CD38 que compite con un anticuerpo que tiene una secuencia de V_L de la SEQ ID NO: 42 y una secuencia de V_H de la SEQ ID NO: 17, tal como el anticuerpo 049, por la unión a CD38 o una parte del mismo.

En una realización, la presente divulgación proporciona un anticuerpo anti-CD38 que compite con un anticuerpo que tiene una secuencia de V_L de la SEQ ID NO: 47 y una secuencia de V_H de la SEQ ID NO: 22, tal como el anticuerpo 056, por la unión a CD38 o una parte del mismo.

Como se analiza en otra parte del presente documento, a menos que se indique otra cosa o se contradiga claramente por el contexto, se entiende que las referencias a la unión de un anticuerpo anti-CD38 con CD38 se refieren a unión en cualquier contexto adecuado, tal como en un contexto conformacional donde está presente la estructura de CD38; o en un contexto de epítipo lineal. Por supuesto, la unión en un subconjunto limitado de dicho contexto o dichos contextos puede ser una característica importante con respecto a cualquier anticuerpo anti-CD38

proporcionado por la presente invención.

Se pueden encontrar métodos adicionales para determinar la especificidad del anticuerpo anti-CD38 mediante inhibición competitiva, por ejemplo, en Harlow *et al.*, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1988), Colligan *et al.*, eds., *Current Protocols in Immunology*, Greene Publishing Assoc. y Wiley InterScience N.Y., (1992, 1993) y Muller, *Meth. Enzymol.* 92, 589-601 (1983)).

La CD38 humana comprende diversos epítomos diferentes, que pueden incluir (1) determinantes antigénicos peptídicos que están comprendidos dentro de cadenas peptídicas individuales dentro de la CD38 humana; (2) determinantes antigénicos conformacionales que consisten en uno o más aminoácidos no contiguos en una cadena particular y/o aminoácidos presentes en cadenas peptídicas espacialmente contiguas pero separadas (normalmente donde las secuencias de aminoácidos respectivas de las cadenas se ubican de forma inconexa a lo largo de la secuencia polipeptídica de la CD38 humana); (3) determinantes antigénicos postraduccionales que consisten, en su totalidad o en parte, en estructuras moleculares unidas covalentemente con la CD38 humana, tales como grupos de carbohidratos; o (4) combinaciones de (1)-(3).

Un epítipo en el contexto de la presente divulgación incluye cualquier péptido o determinante derivado de péptido capaz de unirse específicamente con una inmunoglobulina. Un epítipo puede comprender cualquier número adecuado de aminoácidos, en cualquier posición adecuada (con respecto a la secuencia lineal de CD38), orientación (con respecto a CD38 plegado o un fragmento del mismo), composición de aminoácidos (y, en consecuencia, al menos en parte, carga). Por tanto, por ejemplo, un epítipo puede estar compuesto por aproximadamente 3-10 aminoácidos, normalmente 3-8 aminoácidos, en una o más ubicaciones contiguas o no contiguas con respecto a la secuencia primaria de CD38 (por ejemplo, un epítipo puede consistir esencialmente en 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 restos de aminoácidos distribuidos en 1, 2, 3, 4 o 5 ubicaciones no contiguas en CD38). Como alternativa, por ejemplo, un epítipo puede considerarse definido por una región de aproximadamente 5-40 restos de aminoácidos contiguos (p. ej., aproximadamente 7-30 restos de aminoácidos, aproximadamente 5-20 restos de aminoácidos o aproximadamente 3-15 restos de aminoácidos) en CD38 (solo o en combinación con una parte de un dominio CD38 adyacente). En algunos epítomos, puede darse el caso de que solo un resto de aminoácido o solo algunos restos de aminoácidos sean críticos para CDR o el reconocimiento de CDR (y, por lo tanto, muy importantes para afinidad y avidez de anticuerpo anti-CD38:antígeno CD38). Como tal, un epítipo puede caracterizarse según uno o más de dichos restos críticos, con el reconocimiento de que otros restos también pueden hacer una contribución menor al epítipo. En el caso de un epítipo definido por una región de aminoácidos, puede ser que uno o más aminoácidos en la región hagan solo una contribución menor o incluso una contribución insignificante a la unión a anticuerpos, de modo que el resto puede estar sujeto a sustitución con un resto diferente apropiado sin dar como resultado "una pérdida" del epítipo de al menos algunos anticuerpos anti-CD38 específicos para él.

En una realización, la presente divulgación proporciona un anticuerpo anti-CD38, tal como un anticuerpo anti-CD38, que se une específicamente con un epítipo CD38 que también se une específicamente con un anticuerpo que tiene una secuencia de V_L de la SEQ ID NO: 27 y una secuencia de V_H de la SEQ ID NO: 2 (tal como el anticuerpo 028), o un anticuerpo que tiene una secuencia de V_L de la SEQ ID NO: 32 y una secuencia de V_H de la SEQ ID NO: 7 (tal como el anticuerpo 025), o un anticuerpo que tiene una secuencia de V_L de la SEQ ID NO: 37 y una secuencia de V_H de la SEQ ID NO: 12 (tal como el anticuerpo 026), o un anticuerpo que tiene una secuencia de V_L de la SEQ ID NO: 42 y una secuencia de V_H de la SEQ ID NO: 17 (tal como el anticuerpo 049), o un anticuerpo que tiene una secuencia de V_L de la SEQ ID NO: 47 y una secuencia de V_H de la SEQ ID NO: 22 (tal como el anticuerpo 056).

Es posible que los anticuerpos anti-CD38 que tienen una o más CDR que difieren de las CDR de un anticuerpo que tiene una secuencia de V_L de la SEQ ID NO: 27 y una secuencia de V_H de la SEQ ID NO: 2, o las CDR de un anticuerpo que tiene una secuencia de V_L de la SEQ ID NO: 32 y una secuencia de V_H de la SEQ ID NO: 7, o las CDR de un anticuerpo que tiene una secuencia de V_L de la SEQ ID NO: 37 y una secuencia de V_H de la SEQ ID NO: 12, o las CDR de un anticuerpo que tiene una secuencia de V_L de la SEQ ID NO: 42 y una secuencia de V_H de la SEQ ID NO: 17, o las CDR de un anticuerpo que tiene una secuencia de V_L de la SEQ ID NO: 47 y una secuencia de V_H de la SEQ ID NO: 22, aún sean específicos para el mismo epítipo que un anticuerpo que tiene las CDR de un anticuerpo que tiene una secuencia de V_L de la SEQ ID NO: 27 y una secuencia de V_H de la SEQ ID NO: 2, o las CDR de un anticuerpo que tiene una secuencia de V_L de la SEQ ID NO: 32 y una secuencia de V_H de la SEQ ID NO: 7, o las CDR de un anticuerpo que tiene una secuencia de V_L de la SEQ ID NO: 37 y una secuencia de V_H de la SEQ ID NO: 12, o las CDR de un anticuerpo que tiene una secuencia de V_L de la SEQ ID NO: 42 y una secuencia de V_H de la SEQ ID NO: 17, o las CDR de un anticuerpo que tiene una secuencia de V_L de la SEQ ID NO: 47 y una secuencia de V_H de la SEQ ID NO: 22, respectivamente. En tales casos, el anticuerpo anti-CD38 en cuestión puede reconocer o ser más específico/selectivo para estructuras o regiones particulares del epítipo que el anticuerpo que tiene las CDR de un anticuerpo que tiene una secuencia de V_L de la SEQ ID NO: 27 y una secuencia de V_H de la SEQ ID NO: 2, o las CDR de un anticuerpo que tiene una secuencia de V_L de la SEQ ID NO: 32 y una secuencia de V_H de la SEQ ID NO: 7, o las CDR de un anticuerpo que tiene una secuencia de V_L de la SEQ ID NO: 37 y una secuencia de V_H de la SEQ ID NO: 12, o las CDR de un anticuerpo que tiene una secuencia de V_L de la SEQ ID NO: 42 y una secuencia de V_H de la SEQ ID NO: 17, o las CDR de un anticuerpo que tiene una secuencia de V_L de la SEQ ID NO: 47 y una secuencia de V_H de la SEQ ID NO: 22, respectivamente.

Un epítipo CD38 que se une con un anticuerpo que tiene una secuencia de V_L de la SEQ ID NO: 27 y una secuencia de V_H de la SEQ ID NO: 2 (tal como el anticuerpo 028), o un anticuerpo que tiene una secuencia de V_L de la SEQ ID NO: 32 y una secuencia de V_H de la SEQ ID NO: 7 (tal como el anticuerpo 025), o un anticuerpo que tiene una secuencia de V_L de la SEQ ID NO: 37 y una secuencia de V_H de la SEQ ID NO: 12 (tal como el anticuerpo 026), o un anticuerpo que tiene una secuencia de V_L de la SEQ ID NO: 42 y una secuencia de V_H de la SEQ ID NO: 17 (tal como el anticuerpo 049), o un anticuerpo que tiene una secuencia de V_L de la SEQ ID NO: 47 y una secuencia de V_H de la SEQ ID NO: 22 (tal como el anticuerpo 056), puede identificarse mediante técnicas de mapeo y caracterización convencionales, cuyo refinamiento adicional puede identificarse por cualquier técnica adecuada, numerosos ejemplos de los cuales están disponibles para los expertos en la materia.

Estas técnicas también pueden usarse para identificar y/o caracterizar epítipos para anticuerpos anti-CD38 en general. Como un ejemplo de dichos métodos de mapeo/caracterización, puede determinarse un epítipo para un anticuerpo anti-CD38 mediante "determinación de huella" del epítipo usando modificación química de las aminas/carboxilos expuestos en la proteína CD38. Un ejemplo específico de dicha técnica de determinación 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 protones de amida de proteína de ligando y receptor, en donde los grupos amida de cadena principal que participan en la unión a proteínas están protegidos del intercambio inverso y, por lo tanto, permanecerán deuterados. En este punto, pueden identificarse regiones relevantes mediante proteólisis péptica, separación con cromatografía líquida de alto rendimiento de microbora rápida y/o espectrometría de masas por ionización con electropulverización. Véase, 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 epítipos adecuada es el mapeo epitópico por resonancia magnética nuclear (RMN), donde normalmente la posición de las señales en espectros de RMN bidimensionales del antígeno libre y el antígeno en complejo con el péptido de unión a antígeno, tal como un anticuerpo, se comparan. El antígeno normalmente se marca con isótopos de manera selectiva con ¹⁵N para que solo se vean señales correspondientes al antígeno y no se vean señales del péptido de unión a antígeno en el espectro de RMN. Las señales de antígeno que se originan a partir de aminoácidos implicados en la interacción con el péptido de unión a antígeno normalmente cambiarán de posición en los espectros del complejo en comparación con los espectros del antígeno libre y los aminoácidos implicados en la unión pueden identificarse 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 epitópico/caracterización de epítipos también se puede realizar usando métodos de espectrometría de masas. Véase, por ejemplo, Downward, *J Mass Spectrom.* 35(4), 493-503 (2000) y Kiselar y Downard, *Anal Chem.* 71(9), 1792-801 (1999).

También pueden ser útiles, en el contexto de mapeo epitópico e identificación de epítipos, técnicas de digestión con proteasa. Las regiones/secuencias relevantes para determinantes antigénicos pueden determinarse mediante digestión por proteasa, por ejemplo, usando tripsina en una relación de aproximadamente 1:50 con respecto a CD38, digestión durante la noche a 37°C y pH 7-8, seguido de análisis de espectrometría de masas (MS) para la identificación de péptidos. Los péptidos protegidos de la escisión con tripsina por el CD38BP pueden identificarse posteriormente mediante la comparación de muestras sometidas a digestión con tripsina y muestras incubadas con CD38BP y sometidas después a digestión, por ejemplo, con tripsina (revelando de este modo una huella para el agente de unión). Además, o como alternativa, se pueden usar otras enzimas como quimotripsina, pepsina, etc. en un método de caracterización de epítipos similar.

Un anticuerpo anti-CD38 que proporciona el resultado significativamente igual que un anticuerpo que tiene una secuencia de V_L de la SEQ ID NO: 27 y una secuencia de V_H de la SEQ ID NO: 2 (tal como el anticuerpo 028), o un anticuerpo que tiene una secuencia de V_L de la SEQ ID NO: 32 y una secuencia de V_H de la SEQ ID NO: 7 (tal como el anticuerpo 025), o un anticuerpo que tiene una secuencia de V_L de la SEQ ID NO: 37 y una secuencia de V_H de la SEQ ID NO: 12 (tal como el anticuerpo 026), o un anticuerpo que tiene una secuencia de V_L de la SEQ ID NO: 42 y una secuencia de V_H de la SEQ ID NO: 17 (tal como el anticuerpo 049), o un anticuerpo que tiene una secuencia de V_L de la SEQ ID NO: 47 y una secuencia de V_H de la SEQ ID NO: 22 (tal como el anticuerpo 056), en estas mediciones, se considera que es un anticuerpo que se une al mismo epítipo que un anticuerpo que tiene una secuencia de V_L de la SEQ ID NO: 27 y una secuencia de V_H de la SEQ ID NO: 2 (tal como el anticuerpo 028), o un anticuerpo que tiene una secuencia de V_L de la SEQ ID NO: 32 y una secuencia de V_H de la SEQ ID NO: 7 (tal como el anticuerpo 025), o un anticuerpo que tiene una secuencia de V_L de la SEQ ID NO: 37 y una secuencia de V_H de la SEQ ID NO: 12 (tal como el anticuerpo 026), o un anticuerpo que tiene una secuencia de V_L de la SEQ ID NO: 42 y una secuencia de V_H de la SEQ ID NO: 17 (tal como el anticuerpo 049), o un anticuerpo que tiene una secuencia de V_L de la SEQ ID NO: 47 y una secuencia de V_H de la SEQ ID NO: 22 (tal como el anticuerpo 056), respectivamente. Véase, por ejemplo, Manca, *Ann Ist Super Sanita.* 27(1), 15-9 (1991) para un análisis de técnicas similares.

El mapeo epitópico mediante unión competitiva a CD38 con dos anticuerpos donde uno está marcado con biotina, es otro método para identificar regiones determinantes antigénicas relevantes. La unión de anticuerpos con péptidos lineales y en bucle de CD38 mediante un inmunoensayo ligado a enzimas basado en PEPSCAN es otro método para identificar regiones determinantes antigénicas relevantes, véase, por ejemplo, Sloodstra-JW *et al.* *Mol-Divers.* 1,

87-96 (1996).

La mutagénesis dirigida es otro método para identificar regiones determinantes antigénicas relevantes, véase, por ejemplo, Polyak y Deans, *Blood* 99, 3956-3962 (2002). También se pueden usar diversas técnicas de presentación en fagos para identificar epítomos. Véase, por ejemplo, Wang y Yu, *Curr Drug Targets*. 5(1), 1-15 (2004), Burton, *Immunotechnology*. 1(2), 87-94 (agosto de 1995), Cortese *et al.*, *Immunotechnology*. 1(2), 87-94 (1995) e Irving *et al.*, *Curr Opin Chem Biol*. 5(3), 314-24 (2001). Los epítomos de consenso también se pueden identificar mediante técnicas modificadas relacionadas con la presentación de fagos (véase, <http://www.cs.montana.edu/~mumey/papers/jcb03.pdf>) para análisis.

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/secuencia de rayos X desarrolladas por Poljak y otros en las décadas de 1970 y 1980) y la aplicación de tecnología de síntesis de péptidos con múltiples agujas. También se pueden usar métodos basados en ordenador tales como análisis de secuencia y análisis de estructura tridimensional y acoplamiento para identificar determinantes antigénicos. Por ejemplo, un epítomo también puede determinarse mediante modelado molecular usando una estructura de CD38 con acoplamiento de la estructura del fragmento Fab del anticuerpo monoclonal individual. Estos y otros métodos de mapeo se analizan en *Epitope Mapping A Practical Approach* (Westwood y Hay Eds.) 2001 Oxford University Press.

En una realización, la presente divulgación proporciona un anticuerpo anti-CD38 que tiene sustancialmente las mismas características de unión específica a CD38 de uno o más mAbs seleccionados de un anticuerpo que tiene una secuencia de V_L de la SEQ ID NO: 27 y una secuencia de V_H de la SEQ ID NO: 2 (tal como el anticuerpo 028), o un anticuerpo que tiene una secuencia de V_L de la SEQ ID NO: 32 y una secuencia de V_H de la SEQ ID NO: 7 (tal como el anticuerpo 025), o un anticuerpo que tiene una secuencia de V_L de la SEQ ID NO: 37 y una secuencia de V_H de la SEQ ID NO: 12 (tal como el anticuerpo 026), o un anticuerpo que tiene una secuencia de V_L de la SEQ ID NO: 42 y una secuencia de V_H de la SEQ ID NO: 17 (tal como el anticuerpo 049), o un anticuerpo que tiene una secuencia de V_L de la SEQ ID NO: 47 y una secuencia de V_H de la SEQ ID NO: 22 (tal como el anticuerpo 056).

Los estudios de mapeo han indicado que varios anticuerpos monoclonales inducidos contra la CD38 humana se unen a epítomos en la región C-terminal de la CD38 (220-296) (Hoshino *et al.* y Ferrero *et al.*). Dentro de esta región, se han encontrado tres diferencias de aminoácidos entre la secuencia de la CD38 de ser humano y de mono cinomolgo: T237, Q272 y S274 en seres humanos corresponden a A238, R273 y F275 en monos cinomolgos. Existe un número limitado de diferencias de aminoácidos entre la secuencia de CD38 humana y de mono, por ejemplo, en la parte carboxilo terminal de la proteína, por ejemplo, las siguientes tres diferencias de aminoácidos entre la secuencia de la CD38 de ser humano y de mono cinomolgo: T237, Q272 y S274 en las CD38 humanas corresponden a A238, R273 y F275 en CD38 de mono cinomolgo (compárense la SEQ ID NO: 21 y la SEQ ID NO: 22).

Los anticuerpos de la presente invención no se unen a mutantes de CD38 humana, en donde el ácido aspártico en la posición 202 se ha sustituido por una glicina. La presente invención proporciona anticuerpos, que se unen a la CD38 humana y que se une a una CD38 humana mutante, en donde el resto de serina en la posición 274 se ha sustituido por un resto de fenilalanina. Los anticuerpos de la presente invención también se unen a mutantes de CD38 humana, en donde la glutamina en la posición 272 se ha sustituido por una arginina. Los anticuerpos de la presente invención también se unen a mutantes de CD38 humana en donde la treonina en la posición 237 se ha sustituido por una alanina.

La expresión "no se unen en el mismo grado" debe interpretarse de modo que la unión del anticuerpo con la CD38 humana mutante sea significativamente menor que la unión del anticuerpo con la CD38 humana de tipo silvestre. La expresión "se unen en el mismo grado" debe interpretarse de modo que la unión del anticuerpo con la CD38 humana mutante sea sustancialmente del mismo orden que la unión del anticuerpo con la CD38 humana de tipo silvestre. La unión de un péptido con las moléculas de CD38 (de tipo silvestre y mutantes) puede determinarse de varias maneras y está dentro del conocimiento general habitual de un experto en la materia determinar si la unión con el mutante es "significativamente menor" que la unión con el tipo silvestre. Una gran cantidad de técnicas diferentes para determinar la unión de un péptido con otro péptido están disponibles para el experto en la materia, por ejemplo, ELISA, radioinmunoensayo, BIAcore o citometría de flujo.

Un método para determinar la unión es determinar la CE_{50} de la unión del anticuerpo con la proteína mutante y con la proteína de tipo silvestre y después comparar los valores obtenidos. Otro método para determinar la unión es examinando la magnitud de la unión a una concentración de saturación (por ejemplo, la fase de meseta de la señal de unión) o determinando las constantes de velocidad cinética k_{on} y k_{off} , por ejemplo, por BIAcore.

En una realización, la unión del anticuerpo en cuestión con las proteínas CD38 (mutantes o de tipo silvestre) es mediante el uso de un ELISA como se describe en el Ejemplo 4.

En una realización adicional, el anticuerpo de la invención comprende una secuencia de CDR3 de región variable de cadena pesada (V_H) humana que comprende:

- una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en: las SEQ ID NO: 5, 10, 15, 20 y 25, o
- una variante de cualquiera de dichas secuencias, en donde dicha variante preferentemente solo tiene modificaciones de aminoácidos conservadoras.

5 En una realización, dicha variante consiste esencialmente en una secuencia que tiene al menos aproximadamente 50 %, tal como al menos 60 %, por ejemplo, al menos aproximadamente 70 %, tal como al menos aproximadamente 75 %, por ejemplo, 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 según una cualquiera de las SEQ ID NO: 5, 10, 15, 20 y 25.

10 En una realización adicional, dicha variante tiene como máximo 1, 2 o 3 modificaciones de aminoácidos, por ejemplo, sustituciones de aminoácidos, preferentemente sustituciones conservadoras en comparación con dicha secuencia.

15 En una realización preferida, dicho anticuerpo comprende una secuencia de CDR3 de región variable de cadena pesada humana que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en: las SEQ ID NO: 5, 10, 15, 20 y 25.

20 En una realización adicional más, el anticuerpo de la invención comprende:

- una región VH que comprende las secuencias de CDR1, 2 y 3 de las SEQ ID NO: 3, 4 y 5; o
- una región VH que comprende las secuencias de CDR1, 2 y 3 de las SEQ ID NO: 8, 9 y 10; o
- una región VH que comprende las secuencias de CDR1, 2 y 3 de las SEQ ID NO: 13, 14 y 15; o
- una región VH que comprende las secuencias de CDR1, 2 y 3 de las SEQ ID NO: 18, 19 y 20; o
- una región VH que comprende las secuencias de CDR1, 2 y 3 de las SEQ ID NO: 23, 24 y 25; o
- una variante de cualquiera de dichas regiones VH, en donde dicha variante preferentemente solo tiene sustituciones de aminoácidos conservadoras.

30 En una realización, dicha variante comprende una CDR1 de VH que consiste esencialmente en una secuencia que tiene al menos aproximadamente 50 %, tal como al menos 60 %, por ejemplo, al menos aproximadamente 70 %, tal como al menos aproximadamente 75 %, por ejemplo, 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 según una cualquiera de las SEQ ID NO: 3, 8, 13, 18 o 23.

35 En una realización, dicha variante comprende una CDR2 de VH que consiste esencialmente en una secuencia que tiene al menos aproximadamente 50 %, tal como al menos 60 %, por ejemplo, al menos aproximadamente 70 %, tal como al menos aproximadamente 75 %, por ejemplo, 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 según una cualquiera de las SEQ ID NO: 4, 9, 14, 19 o 24.

40 En una realización, dicha variante comprende una CDR3 de VH que consiste esencialmente en una secuencia que tiene al menos aproximadamente 50 %, tal como al menos 60 %, por ejemplo, al menos aproximadamente 70 %, tal como al menos aproximadamente 75 %, por ejemplo, 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 según una cualquiera de las SEQ ID NO: 5, 10, 15, 20 o 25.

50 En otra realización, el anticuerpo comprende

- a) una región CDR3 de VL que tiene la secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 30 y una región CDR3 de VH que tiene una secuencia seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 5,
- b) una región CDR3 de VL que tiene la secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 35 y una región CDR3 de VH que tiene la secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 10,
- c) una región CDR3 de VL que tiene la secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 40 y una región CDR3 de VH que tiene la secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 15,
- d) una región CDR3 de VL que tiene la secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 45 y una región CDR3 de VH que tiene la secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 20,
- e) una región CDR3 de VL que tiene la secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 50 y una región CDR3 de VH que tiene la secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 25,
- f) una variante de cualquiera de las anteriores, en donde dicha variante preferentemente solo tiene sustituciones conservadoras en dichas secuencias

65 En una realización, dicha variante comprende una CDR3 de VH que consiste esencialmente en una secuencia que

tiene al menos aproximadamente 50 %, tal como al menos 60 %, por ejemplo, al menos aproximadamente 70 %, tal como al menos aproximadamente 75 %, por ejemplo, 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 según una cualquiera de las SEQ ID NO: 5, 10, 15, 20 o 25. En una realización, dicha variante comprende una CDR3 de VL que consiste esencialmente en una secuencia que tiene al menos aproximadamente 50 %, tal como al menos 60 %, por ejemplo, al menos aproximadamente 70 %, tal como al menos aproximadamente 75 %, por ejemplo, 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 según una cualquiera de las SEQ ID NO: 30, 35, 40, 45 o 50;

En una realización adicional, el anticuerpo de la invención comprende:

- una región VH que comprende las secuencias de CDR1, 2 y 3 de las SEQ ID NO: 3, 4 y 5 y una región VL que comprende la secuencia de CDR3 de la SEQ ID NO: 30; o
- una región VH que comprende las secuencias de CDR1, 2 y 3 de las SEQ ID NO: 8, 9 y 10 y una región VL que comprende la secuencia de CDR3 de la SEQ ID NO: 35; o
- una región VH que comprende las secuencias de CDR1, 2 y 3 de las SEQ ID NO: 13, 14 y 15 y una región VL que comprende la secuencia de CDR3 de la SEQ ID NO: 40; o
- una región VH que comprende las secuencias de CDR1, 2 y 3 de las SEQ ID NO: 18, 19 y 20 y una región VL que comprende la secuencia de CDR3 de la SEQ ID NO: 45; o
- una región VH que comprende las secuencias de CDR1, 2 y 3 de las SEQ ID NO: 23, 24 y 25 y una región VL que comprende la secuencia de CDR3 de la SEQ ID NO: 50; o
- una variante de cualquiera de dichos anticuerpos, en donde dicha variante preferentemente solo tiene sustituciones de aminoácidos conservadoras en dichas secuencias.

En una realización, dicha variante comprende una CDR1 de VH que consiste esencialmente en una secuencia que tiene al menos aproximadamente 50 %, tal como al menos 60 %, por ejemplo, al menos aproximadamente 70 %, tal como al menos aproximadamente 75 %, por ejemplo, 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 según una cualquiera de las SEQ ID NO: 3, 8, 13, 18 o 23.

En una realización, dicha variante comprende una CDR2 de VH que consiste esencialmente en una secuencia que tiene al menos aproximadamente 50 %, tal como al menos 60 %, por ejemplo, al menos aproximadamente 70 %, tal como al menos aproximadamente 75 %, por ejemplo, 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 según una cualquiera de las SEQ ID NO: 4, 9, 14, 19 o 24.

En una realización, dicha variante comprende una CDR3 de VH que consiste esencialmente en una secuencia que tiene al menos aproximadamente 50 %, tal como al menos 60 %, por ejemplo, al menos aproximadamente 70 %, tal como al menos aproximadamente 75 %, por ejemplo, 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 según una cualquiera de las SEQ ID NO: 5, 10, 15, 20 o 25.

En una realización, dicha variante comprende una CDR1 de VL que consiste esencialmente en una secuencia que tiene al menos aproximadamente 50 %, tal como al menos 60 %, por ejemplo, al menos aproximadamente 70 %, tal como al menos aproximadamente 75 %, por ejemplo, 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 según una cualquiera de las SEQ ID NO: 28, 33, 38, 43 o 48.

En una realización, dicha variante comprende una CDR2 de VL que consiste esencialmente en una secuencia que tiene al menos aproximadamente 50 %, tal como al menos 60 %, por ejemplo, al menos aproximadamente 70 %, tal como al menos aproximadamente 75 %, por ejemplo, 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 según una cualquiera de las SEQ ID NO: 29, 34, 39, 44 o 49.

En una realización, dicha variante comprende una CDR3 de VL que consiste esencialmente en una secuencia que tiene al menos aproximadamente 50 %, tal como al menos 60 %, por ejemplo, al menos aproximadamente 70 %, tal como al menos aproximadamente 75 %, por ejemplo, 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 según una cualquiera de las SEQ ID NO: 30, 35, 40,

45 o 50.

En una realización adicional, el anticuerpo de la invención comprende:

- 5 - una región VH que comprende las secuencias de CDR1, 2 y 3 de las SEQ ID NO: 3, 4 y 5 y una región VL que comprende las secuencias de CDR1, 2 y 3 de las SEQ ID NO: 28, 29 y 30; o
- una región VH que comprende las secuencias de CDR1, 2 y 3 de las SEQ ID NO: 8, 9 y 10 y una región VL que comprende las secuencias de CDR1, 2 y 3 de las SEQ ID NO: 33, 34 y 35; o
- 10 - una región VH que comprende las secuencias de CDR1, 2 y 3 de las SEQ ID NO: 13, 14 y 15 y una región VL que comprende las secuencias de CDR1, 2 y 3 de las SEQ ID NO: 38, 39 y 40; o
- una región VH que comprende las secuencias de CDR1, 2 y 3 de las SEQ ID NO: 18, 19 y 20 y una región VL que comprende las secuencias de CDR1, 2 y 3 de las SEQ ID NO: 43, 44 y 45; o
- una región VH que comprende las secuencias de CDR1, 2 y 3 de las SEQ ID NO: 23, 24 y 25 y una región VL que comprende las secuencias de CDR1, 2 y 3 de las SEQ ID NO: 48, 49 y 50; o
- 15 - una variante de cualquiera de dichos anticuerpos, en donde dicha variante preferentemente solo tiene modificaciones de aminoácidos conservadoras en dichas secuencias.

En una realización, dicha variante comprende una CDR1 de VH que consiste esencialmente en una secuencia que tiene al menos aproximadamente 50 %, tal como al menos 60 %, por ejemplo, al menos aproximadamente 70 %, tal como al menos aproximadamente 75 %, por ejemplo, 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 según una cualquiera de las SEQ ID NO: 3, 8, 13, 18 o 23;

25 En una realización, dicha variante comprende una CDR2 de VH que consiste esencialmente en una secuencia que tiene al menos aproximadamente 50 %, tal como al menos 60 %, por ejemplo, al menos aproximadamente 70 %, tal como al menos aproximadamente 75 %, por ejemplo, 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 según una cualquiera de las SEQ ID NO: 4, 9, 14, 19 o 24.

En una realización, dicha variante comprende una CDR3 de VH que consiste esencialmente en una secuencia que tiene al menos aproximadamente 50 %, tal como al menos 60 %, por ejemplo, al menos aproximadamente 70 %, tal como al menos aproximadamente 75 %, por ejemplo, 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 según una cualquiera de las SEQ ID NO: 5, 10, 15, 20 o 25.

40 En una realización, dicha variante comprende una CDR1 de VL que consiste esencialmente en una secuencia que tiene al menos aproximadamente 50 %, tal como al menos 60 %, por ejemplo, al menos aproximadamente 70 %, tal como al menos aproximadamente 75 %, por ejemplo, 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 según una cualquiera de las SEQ ID NO: 28, 33, 38, 43 o 48.

45 En una realización, dicha variante comprende una CDR2 de VL que consiste esencialmente en una secuencia que tiene al menos aproximadamente 50 %, tal como al menos 60 %, por ejemplo, al menos aproximadamente 70 %, tal como al menos aproximadamente 75 %, por ejemplo, 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 según una cualquiera de las SEQ ID NO: 29, 34, 39, 44 o 49.

50 En una realización, dicha variante comprende una CDR3 de VL que consiste esencialmente en una secuencia que tiene al menos aproximadamente 50 %, tal como al menos 60 %, por ejemplo, al menos aproximadamente 70 %, tal como al menos aproximadamente 75 %, por ejemplo, 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 según una cualquiera de las SEQ ID NO: 30, 35, 40, 45 o 50.

60 En una realización adicional más, el anticuerpo de la invención comprende:

- una región VH que comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 2 y una región VL que comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 27; o
- 65 - una región VH que comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 7 y una región VL que comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 32; o
- una región VH que comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 12 y una región VL que comprende la secuencia

- de la SEQ ID NO: 37; o
- una región VH que comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 17 y una región VL que comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 42; o
- una región VH que comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 22 y una región VL que comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 47; o
- una variante de cualquiera de las anteriores, en donde dicha variante preferentemente solo tiene modificaciones conservadoras.

En una realización, dicha variante comprende una región VH que consiste esencialmente en una secuencia que tiene al menos aproximadamente 50 %, tal como al menos 60 %, por ejemplo, al menos aproximadamente 70 %, tal como al menos aproximadamente 75 %, por ejemplo, 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 según una cualquiera de las SEQ ID NO: 2, 7, 12, 17 o 22.

En una realización, dicha variante comprende una región VL que consiste esencialmente en una secuencia que tiene al menos aproximadamente 50 %, tal como al menos 60 %, por ejemplo, al menos aproximadamente 70 %, tal como al menos aproximadamente 75 %, por ejemplo, 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 según una cualquiera de las SEQ ID NO: 27, 32, 37, 42 o 47.

En una realización adicional, el anticuerpo de la presente invención comprende un VH que tiene al menos 80 % de identidad, tal como 90 %, o 95 %, o 97 %, o 98 % o 99 % de identidad con una secuencia de región VH seleccionada del grupo que consiste en: las SEQ ID NO: 2, 7, 12, 17 o 22.

En una realización adicional, el anticuerpo de la presente invención comprende un VL que tiene al menos 80 % de identidad, tal como 90 %, o 95 %, o 97 %, o 98 % o 99 % de identidad con una secuencia de región VL seleccionada del grupo que consiste en: las SEQ ID NO: 27, 32, 37, 42 o 47.

En una realización adicional más, el anticuerpo de la invención comprende una región VH seleccionada del grupo que consiste en: las SEQ ID NO: 2, 7, 12, 17 o 22.

En una realización adicional más, el anticuerpo de la invención comprende una región VL seleccionada del grupo que consiste en: las SEQ ID NO: 27, 32, 37, 42 o 47.

En una realización adicional más, el anticuerpo de la invención comprende:

- una región VH que comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 2 y una región VL que comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 27; o
- una región VH que comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 7 y una región VL que comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 32; o
- una región VH que comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 12 y una región VL que comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 37; o
- una región VH que comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 17 y una región VL que comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 42; o
- una región VH que comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 22 y una región VL que comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 47; o

La presente divulgación también, en un aspecto, proporciona anticuerpos anti-CD38 que se caracterizan con respecto a su capacidad para competir con un anticuerpo que tiene:

- una región VH que comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 2 y una región VL que comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 27; o
- una región VH que comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 7 y una región VL que comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 32; o
- una región VH que comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 12 y una región VL que comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 37; o
- una región VH que comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 17 y una región VL que comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 42; o
- una región VH que comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 22 y una región VL que comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 47.

La presente divulgación también proporciona anticuerpos anti-CD38 que se unen con el mismo epítipo que un anticuerpo que tiene:

- una región VH que comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 2 y una región VL que comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 27; o
- una región VH que comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 7 y una región VL que comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 32; o
- 5 - una región VH que comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 12 y una región VL que comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 37; o
- una región VH que comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 17 y una región VL que comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 42; o
- 10 - una región VH que comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 22 y una región VL que comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 47.

El anticuerpo de la invención puede ser de cualquier isotipo. La elección del isotipo normalmente se guiará por las funciones efectoras deseadas, tales como inducción de CCDA. Son isotipos ejemplares IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. Pueden usarse cualquiera de las regiones constantes de cadena ligera humana, kappa o lambda. Si se desea, la

15 clase de un anticuerpo anti-CD38 de la presente invención puede cambiarse por métodos conocidos. Por ejemplo, un anticuerpo de la presente invención que originalmente era IgM puede cambiarse de clase a un anticuerpo IgG de la presente invención. Además, se pueden usar técnicas de cambio de clase para convertir una subclase de IgG en otra, por ejemplo, de IgG1 a IgG2. Por tanto, la función efectora de los anticuerpos de la presente invención puede cambiarse mediante cambio de isotipo a, por ejemplo, un anticuerpo IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgD, IgA, IgE o IgM

20 para diversos usos terapéuticos. En una realización, un anticuerpo de la presente invención es un anticuerpo IgG1, por ejemplo un IgG1, κ .

En una realización, El anticuerpo de la invención es un anticuerpo de longitud completa. En otra realización, el anticuerpo de la invención es un fragmento de anticuerpo o un anticuerpo de cadena sencilla.

25 Pueden obtenerse fragmentos de anticuerpos, por ejemplo, mediante fragmentación usando técnicas convencionales, y los fragmentos pueden explorarse para determinar su utilidad de la misma manera que se describe en el presente documento para anticuerpos completos. Por ejemplo, Se pueden generar fragmentos F(ab')₂ tratando el anticuerpo con pepsina. El fragmento F(ab')₂ resultante puede tratarse para reducir enlaces disulfuro para producir fragmentos Fab'. Se pueden obtener fragmentos Fab' tratando un anticuerpo IgG con papaína; se pueden obtener fragmentos Fab' con digestión con pepsina del anticuerpo IgG. También se puede producir un fragmento F(ab') uniendo Fab' descrito a continuación a través de un enlace tioéter o un enlace disulfuro. Un fragmento Fab' es un fragmento de anticuerpo obtenido cortando un enlace disulfuro de la región bisagra del F(ab')₂. Se puede obtener un fragmento Fab' tratando un fragmento F(ab')₂ con un agente reductor, tal como ditiotreitól. También pueden

30 generarse fragmentos de anticuerpos mediante la expresión de ácidos nucleicos que codifican dichos fragmentos en células recombinantes (véase, por ejemplo, Evans et al., J. Immunol. Meth. 184, 123-38 (1995)). Por ejemplo, un gen químico que codifica una parte de un fragmento F(ab')₂ podría incluir secuencias de ADN que codifican el dominio C_H1 y la región bisagra de la cadena H, seguido de un codón de terminación de la traducción para producir dicha molécula de fragmento de anticuerpo truncado.

40 En una realización, el anticuerpo anti-CD38 es un anticuerpo monovalente, preferentemente un anticuerpo monovalente como se describe en el documento WO2007059782 (Genmab). Por consiguiente, en una realización, el anticuerpo es un anticuerpo monovalente, en donde dicho anticuerpo anti-CD38 se construye mediante un método que comprende:

- i) proporcionar una construcción de ácido nucleico que codifica la cadena ligera de dicho anticuerpo monovalente, comprendiendo dicha construcción una secuencia de nucleótidos que codifica la región VL de un anticuerpo anti-CD38 específico de antígeno seleccionado y una secuencia de nucleótidos que codifica la región CL constante de una Ig, en donde dicha secuencia de nucleótidos que codifica la región VL de un anticuerpo específico de antígeno seleccionado y dicha secuencia de nucleótidos que codifica la región CL de una Ig están unidas operativamente entre sí, y en donde, en caso de un subtipo IgG1, la secuencia de nucleótidos que codifica la región CL se ha modificado de modo que la región CL no contenga ningún aminoácido capaz de formar enlaces disulfuro o enlaces covalentes con otros péptidos que comprendan una secuencia de aminoácidos idéntica de la región CL en presencia de IgG policlonal humana o cuando se administra a un animal o ser humano;
- 50 ii) proporcionar una construcción de ácido nucleico que codifica la cadena pesada de dicho anticuerpo monovalente, comprendiendo dicha construcción una secuencia de nucleótidos que codifica la región VH de un anticuerpo específico de antígeno seleccionado y una secuencia de nucleótidos que codifica una región CH constante de una Ig humana, en donde la secuencia de nucleótidos que codifica la región CH se ha modificado de manera que la región correspondiente a la región de bisagra y, según lo requiera el subtipo de Ig, otras regiones de la región CH, tales como la región CH3, no comprenda ningún resto de aminoácido que participe en la formación de enlaces disulfuro o enlaces entre cadenas pesadas covalentes o no covalentes estables con otros péptidos que comprenden una secuencia de aminoácidos idéntica de la región CH de la Ig humana en presencia de IgG policlonal humana o cuando se administra a un ser humano o animal, en donde dicha
- 60 secuencia de nucleótidos que codifica la región VH de un anticuerpo específico de antígeno seleccionado y dicha secuencia de nucleótidos que codifica la región CH de dicha Ig están unidas operativamente entre sí;

- iii) proporcionar un sistema de expresión celular para producir dicho anticuerpo monovalente;
- iv) producir dicho anticuerpo monovalente coexpresando las construcciones de ácido nucleico de (i) y (ii) en células del sistema de expresión celular de (iii).

5 De manera similar, en una realización, el anticuerpo anti-CD38 es un anticuerpo monovalente, que comprende

(i) una región variable de un anticuerpo de la invención como se describe en el presente documento o una parte de unión a antígeno de dicha región y

10 (ii) una región C_H de una inmunoglobulina o un fragmento de la misma que comprende las regiones C_H2 y C_H3, en donde la región C_H o fragmento de la misma se ha modificado de modo que la región correspondiente a la región de bisagra y, si la inmunoglobulina no es un subtipo IgG4, otras regiones de la región C_H, tales como la región C_H3, no comprendan ningún resto de aminoácido, que sean capaces de formar enlaces disulfuro con una región C_H idéntica u otros enlaces entre cadenas pesadas covalentes o no covalentes estables con una región C_H idéntica en presencia de IgG policlonal humana.

15 En una realización adicional, la cadena pesada del anticuerpo monovalente anti-CD38 se ha modificado de modo que se ha suprimido la bisagra completa.

20 En una realización adicional, dicho anticuerpo monovalente es del subtipo IgG4, pero la región C_H3 se ha modificado para que se hayan realizado una o más de las siguientes sustituciones de aminoácidos: Thr (T) en la posición 366 se ha reemplazado por Ala (A); Leu (L) en la posición 368 se ha reemplazado por Ala (A); Leu (L) en la posición 368 se ha reemplazado por Val (V); Phe (F) en la posición 405 se ha reemplazado por Ala (A); Phe (F) en la posición 405 se ha reemplazado por Leu (L); Tyr (Y) en la posición 407 se ha reemplazado por Ala (A); Arg (R) en la posición 409 se ha reemplazado por Ala (A).

25 En otra realización adicional, la secuencia de dicho anticuerpo monovalente se ha modificado de modo que no comprenda ningún sitio aceptor para glucosilación ligada a N.

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

40 En una realización, el anticuerpo anti-CD38 de la invención es un anticuerpo deficiente en función efectora. Dichos anticuerpos son particularmente útiles cuando el anticuerpo es para su uso en la estimulación y amortiguación del sistema inmunitario a través del bloqueo de los efectos inhibidores de CD38. Para dichas aplicaciones, puede ser ventajoso que el anticuerpo no tenga funciones efectoras, tales como CCDA, ya que esto puede conducir a citotoxicidad indeseada.

45 En una realización, el anticuerpo anti-CD38 deficiente en función efectora es un anticuerpo IgG4 estabilizado. Son ejemplos de anticuerpos IgG4 estabilizados adecuados anticuerpos, en donde la arginina en la posición 409 en una región constante de cadena pesada de IgG4 humana, que se indica en el índice de EU como en Kabat *et al.*, está sustituida con lisina, treonina, metionina o leucina, preferentemente lisina (descrita en el documento WO2006033386 (Kirin)). Preferentemente, dicho anticuerpo comprende un resto de Lys o Ala en la posición correspondiente a 409 o la región CH3 del anticuerpo se ha reemplazado por la región CH3 de IgG1 humana, de IgG2 humana o de IgG3 humana.

55 En una realización adicional, el anticuerpo IgG4 estabilizado anti-CD38 es un anticuerpo IgG4 que comprende una cadena pesada y una cadena ligera, en donde dicha cadena pesada comprende una región constante de IgG4 humana que tiene un residuo seleccionado del grupo que consiste en: Lys, Ala, Thr, Met y Leu en la posición correspondiente a 409 y/o un resto seleccionado del grupo que consiste en: Ala, Val, Gly, Ile y Leu en la posición correspondiente a 405, y en donde dicho anticuerpo comprende opcionalmente una o más sustituciones, supresiones y/o inserciones adicionales, pero no comprende una secuencia Cys-Pro-Pro-Cys en la región de bisagra. Preferentemente, dicho anticuerpo comprende un resto de Lys o Ala en la posición correspondiente a 409 o la región CH3 del anticuerpo se ha reemplazado por la región CH3 de IgG1 humana, de IgG2 humana o de IgG3 humana.

65 En una realización adicional más, el anticuerpo IgG4 estabilizado anti-CD38 es un anticuerpo IgG4 que comprende una cadena pesada y una cadena ligera, en donde dicha cadena pesada comprende una región constante de IgG4 humana que tiene un residuo seleccionado del grupo que consiste en: Lys, Ala, Thr, Met y Leu en la posición

correspondiente a 409 y/o un resto seleccionado del grupo que consiste en: Ala, Val, Gly, Ile y Leu en la posición correspondiente a 405, y en donde dicho anticuerpo opcionalmente comprende una o más sustituciones, supresiones y/o inserciones adicionales y en donde dicho anticuerpo comprende una secuencia Cys-Pro-Pro-Cys en la región de bisagra. Preferentemente, dicho anticuerpo comprende un resto de Lys o Ala en la posición correspondiente a 409 o la región CH3 del anticuerpo se ha reemplazado por la región CH3 de IgG1 humana, de IgG2 humana o de IgG3 humana.

En una realización adicional, el anticuerpo anti-CD38 deficiente en función efectora es un anticuerpo de tipo distinto a IgG4, por ejemplo, IgG1, IgG2 o IgG3 que se ha mutado de modo que la capacidad de mediar en funciones efectoras, tales como CCDA, se ha reducido o incluso eliminado. Se han descrito ejemplos de dichas mutaciones, por ejemplo, en Dall'Acqua WF *et al.*, J Immunol. 177(2):1129-1138 (2006) y Hezareh M, J Virol.; 75 (24): 12161-12168 (2001).

Conjugados

En una realización adicional, el anticuerpo de la invención se conjuga con un resto citotóxico, un radioisótopo o un fármaco.

Dichos anticuerpos pueden producirse conjugando químicamente el otro residuo con el lado N-terminal o el lado C-terminal del anticuerpo anti-CD38 o fragmento del mismo (p. ej., una cadena H de anticuerpo anti-CD38, cadena L o fragmento específico/selectivo anti-CD38 de la misma) (véase, por ejemplo, Antibody Engineering Handbook, editado por Osamu Kanemitsu, publicado por Chijin Shokan (1994)). Dichos derivados de anticuerpos conjugados también pueden generarse por conjugación en restos internos o azúcares, cuando sea adecuado.

Los anticuerpos anti-CD38 descritos en el presente documento también pueden modificarse mediante la inclusión de cualquier número adecuado de aminoácidos modificados. La idoneidad en este contexto se determina en general por la capacidad de conservar al menos sustancialmente la selectividad y/o especificidad de CD38 asociada con el anticuerpo anti-CD38 original no derivatizado. La inclusión de uno o más aminoácidos modificados puede ser ventajosa para, por ejemplo, aumentar la semivida en suero del polipéptido, reducir la antigenicidad del polipéptido o aumentar la estabilidad durante el almacenamiento del polipéptido. El aminoácido o los aminoácidos se modifican, por ejemplo, co-traduccionalmente o post-traduccionalmente durante la producción recombinante (por ejemplo, glucosilación ligada a N en motivos N-X-S/T durante la expresión en células de mamífero) o se modifican por medios sintéticos. Los ejemplos no limitantes de un aminoácido modificado incluyen un aminoácido glucosilado, un aminoácido sulfatado, un aminoácido prenilado (por ejemplo, farnesilado, geranilgeranilado), un aminoácido acetilado, un aminoácido acilado, un aminoácido PEGilado, un aminoácido marcado con biotina, un aminoácido carboxilado, un aminoácido fosforilado y similares. Las referencias adecuadas para guiar a un experto en la modificación de aminoácidos son abundantes en la bibliografía. Se encuentran ejemplos de protocolos en Walker (1998) Protein Protocols On Cd-Rom, Humana Press, Towata, NJ.

Los anticuerpos anti-CD38 también pueden modificarse químicamente mediante conjugación covalente con un polímero para, por ejemplo, aumentar su semivida en circulación. Se ilustran ejemplos de polímeros, y métodos para unirlos a péptidos, por ejemplo, en el documento US 4.766.106, US 4.179.337, US 4.495.285 y US 4.609.546.

En una realización, la presente divulgación proporciona un anticuerpo anti-CD38 que se conjuga con una segunda molécula que se selecciona de un radionúclido, una enzima, un sustrato enzimático, un cofactor, un marcador fluorescente, un marcador quimioluminiscente, una etiqueta peptídica o una partícula magnética. En una realización, un anticuerpo anti-CD38 puede conjugarse con uno o más fragmentos de anticuerpos, ácidos nucleicos (oligonucleótidos), nucleasas, hormonas, inmunomoduladores, quelantes, compuestos de boro, agentes fotoactivos, colorantes y similares. Estos y otros agentes adecuados se pueden acoplar directa o indirectamente con un anticuerpo anti-CD38 de la presente invención. Un ejemplo de acoplamiento indirecto de un segundo agente es acoplamiento por un resto espaciador.

En una realización, se proporcionan anticuerpos anti-CD38 que comprenden uno o más aminoácidos radiomarcados. Se puede usar un anticuerpo anti-CD38 radiomarcado para fines tanto de diagnóstico como terapéuticos (la conjugación con moléculas radiomarcadas es otra posible característica). Los ejemplos no limitantes de marcadores para polipéptidos incluyen, pero sin limitación, ³H, ¹⁴C, ¹⁵N, ³⁵S, ⁹⁰Y, ⁹⁹Tc y ¹²⁵I, ¹³¹I y ¹⁸⁶Re. Se conocen en la técnica métodos para preparar aminoácidos radiomarcados y derivados peptídicos relacionados (véase, por ejemplo, Junghans *et al.*, en Cancer Chemotherapy and Biotherapy 655-686 (2ª edición, Chafner y Longo, eds., Lippincott Raven (1996)) y documentos US 4.681.581, US 4.735.210, US 5.101.827, US 5.102.990 (US RE35.500), US 5.648.471 y US 5.697.902.

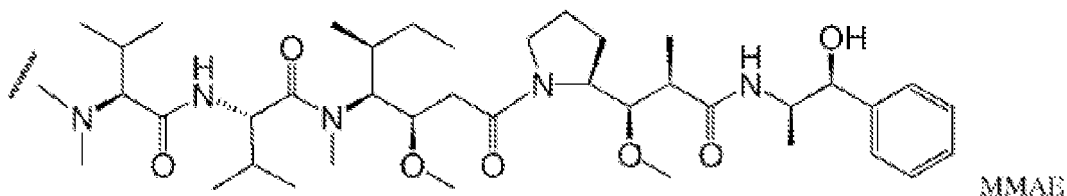
En una realización, el anticuerpo anti-CD38 de la invención se conjuga con un radioisótopo o con un quelato que contiene radioisótopos. Por ejemplo, el anticuerpo anti-CD38 puede conjugarse con un conector quelante, por ejemplo, DOTA, DTPA o tiuxetano, lo que permite que el anticuerpo anti-CD38 forme complejo con un radioisótopo. El anticuerpo anti-CD38 puede también o como alternativa comprender o estar conjugado con uno o más aminoácidos radiomarcados u otra molécula radiomarcada. Se puede usar un anticuerpo anti-CD38 radiomarcado

con fines tanto de diagnóstico como terapéuticos. Los ejemplos no limitantes de radioisótopos incluyen ^3H , ^{14}C , ^{15}N , ^{35}S , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{125}I , ^{111}In , ^{131}I , ^{186}Re , ^{213}Bi , ^{225}Ac y ^{227}Th .

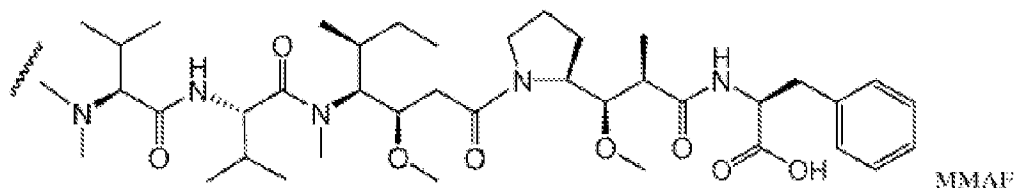
En una realización, el anticuerpo anti-CD38 de la invención se conjuga con auristatinas o análogos y derivados peptídicos de auristatina (documentos US5635483; US5780588). Se ha mostrado que las auristatinas interfieren con la dinámica de los microtúbulos, hidrólisis de GTP y división nuclear y celular (Woyke *et al* (2001) *Antimicrob. Agents and Chemother.* 45 (12): 3580-3584) y tienen actividad antineoplásica (documento US5663149) y antifúngica (Pettit *et al.*, (1998) *Antimicrob. Agents and Chemother.* 42: 2961-2965). El residuo farmacológico de auristatina puede unirse al anticuerpo, a través de un conector, a través del extremo N (amino) o el (extremo) C del resto farmacológico peptídico.

Las realizaciones ejemplares de auristatina incluyen los restos farmacológicos de monometil auristatina unidos a extremo N DE y DF, desvelados en Senter *et al.*, *Proceedings of the American Association for Cancer Research*. Volumen 45, número de resumen 623, presentado el 28 de marzo de 2004 y descrito en el documento US 2005/0238648).

Un ejemplo de realización de auristatina es MMAE (monometil auristatina E), en donde la línea ondulada indica la unión covalente al enlazador (E) de un conjugado de anticuerpo-fármaco:



Otra realización ejemplar de auristatina es MMAF (monometil auristatina F), en donde la línea ondulada indica la unión covalente a un enlazador (E) de un conjugado de anticuerpo-fármaco (documento US2005/0238649):



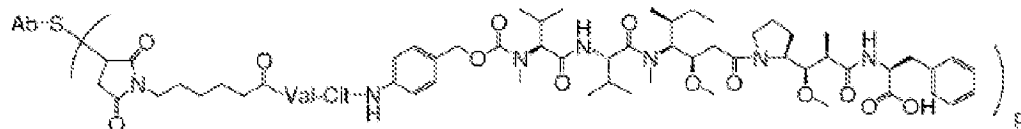
Los conjugados de anticuerpo anti-CD38-fármaco según la invención, comprenden una unidad enlazadora entre la unidad de fármaco citostático y la unidad de anticuerpo. En algunas realizaciones, el enlazador es escindible en condiciones intracelulares, de tal manera que la escisión del enlazador libera la unidad de fármaco del anticuerpo en el entorno intracelular. En otra realización más, la unidad enlazadora no es escindible y el fármaco se libera, por ejemplo, por degradación de anticuerpos. En algunas realizaciones, el enlazador es escindible mediante un agente escindible que está presente en el entorno intracelular (por ejemplo, dentro de un lisosoma o endosoma o caveola). El enlazador puede ser, por ejemplo, un enlazador peptídico que se escinde con una peptidasa intracelular o enzima proteasa, incluyendo, pero sin limitación, una proteasa lisosómica o endosómica. En algunas realizaciones, el enlazador peptídico tiene una longitud de al menos dos aminoácidos o de al menos tres aminoácidos. Los agentes de escisión pueden incluir catepsinas B y D y plasmina, todos ellos conocidos por hidrolizar derivados de fármacos dipeptídicos que dan como resultado la liberación de fármacos activos dentro de las células diana (véase, por ejemplo, Dubowchik y Walker, 1999, *Pharm. Therapeutics* 83: 67-123). En una realización específica, el enlazador peptídico escindible con una proteasa intracelular, es un enlazador de Val-Cit (valina-citrulina) o un enlazador de Phe-Lys (fenilalanina-lisina) (véase, por ejemplo, el documento US6214345, que describe la síntesis de doxorubicina con el enlazador de Val-Cit). Una ventaja de usar la liberación proteolítica intracelular del agente terapéutico, es que normalmente el agente se atenúa cuando se conjuga y que las estabidades en suero de los conjugados son normalmente altas.

En otra realización más, la unidad enlazadora no es escindible y el fármaco se libera por degradación de anticuerpos (véase el documento US 2005/0238649). Normalmente, dicho enlazador no es sustancialmente sensible al entorno extracelular. Como se usa en el presente documento, "no sustancialmente sensible al entorno extracelular" en el contexto de un enlazador, significa que, en una muestra de compuesto de conjugado de anticuerpo-fármaco, no más del 20 %, normalmente no más de aproximadamente el 15 %, más normalmente no más de aproximadamente el 10 %, e incluso más normalmente, no más de aproximadamente el 5 %, no más de aproximadamente el 3%, o no más de aproximadamente el 1% de los enlazadores, se escinde, cuando el compuesto de conjugado de anticuerpo-fármaco está presente en un entorno extracelular (por ejemplo, plasma). Se puede determinar si un enlazador no es sustancialmente sensible al entorno extracelular, por ejemplo, incubando con plasma el compuesto de conjugado de anticuerpo-fármaco durante un periodo de tiempo predeterminado (por ejemplo, 2, 4, 8, 16 o 24 horas) y después

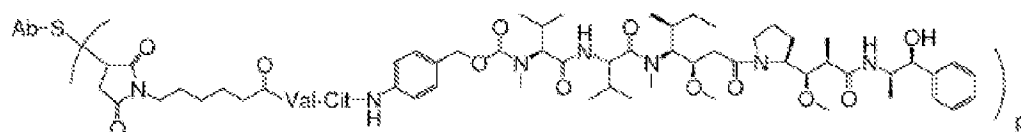
cuantificando la cantidad de fármaco presente en el plasma.

Otras realizaciones ejemplares que comprenden MMAE o MMAF y diversos componentes enlazadores tienen las siguientes estructuras (en donde Ab significa anticuerpo y p, que representa la carga del fármaco (o número promedio de fármacos citostáticos por molécula), varía de 1 a aproximadamente 8).

Son ejemplos en los que un enlazador escindible se combina con una auristatina los que incluyen vcMMAF y vcMMAE (vc es la abreviatura del enlazador basado en Val-Cit (valina-citrulina)):

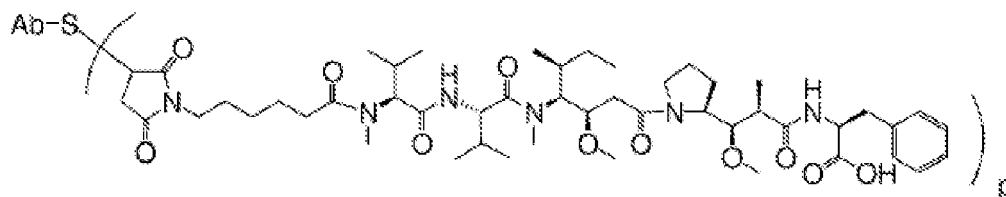


Ab-MC-vc-PAB-MMAF



Ab-MC-vc-PAB-MMAE

Otros ejemplos incluyen auristatinas combinadas con un enlazador no escindible, tales como mcMMAF. (mc es una abreviatura de maleimido caproílo):



Ab-MC-MMAF

La carga de fármaco citostático se representa con una p y es el número promedio de fracciones de fármaco citostático por anticuerpo en una molécula (también denominado relación de fármaco con respecto a anticuerpo, DAR en inglés por *drug to antibody ratio*). La carga de fármaco citostático puede variar de 1 a 20 fracciones de fármaco por anticuerpo y puede aparecer en aminoácidos con grupos funcionales útiles, tales como, aunque sin limitación, grupos amino o sulfhidrilo, como en lisina o cisteína.

Dependiendo de la forma de conjugación, p puede estar limitado por el número de sitios de unión en el anticuerpo, por ejemplo, donde la unión es un tiol de cisteína, como ocurre en la presente invención. En general, los anticuerpos no contienen muchos grupos tiol de cisteína libres y reactivos que puedan estar unidos a un residuo farmacológico, ya que en los anticuerpos, la mayoría de los restos tiol de cisteína existen como puentes disulfuro. Por lo tanto, en determinadas realizaciones, un anticuerpo puede reducirse con un agente reductor, tal como ditioneitol (DTT) o tricarbonyltilfosfina (TCEP), en condiciones parcial o totalmente reductoras, para generar grupos tiol de cisteína reactivos. En determinadas realizaciones, la carga de fármaco de un CAF (conjugado de anticuerpo-fármaco) de la invención, varía de 1 a aproximadamente 8, ya que se dispone de un máximo de 8 grupos tiol de cisteína libres después de la reducción (parcial) del anticuerpo (hay 8 cisteínas implicadas en el enlace disulfuro entre cadenas).

En una realización, el residuo farmacológico enlazador es vcMMAE. El residuo farmacológico enlazador vcMMAE y los métodos de conjugación se desvelan en los documentos WO2004010957, US7659241, US7829531, US7851437 y US 11/833 028 (Seattle Genetics, Inc.), y el residuo farmacológico enlazador vcMMAE se une a los anticuerpos anti-CD38 en las cisteínas, usando un método similar al de los desvelados en los mismos.

En una realización, el residuo farmacológico enlazador mcMMAF. El residuo farmacológico enlazador mcMMAF y los métodos de conjugación se desvelan en los documentos US7498298, US 11/833 954 y WO2005081711 (Seattle Genetics, Inc.), y el residuo farmacológico enlazador mcMMAF se une a los anticuerpos anti-CD38 en las cisteínas, usando un método similar al de los desvelados en los mismos.

Después de la purificación de los conjugados de anticuerpo anti-CD38-fármaco, éstos pueden formularse en

composiciones farmacéuticas usando vehículos o excipientes farmacéuticos bien conocidos.

En una realización, un anticuerpo anti-CD38 se conjuga con una molécula de ácido nucleico funcional. Los ácidos nucleicos funcionales incluyen moléculas antisentido, moléculas de ácido nucleico de interferencia (p. ej., moléculas de ARNip), aptámeros, ribozimas, moléculas formadoras de triplex y secuencias guía externas. Las secuencias guía externas (SGE) son moléculas que se unen a una molécula de ácido nucleico diana que forma un complejo que es reconocido por la RNasa P, que escinde la molécula diana. Las moléculas de ácido nucleico funcionales pueden actuar como efectores, inhibidores, moduladores y estimuladores de una actividad específica que posee una molécula diana, o las moléculas de ácido nucleico funcionales pueden poseer una actividad *de novo* independiente de cualquier otra molécula. En la siguiente lista no limitativa de patentes de los Estados Unidos, puede encontrarse una muestra representativa de métodos y técnicas que ayudan en el diseño y uso de moléculas antisentido: US 5 135 917, US 5 294 533, US 5 627 158, US 5 641 754, US 5 691 317, US 5 780 607, US 5 786 138, US 5 849 903, US 5 856 103, US 5 919 772, US 5 955 590, US 5 990 088, US 5 994 320, US 5 998 602, US 6 005 095, US 6 007 995, US 6 013 522, US 6 017 898, US 6 018 042, US 6 025 198, US 6 033 910, US 6 040 296, US 6 046 004, US 6 046 319 y US 6 057 437.

Puede emplearse cualquier método conocido en la técnica, tal como los descritos anteriormente, para conjugar el anticuerpo anti-CD38 con la(s) molécula(s) conjugada(s), incluidos los métodos descritos por Hunter *et al.*, Nature 144, 945 (1962), David *et al.*, Biochemistry 13, 1014 (1974), Pain *et al.*, J. Immunol. Meth. 40, 219 (1981) y Nygren, J. Histochem. y Cytochem. 30, 407 (1982). El enlace/conjugación puede realizarse de cualquier manera adecuada. Por ejemplo, un enlace covalente puede adoptar la forma de un enlace disulfuro (si fuera necesario y adecuado, podría diseñarse un anticuerpo anti-CD38 para que contenga un codón de cisteína adicional). Una molécula de toxina, derivatizada con un grupo sulfhidrilo reactivo con la cisteína del anticuerpo anti-CD38 modificado, puede formar un inmunoconjugado con el anticuerpo anti-CD38. Como alternativa, se puede introducir un grupo sulfhidrilo directamente en un anticuerpo anti-CD38 usando técnicas de polipéptidos en fase sólida. Por ejemplo, Hiskey describe la introducción de grupos sulfhidrilo en péptidos, Peptides 3, 137 (1981). La introducción de grupos sulfhidrilo en proteínas se describe en Maasen *et al.*, Eur. J. Biochem. 134, 32 (1983).

Numerosos tipos de compuestos citotóxicos pueden unirse a proteínas usando un grupo reactivo en el compuesto citotóxico o usando un agente reticulante. Un grupo reactivo común que formará un enlace covalente estable *in vivo* con una amina es isotiocianato (Means *et al.*, Chemical modifications of proteins (Holden-Day, San Francisco 1971) págs. 105-110). Este grupo reacciona preferentemente con el grupo ϵ -amina de lisina. La maleimida es un grupo reactivo de uso común para formar un enlace covalente y estable *in vivo* con el grupo sulfhidrilo en cisteína (Ji., Métodos Enzymol 91, 580-609 (1983)). Normalmente, los anticuerpos monoclonales son incapaces de formar enlaces covalentes con iones radiometálicos, pero pueden unirse al anticuerpo indirectamente usando agentes quelantes que están unidos mediante enlace covalente a los anticuerpos. Los agentes quelantes pueden unirse a través de aminas (Meares *et al.*, Anal. Biochem. 142, 68-78 (1984)) y grupos sulfhidrilo (Koyama, Chem. Abstr. 120, 217262t (1994)) de restos de aminoácidos y también a través de grupos de hidratos de carbono (Rodwell *et al.*, PNAS USA 83, 2632-2636 (1986), Quadri *et al.*, Nucl. Med. Biol. 20, 559-570 (1993)). Un agente terapéutico o de diagnóstico también puede estar unido, o como alternativa puede unirse, en la región bisagra de un componente de anticuerpo reducido a través de la formación de enlaces disulfuro.

En una realización, la presente invención proporciona un anticuerpo anti-CD38, tal como un anticuerpo anti-CD38 recombinante, conjugado con una fracción terapéutica, tal como una citotoxina, un fármaco quimioterapéutico, un inmunosupresor o un radioisótopo. En el presente documento, dichos conjugados reciben el nombre de "inmunoconjugados". Los inmunoconjugados que incluyen una o más citotoxinas reciben el nombre de "inmunotoxinas". Una citotoxina o un agente citotóxico incluye cualquier agente que sea perjudicial para las células (p. ej., destruya las células). Para una descripción de estas clases de fármacos que son bien conocidas en la técnica, y sus mecanismos de acción, véase Goodman *et al.*, Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis Of Therapeutics, 8ª ed., Macmillan Publishing Co., 1990. Se proporcionan técnicas adicionales relevantes para la preparación de inmunotoxinas de anticuerpos, por ejemplo, en Vitetta, Immunol. Today 14, 252 (1993) y en el documento US 5 194 594.

Los agentes terapéuticos adecuados para formar inmunoconjugados de la invención incluyen, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorubicina, dihidroxiانترacindiona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-deshidro-testosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol y puromicina, antimetabolitos (tales como metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, fludarabina, 5-fluorouracilo, dacarbazina, hidroxixurea, asparaginasa, gemcitabina, cladribina), agentes alquilantes (tales como mecloretamina, tioepa, clorambucilo, melfalán, carmustina (BSNU), lomustina (CCNU), ciclofosfamida, busulfán, dibromomanitol, estreptoizotocina, dacarbazina (DTIC), procarbina, mitomicina C, cisplatino y otros derivados de platino, tal como carboplatino), antibióticos (tales como dactinomicina (anteriormente actinomicina), bleomicina, daunorubicina (anteriormente daunomicina), doxorubicina, idarubicina, mitramicina, mitomicina, mitoxantrona, plicamicina, antramycin (AMC)), toxina de la difteria y moléculas relacionadas (tales como la cadena A de la difteria y sus fragmentos activos y moléculas híbridas), toxina de ricina (tal como ricina A o una toxina de cadena de ricina A desglucosilada), toxina del cólera, una toxina tipo Shiga (SLT-I, SLT-II, SLT-III), toxina LT, toxina C3, toxina Shiga, toxina tosferínica, toxina

tetánica, inhibidor de proteasa Bowman-Birk de soja, exotoxina de *Pseudomonas*, alorina, saporina, modeccina, gelanina, cadena A de abrina, cadena A de modeccina, alfa-sarcina, proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas de diantina, proteínas de *Phytolacca americana* (PAPI, PAPII y PAPS), inhibidor de *Momordica charantia*, curcina, crotina, inhibidor de *Saponaria officinalis*, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, toxinas de enomicina, calicamicinas y duocarmicinas. Agentes terapéuticos, que puede administrarse en combinación con un anticuerpo anti-CD38 de la presente invención, como se describe en cualquier otra parte del presente documento, también pueden ser candidatos para fracciones terapéuticas útiles para la conjugación con un anticuerpo anti-CD38 de la presente invención.

Como se ha indicado anteriormente, el residuo farmacológico no debe interpretarse como limitado a los agentes terapéuticos químicos clásicos. Por ejemplo, el residuo farmacológico puede ser una proteína o un polipéptido que posea una actividad biológica deseada. En una realización, el anticuerpo anti-CD38 de la presente invención está unido a un enlazador quelante, por ejemplo, tiuxetán, que permite que el anticuerpo se conjugue con un radioisótopo.

Anticuerpos biespecíficos

En un aspecto adicional, la invención se refiere a una molécula biespecífica que comprende un primer sitio de unión a antígeno de un anticuerpo anti-CD38 de la invención como se describe anteriormente en este documento y un segundo sitio de unión a antígeno con una especificidad de unión diferente, tal como una especificidad de unión por una célula efectora humana, un receptor de Fc humano, un receptor de linfocitos T, un receptor de linfocitos B o una especificidad de unión por un epítopo de CD38 no solapante, es decir, un anticuerpo biespecífico en donde el primer y el segundo sitio de unión al antígeno no se bloquean en cruzado entre sí para unirse a CD38, por ejemplo, cuando se ensaya como se describe en el Ejemplo 3.

Las moléculas de anticuerpos biespecíficos ejemplares de la invención comprenden (i) dos anticuerpos, uno con una especificidad para CD38 y otro para una segunda diana que se conjugan entre sí, (ii) un anticuerpo sencillo que tiene una cadena o brazo específico para CD38 y una segunda cadena o brazo específico para una segunda molécula, (iii) un anticuerpo monocatenario que tiene especificidad para CD38 y una segunda molécula, por ejemplo, a través de dos scFv unidos en tándem por un enlazador peptídico adicional; (iv) un anticuerpo de dominio variable doble (DVD-Ig), donde cada cadena ligera y cadena pesada contiene dos dominios variables en tándem a través de un enlace peptídico corto (Wu et al., Generation and Characterization of a Dual Variable Domain Immunoglobulin (DVD-Ig™) Molecule, In: Antibody Engineering, Springer Berlin Heidelberg (2010)); (v) un fragmento (Fab)₂ biespecífico unido químicamente; (vi) un Tandab, que es una fusión de dos diacuerpos monocatenarios que da como resultado un anticuerpo biespecífico tetravalente que tiene dos sitios de unión para cada uno de los antígenos diana; (vii) un flexibody, que es una combinación de los scFv con un diacuerpo que da como resultado una molécula multivalente; (viii) una molécula denominada de "acoplamiento y bloqueo", basada en el "dominio de dimerización y acoplamiento" en la proteína cinasa A, que, cuando se aplica a los Fab, puede producir una proteína de unión biespecífica trivalente que consiste en dos fragmentos Fab idénticos unidos a un fragmento Fab diferente; (ix) una molécula denominada Escorpión, que comprende, por ejemplo, dos scFv fusionados a ambos extremos de una región Fc humana; y (x) un diacuerpo. En una realización, el anticuerpo biespecífico de la presente invención es un diacuerpo, un cuerpo cruzado, o un anticuerpo biespecífico obtenido a través de un intercambio de brazo Fab controlado como los descritos en la presente invención.

Como ejemplos de plataformas útiles para la preparación de anticuerpos biespecíficos se incluyen, pero sin limitación, BiTE (Micromet), DART (MacroGenics), Fcab y Mab² (F-star), IgG1 diseñado para Fc (Xencor) o DuoBody (basado en el intercambio de brazos Fab, Genmab, esta solicitud).

Como ejemplos de diferentes clases de anticuerpos biespecíficos se incluyen, pero sin limitación

- moléculas asimétricas de tipo IgG, en donde un lado de la molécula contiene la región Fab o parte de la región Fab de al menos un anticuerpo, y el otro lado de la molécula contiene la región Fab o partes de la región Fab de al menos otro anticuerpo; en esta clase, la asimetría en la región Fc también podría estar presente y usarse para el enlace específico de las dos partes de la molécula;
- moléculas simétricas de tipo IgG, en donde cada uno de los dos lados de la molécula contiene la región Fab o parte de la región Fab de al menos dos anticuerpos diferentes;
- moléculas de fusión de IgG, en donde los anticuerpos de IgG de longitud completa se fusionan con regiones Fab adicionales o partes de regiones Fab;
- moléculas de fusión Fc, en donde las moléculas Fv monocatenarias o los diacuerpos estabilizados se fusionan con regiones Fcy o partes de las mismas;
- moléculas de fusión Fab, en donde diferentes fragmentos Fab se fusionan entre sí;
- moléculas basadas en scFv y diacuerpos en donde diferentes moléculas Fv monocatenarias o diferentes diacuerpos se fusionan entre sí o con otra proteína o molécula transportadora.

Como ejemplos de moléculas asimétricas de tipo IgG se incluyen, pero sin limitación, Triomab/Quadroma (Trion Pharma/Fresenius Biotech), los botones en ojaes (*Knobs-into-Holes*) (Genentech), los Mab cruzados (Roche) y

emparejados electrostáticamente (Amgen), el LUZ-Y (Genentech), el cuerpo de dominio de ingeniería de Strand Exchange (EMD Serono), el Biclonic (Merus) y el DuoBody (Genmab A/S).

Como ejemplos de moléculas simétricas de tipo IgG se incluyen, pero sin limitación, la Ig de doble direccionamiento (DT, *Dual Targeting*) (GSK/Domantis), el anticuerpo dos en uno (Genentech), los Mab reticulados (Karmanos Cancer Center), mAb² (F-Star) y CovX-body (CovX/Pfizer).

Como ejemplos de moléculas de fusión de IgG se incluyen, pero sin limitación, Ig de dominio variable doble (DVD) (Abbott), biespecífico de tipo IgG (ImClone/Eli Lilly), Ts2Ab (MedImmune/AZ) y BsAb (Zymogenetics), HERCULES (Biogen Idec) y TvAb (Roche).

Como ejemplos de moléculas de fusión Fc se incluyen, pero sin limitación, fusiones de ScFv/Fc (Academic Institution), SCORPION (Emergent BioSolutions/Trubion, Zymogenetics/BMS), tecnología de redireccionamiento de doble afinidad (Fc-DART) (Macro-Genics) y (ScFv)₂-Fab doble (National Research Center for Antibody Medicine - China).

Como ejemplos de anticuerpos biespecíficos de clase V se incluyen, pero sin limitación, F(ab)₂ (Medarex/Amgen), Dual-Action o Bis-Fab (Genentech), Dock-and-Lock (DNL) (ImmunoMedics), Bivalente Biespecífico (Biotecnol) y Fab-Fv (UCB-Cell-tech).

Como ejemplos de moléculas basadas en ScFv y diacuerpos se incluyen, pero sin limitación, un acoplador biespecífico de linfocitos T (BiTE) (Micromet9, diacuerpos en tándem (Tandab) (Affimed), tecnología de redireccionamiento de doble afinidad (DART) (MacroGenics), diacuerpos monocatenarios (Academic), anticuerpos de tipo RCT (AIT, ReceptorLogics), fusión de seroalbúmina humana y ScFv (Merrimack) y COMBODY (Epigen Biotech).

En un aspecto adicional, la invención se refiere a una molécula biespecífica que comprende un anticuerpo anti-CD38 de la invención como se describe anteriormente en el presente documento y una segunda especificidad de unión tal como una especificidad de unión para citocinas humanas. En una realización, dicha citocina es una citocina antiinflamatoria tal como IL-1ra, IL-4, IL-6, IL-10, IL-11, IL-13, IL-16, IFN-alfa y TGF-beta. En otra realización, dicha citocina es una citocina proinflamatoria tal como IL-1 alfa, IL-1beta e IL-6. En una realización, la especificidad de unión es para una célula efectora humana, un receptor de Fc humano o un receptor de linfocitos T. En una realización, dicho receptor de linfocitos T es CD3. En otra realización, dicho receptor de Fc humano es FcγRI humano (CD64), FcγRII humano (CD32), FcγRIII (CD16) o un receptor Fcα humano (CD89). Las moléculas biespecíficas de la presente invención pueden incluir además una tercera especificidad de unión, además de una especificidad de unión anti-CD38 y una especificidad de unión para una célula efectora humana, un receptor de Fc humano o un receptor de linfocitos T.

Las moléculas de anticuerpos biespecíficos ejemplares de la invención comprenden (i) dos anticuerpos, conjugados entre sí, uno con una especificidad para CD38 y otro para una segunda diana, (ii) un anticuerpo sencillo que tiene una cadena específica para CD38 y una segunda cadena específica para una segunda molécula, y (iii) un anticuerpo monocatenario que tiene especificidad para CD38 y una segunda molécula. En una realización, la segunda molécula es un antígeno canceroso/antígeno asociado a tumor, tal como CD20, antígeno carcinoembrionario (ACE), antígeno prostático específico (APE), RAGE (antígeno renal), α-fetoproteína, CAMEL (antígeno sobre melanoma reconocido por CTL), antígenos CT (tales como MAGE-B5, -B6, -C2, -C3 y D; Mage-12; CT10; NY-ESO-1, SSX-2, GAGE, BAGE, MAGE y SAGE), antígenos de mucina (por ejemplo, MUC1, mucina-CA125, etc.), antígenos de 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 a cáncer, tal como integrina α5β3. En una realización, la segunda molécula es un factor angiogénico u otro factor de crecimiento asociado a cáncer, tal como un factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF, siglas del inglés *vascular endothelial growth factor*), un factor de crecimiento de fibroblastos (FGF, *fibroblast growth factor*), factor de crecimiento epidérmico (EGF, *epidermal growth factor*), receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR, *epidermal growth factor receptor*), angiogenina y sus receptores, particularmente receptores asociados a la progresión del cáncer (por ejemplo, uno de los receptores HER1-HER4). Otras proteínas asociadas a la progresión del cáncer comentadas en el presente documento, también pueden ser segundas moléculas adecuadas.

En una realización de la invención, el anticuerpo es un anticuerpo sencillo que tiene una cadena específica para el epítipo CD38 descrito en esta invención que comprende ácido aspártico en la posición 202 y una segunda cadena específica para un epítipo específico de CD38 que no comprende el ácido aspártico en la posición 202 (un anticuerpo no competidor). Dicho anticuerpo se describe, por ejemplo, en el documento WO2006099875, como anticuerpo 003.

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

Generación de anticuerpos biespecíficos cambiando el brazo Fab inducido por 2-MEA

En el documento WO 2008119353 (Genmab) se describe un método *in vitro* para producir anticuerpos biespecíficos y lo dan a conocer van der Neut-Kolfschoten et al. (Science. 14 de septiembre de 2007; 317(5844): 1554-7). En el presente documento, un anticuerpo biespecífico se forma cambiando el "brazo Fab" o "semimolécula" (intercambiando una cadena pesada y una cadena ligera unida) entre dos anticuerpos monoespecíficos de tipo IgG4 o IgG4 después de la incubación en condiciones reductoras suaves. Esta reacción de cambio de brazo Fab es el resultado de una reacción de isomerización de enlace disulfuro en la que los enlaces disulfuro entre cadenas pesadas en las regiones bisagra de los anticuerpos monoespecíficos se reducen y las cisteínas libres resultantes forman un nuevo enlace disulfuro entre las cadenas pesadas con restos de cisteína de otra molécula de anticuerpo con una especificidad diferente. El producto resultante es un anticuerpo biespecífico que tiene dos brazos Fab con diferentes secuencias.

En una nueva divulgación, el conocimiento de este cambio de brazo Fab de IgG4 natural se adapta para generar un método para producir anticuerpos biespecíficos estables basados en IgG1. El producto de anticuerpo biespecífico generado por este método descrito a continuación, ya no participará en el cambio de brazo Fab de IgG4. La base de este método es el uso de dominios CH3 complementarios, que promueven la formación de heterodímeros en condiciones de ensayo específicas. Para permitir la producción de anticuerpos biespecíficos por este método, se generaron moléculas de IgG1 portadoras de determinadas mutaciones en el dominio CH3: en uno de los anticuerpos parentales IgG1 las mutaciones T350I, K370T y F405L en el otro anticuerpo parental IgG1, la mutación K409R.

Para generar anticuerpos biespecíficos, estos dos anticuerpos parentales, cada anticuerpo a una concentración final de 0,5 mg/ml (concentración equimolar), se incubaron con clorhidrato de 2-mercaptoetilamina (2-MEA) 25 mM en un volumen total de 100 µl de TE a 37 °C durante 90 min. La reacción de reducción se detiene cuando se elimina el agente reductor 2-MEA usando columnas giratorias (filtros de centrifuga Microcon, 30k, Millipore) según el protocolo del fabricante. Mediante este método, se pueden generar los siguientes anticuerpos biespecíficos:

Un anticuerpo biespecífico en el que el anticuerpo anti-CD38 es 025, 026, 028, 049 o 056, y el segundo residuo de unión es un anticuerpo anti-CD3.

Un anticuerpo biespecífico en el que el anticuerpo anti-CD38 es 025, 026, 028, 049 o 056, y el segundo residuo de unión es un anticuerpo anti-CD20, tal como ofatumumab.

Un anticuerpo biespecífico en el que el anticuerpo anti-CD38 es 025, 026, 028, 049 o 056, y el segundo residuo de unión es un anticuerpo anti-CD16.

Un anticuerpo biespecífico en el que el anticuerpo anti-CD38 es 025, 026, 028, 049 o 056, y el segundo residuo de unión es un anticuerpo anti-CD32.

Un anticuerpo biespecífico en el que el anticuerpo anti-CD38 es 025, 026, 028, 049 o 056, y el segundo residuo de unión es un anticuerpo anti-CD64.

Ácidos nucleicos, vectores, células hospedadoras y método para producir anticuerpos de la invención

En un aspecto adicional, la invención se refiere a ácidos nucleicos que codifican (partes de) un anticuerpo de la invención y a vectores de expresión que comprenden dichos ácidos nucleicos.

En una realización, el vector de expresión de la invención comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una o más de las secuencias de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en: SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 5.

En una realización adicional, el vector de expresión comprende además una secuencia de nucleótidos que codifica la región constante de una cadena ligera, una cadena pesada o tanto la cadena ligera como la cadena pesada de un anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo humano.

Dichos vectores de expresión pueden usarse para la producción recombinante de anticuerpos de la invención.

Un vector de expresión, en el contexto de la presente invención, puede ser cualquier vector adecuado, incluyendo vectores cromosómicos, no cromosómicos y sintéticos de ácido nucleico (una secuencia de ácido nucleico que comprende un conjunto adecuado de elementos de control de expresión). Ejemplos de dichos vectores incluyen derivados de SV40, plásmidos bacterianos, ADN de fagos, baculovirus, plásmidos de levadura, vectores derivados de combinaciones de plásmidos y ADN de fagos, y vectores víricos de ácido nucleico (ARN o ADN). En una realización, un ácido nucleico que codifica el anticuerpo anti-CD38 está comprendido en un vector desnudo de ADN o ARN, incluyendo, por ejemplo, un elemento de expresión lineal (como se describe, por ejemplo, en Sykes y Johnston, Nat Biotech 17, 355-59 (1997)), un vector de ácido nucleico compactado (como se describe, por ejemplo, en los documentos US 6 077 835 y/o WO 00/70087), un vector plasmídico tal como pBR322, pUC 19/18 o pUC 118/119, un vector de ácido nucleico de un tamaño mínimo de "mosquito" (como se describe, por ejemplo, en Schakowski et al., Mol Ther 3, 793-800 (2001)), o como una construcción de vector de ácido nucleico precipitado, tal como una construcción precipitada con CaPO4 (como se describe, por ejemplo, en el documento WO 00/46147,

Benvenisty y Reshef, PNAS USA 83, 9551-55 (1986), Wigler et al., Cell 14, 725 (1978), y Coraro y Pearson, Somatic Cell Genetics 7, 603 (1981)). Dichos vectores de ácido nucleico y su uso son bien conocidos en la técnica (véanse, por ejemplo, los documentos US 5 589 466 y US 5 973 972).

- 5 En una realización, el vector es adecuado para la expresión del anticuerpo anti-CD38 en una célula bacteriana. En otra realización, el vector de expresión puede ser un vector adecuado para la expresión en un sistema de levadura. Lo más normalmente, el vector será un vector adecuado para la expresión del anticuerpo de la invención en una célula de mamífero, tal como una célula CHO, HEK o PER.C6® (línea celular humana desarrollada por DSM y Crucell NV, Países Bajos). Otro sistema de vector adecuado es el sistema de vector de glutamina sintetasa (GS) desarrollado por Lonza Biologics (véanse, por ejemplo, los documentos EP216846, US5981216, WO8704462, EP323997, US5591639, US5658759, EP338841, US5879936 y US5891693).

- 15 En un vector de expresión de la invención, los ácidos nucleicos que codifican el anticuerpo anti-CD38, pueden comprender o estar asociados a cualquier promotor, potenciador y a otros elementos adecuados que faciliten la expresión. Los ejemplos de dichos elementos incluyen promotores de expresión fuertes (por ejemplo, el promotor/potenciador temprano inmediato del citomegalovirus (CMV IE) humano así como promotores del VRS (virus respiratorio sincial), SV40, SL3-3, MMTV y de LTR (del inglés *Long Terminal Repeat*, repetición terminal larga) del VIH)), secuencias eficaces de terminación de poli (A), un origen de replicación para el producto plasmídico en *E. coli*, un gen de resistencia a antibióticos como marcador de selección, y/o un sitio de clonación conveniente (por ejemplo, un polienlazador). Los ácidos nucleicos también pueden comprender un promotor inducible en oposición a un promotor constitutivo tal como el promotor de CMV IE.

- 25 En una realización, el vector de expresión que codifica el anticuerpo anti-CD38 puede colocarse en, y/o suministrarse a, la célula hospedadora o al animal hospedador, mediante un vector vírico.

- 30 En otro aspecto más, la invención se refiere a una célula hospedadora recombinante eucariota o procariota, tal como un transfectoma, que produce un anticuerpo de la invención como se define en el presente documento. Los ejemplos de células hospedadoras incluyen células de levaduras, de bacterias y de mamíferos, tales como células CHO, HEK o PER.C6®. Por ejemplo, en una realización, la presente invención proporciona una célula que comprende un ácido nucleico integrado de manera estable en el genoma celular que comprende una secuencia que codifica la expresión de un anticuerpo anti-CD38 de la presente invención. En otra realización, la presente invención proporciona una célula que comprende un ácido nucleico no integrado, tal como un plásmido, cósmido, fagémido, o elemento de expresión lineal, que comprende una secuencia que codifica la expresión de un anticuerpo anti-CD38 de la invención.

- 35 En un aspecto adicional, la divulgación se refiere a un hibridoma que produce un anticuerpo de la invención como se define en el presente documento. En otro aspecto más, la divulgación se refiere a un animal transgénico no humano que comprende ácidos nucleicos que codifican una cadena pesada humana y una cadena ligera humana, en donde el animal o la planta produce un anticuerpo de la invención. La generación de dichos hibridomas y animales transgénicos se ha descrito anteriormente.

- 40 En un aspecto adicional, la invención se refiere a un método para producir un anticuerpo anti-CD38 de la invención, comprendiendo dicho método las etapas de:

- 45 a) cultivar una célula hospedadora de la invención como se describe anteriormente en este documento, y
b) purificar el anticuerpo de la invención de los medios de cultivo.

Composiciones farmacéuticas

- 50 En otro aspecto más, la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende:

- un anticuerpo anti-CD38 como se define en el presente documento, y
- un vehículo farmacéuticamente aceptable.

- 55 Las composiciones farmacéuticas pueden formularse con vehículos o diluyentes farmacéuticamente aceptables, así como con cualquier otro adyuvante y excipiente conocido de acuerdo con técnicas convencionales tales como las desveladas en Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19ª edición, Gennaro, Ed., Mack Publishing Co., Easton, PA, 1995. Una composición farmacéutica de la presente invención también puede incluir diluyentes, cargas, sales, tampones, detergentes (por ejemplo, un detergente no iónico, tal como Tween-20 o Tween-80), estabilizadores (por ejemplo, azúcares o aminoácidos sin proteínas), conservantes, fijadores de tejidos, solubilizantes y/u otros materiales adecuados para su inclusión en una composición farmacéutica.

- 65 Los vehículos o diluyentes farmacéuticamente aceptables, así como cualquier otro adyuvante y excipiente conocido, deberían ser adecuados para el compuesto elegido de la presente invención y el modo de administración elegido. La idoneidad de los vehículos y otros componentes de las composiciones farmacéuticas se determina basándose en la ausencia de un impacto negativo significativo sobre las propiedades biológicas deseadas de la composición

farmacéutica o compuesto elegido de la presente invención (por ejemplo, inferior a un impacto sustancial (inhibición relativa de 10 % o inferior, inhibición relativa de 5 % o inferior, etc.)) sobre la unión con el antígeno.

5 Los niveles de dosificación reales de los principios activos en las composiciones farmacéuticas de la presente invención, pueden modificarse para obtener una cantidad del principio activo que sea eficaz para lograr la respuesta terapéutica deseada para un paciente, una composición y un modo de administración particulares, sin ser tóxicos para el paciente. El nivel de dosificación seleccionado dependerá de una diversidad de factores farmacocinéticos, entre los que se incluyen, la actividad de las composiciones particulares empleadas de la presente invención, o de su amida, la vía de administración, el tiempo de administración, la tasa de excreción del compuesto particular que se
10 esté empleando, la duración del tratamiento, otros fármacos, compuestos y/o materiales usados en combinación con las composiciones particulares empleadas, la edad, el sexo, el peso, la afección, la salud general y los antecedentes médicos previos del paciente que se está tratando, y factores similares bien conocidos en el campo de la medicina.

15 La composición farmacéutica puede administrarse por cualquier vía y modo adecuados. En la técnica se conocen bien vías de administración, *in vivo* e *in vitro*, adecuadas, de un compuesto de la presente invención y los expertos en la materia pueden seleccionarlas.

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

20 Las frases "administración parenteral" y "administrado por vía parenteral", como se usan en el presente documento, significan modos de administración distintos de la administración enteral y tópica, normalmente por inyección, e incluye infusión e inyección epidérmica, intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardíaca, intradérmica, intraperitoneal, intratendinosa, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoidea, intraespinal, intracraneal, intratorácica, epidural e intraesternal.

25 En una realización, esa composición farmacéutica se administra mediante infusión o inyección intravenosa o subcutánea.

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

35 Como vehículos farmacéuticamente aceptables se incluyen cualquiera y todos los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos, antioxidantes y agentes retardadores de la absorción, y similares, adecuados, que sean fisiológicamente compatibles con un compuesto de la presente invención.

40 Como ejemplos de vehículos acuosos y no acuosos adecuados que pueden emplearse en las composiciones farmacéuticas de la presente invención se 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, soluciones coloidales de carboximetilcelulosa, goma de tragacanto y ésteres orgánicos inyectables, tales como oleato de etilo, y/o diversos tampones. en el campo farmacéutico se conocen bien otros vehículos.

45 Las composiciones farmacéuticas de la presente invención también pueden comprender antioxidantes farmacéuticamente aceptables, por ejemplo (1) antioxidantes solubles en agua, tales como ácido ascórbico, clorhidrato 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 metálicos, tales como ácido cítrico, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), sorbitol, ácido tartárico, ácido fosfórico, y similares.

50 Las composiciones farmacéuticas de la presente invención también pueden comprender agentes ajustadores de isotonicidad, tales como azúcares, polialcoholes, tales como manitol, sorbitol, glicerol o cloruro de sodio.

55 Las composiciones farmacéuticas de la presente invención también pueden contener uno o más adyuvantes apropiados para la vía de administración elegida, tales como conservantes, agentes humectantes, agentes emulsionantes, agentes dispersantes, conservantes o tampones, que pueden mejorar el periodo de validez o la efectividad de la composición farmacéutica. Los compuestos de la presente invención pueden prepararse con vehículos que protegerán al compuesto contra la liberación rápida, tales como una formulación de liberación controlada, incluyendo implantes, parches transdérmicos y sistemas de suministro microencapsulados. En general,
60 los expertos en la materia conocen métodos para la preparación de dichas formulaciones. Véase, por ejemplo, Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1978.

65 La composición farmacéutica de la presente invención puede contener un anticuerpo de la presente invención o una combinación de dos o más anticuerpos de la presente invención.

Usos terapéuticos

En otro aspecto, la invención se refiere al anticuerpo de la invención como se define en el presente documento para su uso como un medicamento.

Los anticuerpos anti-CD38 de la presente invención tienen numerosas utilidades terapéuticas que implican el tratamiento de trastornos que implican células que expresan CD38. Por ejemplo, los anticuerpos pueden administrarse a células en cultivo, por ejemplo, *in vitro* o *ex vivo*, o a sujetos humanos, por ejemplo, *in vivo*, para tratar o prevenir una diversidad de trastornos. Como se usa en el presente documento, el término "sujeto" pretende incluir animales humanos y no humanos que responden contra el anticuerpo. Los sujetos pueden incluir, por ejemplo, pacientes humanos que tienen trastornos que pueden corregirse o mejorarse modulando funciones de CD38, tales como actividad enzimática, transducción de señales, inducción de la expresión de citocinas, inducción de proliferación o diferenciación, y/o inducción de lisis y/o eliminación/reducción del número de células que expresan CD38.

Por ejemplo, los anticuerpos anti-CD38 pueden usarse para suscitar *in vivo* o *in vitro* una o más de las siguientes actividades biológicas: modular funciones de CD38 (tales como actividad enzimática, transducción de señales, inducción de la expresión de citocinas, inducción de proliferación o diferenciación, y/o inducción de lisis), destruir una célula que exprese CD38, actuar como mediadores en la fagocitosis o CCDA de una célula que exprese CD38 en presencia de células efectoras humanas, y actuar como mediadores de CDC de una célula que exprese CD38 en presencia de complemento o destruir células que expresen CD38 mediante apoptosis.

La presente invención proporciona un anticuerpo anti-CD38 de la invención para su uso en métodos para el tratamiento o la prevención de un trastorno que implique células que expresen CD38 en un sujeto, cuyo método comprende la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo anti-CD38 de la presente invención a un sujeto que lo necesite. Dicho método implica administrar a un sujeto un anticuerpo anti-CD38 de la presente invención en una cantidad eficaz para tratar o prevenir el trastorno.

En una realización de la presente invención, el trastorno que implica células que expresan CD38, puede ser cáncer, es decir, un trastorno tumorigénico, tal como un trastorno caracterizado por la presencia de células tumorales que expresan CD38, incluyendo, por ejemplo, linfoma de células B, tumores malignos de células plasmáticas, linfoma de células T/NK y tumores malignos mieloides.

Los ejemplos de dichas enfermedades tumorigénicas incluyen linfomas/leucemias de células B incluyendo leucemia/linfoma linfoblástico de células B precursoras y linfomas no Hodgkin de células B; leucemia promielocítica aguda, leucemia linfoblástica aguda y neoplasias de células B maduras, tales como leucemia linfocítica crónica (LLC) de células B/linfoma linfocítico pequeño (LLP), leucemia linfocítica aguda de células B, leucemia prolinfocítica de células B, linfoma linfoplasmacítico, linfoma de células del manto (LCM), linfoma folicular (LF), incluyendo LF de grado bajo, intermedio y alto, linfoma cutáneo del centro folicular, linfoma de células B de la zona marginal (de tipo MALT, nodal y esplénico), tricoleucemia, linfoma difuso de células B grandes, linfoma de Burkitt, plasmacitoma, mieloma de células plasmáticas, leucemia de células plasmáticas, trastorno linfoproliferativo postrasplante, macroglobulinemia de Waldenström, leucemias de células plasmáticas y linfoma anaplásico de células grandes (LACG).

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

En una realización, el trastorno que implica células que expresan CD38 se selecciona de leucemia linfocítica crónica (LLC), leucemia linfoblástica aguda (LLA), leucemia mielógena aguda (LMA) (en adultos), linfoma de células del manto, linfoma folicular y linfoma difuso de células B grandes.

En una realización, el trastorno que implica células que expresan CD38 es el cáncer de pulmón no microcítico (CPNM).

Son ejemplos de linfomas no Hodgkin de células B, granulomatosis linfomatoide, linfoma de derrame primario, linfoma intravascular de células B grandes, linfoma mediastinal de células B grandes, enfermedades de las cadena pesadas (incluyendo enfermedad γ , μ y α), linfomas inducidos por terapia con agentes inmunosupresores, tales como linfoma inducido por ciclosporina y linfoma inducido por metotrexato.

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

Otros ejemplos de trastornos que implican células que expresan CD38 incluyen tumores malignos derivados de células T y NK que incluyen: neoplasias de células T maduras y células NK, incluida la leucemia prolinfocítica de células T, leucemia linfocítica granular de células T grandes, leucemia agresiva de células NK, leucemia/linfoma de células T en adultos, linfoma extraganglionar de células NK/T, de tipo nasal, linfoma de células T enteropático, linfoma hepatoesplénico de células T, linfoma de células T subcutáneo paniculítico, linfoma blástico de células NK,

micosis fungoide/síndrome de Sézary, trastornos linfoproliferativos primarios cutáneos de células T CD30 positivas (linfoma cutáneo primario anaplásico de células grandes LCPCG, papulosis linfomatoide, lesiones inciertas), linfoma angioinmunoblástico de células T, linfoma periférico de células T no especificado y linfoma anaplásico de células grandes.

5 Los ejemplos de tumores malignos derivados de células mieloides incluyen leucemia mieloide aguda, incluyendo leucemia promielocítica aguda y enfermedades mieloproliferativas crónicas, incluyendo leucemia mieloide crónica.

10 En otra realización de la presente invención, el trastorno que implica células que expresan CD38, es un trastorno inmunitario, tal como una enfermedad inflamatoria y/o autoinmunitaria, en el que están implicados células B, macrófagos, células plasmáticas, monocitos y células T, que expresan CD38. Como ejemplos de trastornos inmunitarios en los que están implicados células B, macrófagos, células plasmáticas, monocitos y células T, que expresan CD38, se incluyen trastornos autoinmunitarios, tales como psoriasis, artritis psoriásica, dermatitis, esclerodermia sistémica y esclerosis, enfermedad inflamatoria intestinal (EII), enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, 15 síndrome de dificultad respiratoria, meningitis, encefalitis, uveítis, glomerulonefritis, eccema, asma, aterosclerosis, deficiencia de adhesión leucocitaria, esclerosis múltiple, síndrome de Raynaud, síndrome de Sjogren, diabetes de inicio juvenil, enfermedad de Reiter, enfermedad de Behcet, nefritis inmunitaria compleja, nefropatía por IgA, polineuropatías por IgM, trombocitopenias inmunomediadas, tales como púrpura trombocitopénica idiopática aguda y púrpura trombocitopénica idiopática crónica, anemia hemolítica, miastenia grave, nefritis lúpica, lupus eritematoso sistémico, artritis reumatoide (AR), dermatitis atópica, pénfigo, enfermedad de Graves, tiroiditis de Hashimoto, granulomatosis de Wegener, síndrome de Omenn, insuficiencia renal crónica, mononucleosis infecciosa aguda, esclerosis múltiple, VIH y enfermedades asociadas a herpesvirus. Otros ejemplos son el síndrome de dificultad respiratoria aguda grave y la coriorretinitis. Asimismo, se incluyen otras enfermedades y trastornos, tales como los causados o mediados por infección de linfocitos B con virus, tales como el virus de Epstein-Barr (VEB).

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

Otros ejemplos de trastornos inflamatorios, inmunitarios y/o autoinmunitarios, en los que los autoanticuerpos y/o la actividad excesiva de linfocitos B y T son importantes y que pueden tratarse según la presente invención, incluyen 30 los siguientes: vasculitis y otros trastornos vasculares, tales como poliangeítis microscópica, síndrome de Churg-Strauss y otras vasculitis asociadas a ANCA (siglas del inglés *antineutrophil cytoplasmic antibodies*, anticuerpos anticitoplasma de neutrófilos), poliarteritis nudosa, vasculitis crioglobulinémica esencial, angieítis cutánea leucocitoclástica, enfermedad de Kawasaki, arteritis de Takayasu, arteritis de células gigantes, púrpura de Henoch-Schönlein, angieítis cerebral primaria o aislada, eritema nudoso, tromboangeítis obliterante, púrpura trombocitopénica trombótica (incluido el síndrome urémico hemolítico) y vasculitis secundaria, incluyendo vasculitis leucocitoclástica cutánea (por ejemplo, secundaria a hepatitis B, hepatitis C, macroglobulinemia de Waldenström, neoplasias de células B, artritis reumatoide, síndrome de Sjögren o lupus eritematoso sistémico); otros ejemplos son eritema nudoso, vasculitis alérgica, paniculitis, enfermedad de Weber-Christian, púrpura hiperglobulinémica y enfermedad de Buerger; trastornos de la piel, tales como dermatitis de contacto, dermatosis de IgA lineal, vitiligo, pioderma gangrenoso, epidermólisis ampollosa adquirida, pénfigo vulgar (incluyendo penfigoide cicatricial y penfigoide ampolloso), alopecia areata (incluyendo alopecia universal y alopecia total), dermatitis herpetiforme, eritema multiforme y urticaria autoinmunitaria crónica (incluyendo edema angioneurótico y vasculitis urticarial); citopenias inmunomediadas, tales como neutropenia autoinmunitaria y aplasia pura de glóbulos rojos; trastornos del tejido conectivo, tales como lupus del SNC, lupus eritematoso discoide, síndrome de CREST, enfermedad mixta del tejido 45 conectivo, polimiositis/dermatomiositis, miositis por cuerpos de inclusión, amiloidosis secundaria, crioglobulinemia de tipo I y tipo II, fibromialgia, síndrome de anticuerpos contra fosfolípidos, hemofilia secundaria, policondritis recidivante, sarcoidosis, síndrome del hombre rígido y fiebre reumática; otro ejemplo es la fascitis eosinofílica; las artritis, tales como, espondilitis anquilosante, artritis crónica juvenil, enfermedad de Still del adulto y síndrome de SAPHO; otros ejemplos son sacroileitis, artritis reactiva, enfermedad de Still y gota; trastornos hematológicos, tales como anemia aplásica, anemia hemolítica primaria (incluido el síndrome de aglutininas frías), anemia hemolítica secundaria a LLC o lupus eritematoso sistémico; síndrome de POEMS, anemia perniciosa y púrpura hiperglobulinémica de Waldenström; otros ejemplos son agranulocitosis, neutropenia autoinmunitaria, enfermedad de Franklin, enfermedad de Seligmann, enfermedad de la cadena pesada gamma, síndrome paraneoplásico secundario a timoma y linfomas y formación de inhibidores del factor VIII; endocrinopatías, tales como 55 poliendocrinopatía y la enfermedad de Addison; otros ejemplos son hipoglucemia autoinmunitaria, hipotiroidismo autoinmunitario, síndrome autoinmunitario de insulina, tiroiditis de Quervain y resistencia a la insulina mediada por anticuerpos del receptor de insulina; trastornos hepatogastrointestinales, tales como celiaquismo, enfermedad de Whipple, cirrosis biliar primaria, hepatitis activa crónica y colangeítis esclerosante primaria; un ejemplo adicional es la gastritis autoinmunitaria; nefropatías, tales como glomerulonefritis progresiva rápida, nefritis postestreptocócica, síndrome de Goodpasture, glomerulonefritis membranosa y nefritis crioglobulinémica; otro ejemplo es la enfermedad por cambios mínimos; trastornos neurológicos, tales como neuropatías autoinmunitarias, mononeuritis múltiple, síndrome miasténico de Lambert-Eaton, corea de Sydenham, neurosífilis tabética (*tabes dorsalis*) y síndrome de Guillain-Barré; otros ejemplos son mielopatía/paraparesia espástica tropical, miastenia grave, polineuropatía desmielinizante inflamatoria aguda y polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica; esclerosis múltiple; 65 trastornos cardíacos y pulmonares, tales como EPOC, alveolitis fibrosante, bronquiolitis obliterante, aspergilosis alérgica, fibrosis quística, síndrome de Löffler, miocarditis y pericarditis; otros ejemplos son neumonitis por

- hipersensibilidad y síndrome paraneoplásico secundario al cáncer de pulmón; trastornos alérgicos, tales como asma bronquial y síndrome de hiper-IgE; otro ejemplo es la amaurosis fugaz; trastornos oftalmológicos, tales como coriorretinitis idiopática; enfermedades infecciosas, tales como infección por parvovirus B (incluido el síndrome palmoplantar); trastornos ginecológicos y obstétricos, tales como aborto recurrente, pérdida fetal recurrente y retraso del crecimiento intrauterino; otro ejemplo es el síndrome paraneoplásico secundario a neoplasias ginecológicas; trastornos reproductivos masculinos, tales como el síndrome paraneoplásico secundario a neoplasias testiculares; y trastornos derivados de trasplante, tales como rechazo de aloinjerto y xenoinjerto y enfermedad de injerto contra huésped.
- 10 Los regímenes de dosificación en los métodos de tratamiento y usos anteriores, se ajustan para proporcionar la respuesta óptima deseada (por ejemplo, una respuesta terapéutica). Por ejemplo, puede administrarse una sola embolada, se pueden administrar varias dosis divididas a lo largo del tiempo, o la dosis se puede reducirse o aumentar proporcionalmente según lo indiquen las exigencias de la situación terapéutica.
- 15 Las dosis y los regímenes de dosificación eficaces para los anticuerpos anti-CD38, dependen de la enfermedad o de la afección que vaya a tratarse y los expertos en la materia pueden determinar dichas dosis y regímenes. Un intervalo ejemplar, no limitativo, de una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de la presente invención es de aproximadamente 0,005-100 mg/kg, tal como 0,05-100 mg/kg o 1-100 mg/kg, tal como aproximadamente 0,1-50 mg/kg, por ejemplo, aproximadamente 0,1-20 mg/kg, tal como aproximadamente 0,1-10 mg/kg, por ejemplo
- 20 aproximadamente 0,1, 0,3, aproximadamente 0,5, aproximadamente 1, 2, 3, 4, 8, 16 o 24 mg/kg.
- La administración puede ser, por ejemplo, intravenosa, intramuscular, intraperitoneal o subcutánea, y administrarse, por ejemplo, proximal al sitio de la diana. Si se desea, la dosis diaria eficaz de una composición farmacéutica puede administrarse como dos, tres, cuatro, cinco, seis o más subdosis administradas por separado a intervalos apropiados
- 25 a lo largo del día, opcionalmente, en formas de dosificación unitarias.
- En una realización, los anticuerpos anti-CD38 pueden administrarse por infusión en una dosis semanal de 10 a 500 mg/m², tal como de 200 a 400 mg/m². Dichas administración puede repetirse, por ejemplo, de 1 a 8 veces, tal como de 3 a 5 veces. La administración puede realizarse por infusión continua durante un periodo de 2 a 24 horas,
- 30 tal como de 2 a 12 horas.
- En una realización, los anticuerpos anti-CD38 pueden administrarse mediante infusión continua lenta durante un periodo prolongado, tal como más de 24 horas, para reducir los efectos secundarios tóxicos.
- 35 En una realización, los anticuerpos anti-CD38 pueden administrarse en 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 puede realizarse por infusión continua durante un periodo de 2 a 24 horas, tal como de 2 a 12 horas. Dicho régimen puede repetirse, por ejemplo, una o más veces según sea necesario, por ejemplo, después de 6 meses o 12 meses.
- 40 En una realización, los anticuerpos anti-CD38 pueden administrarse mediante terapia de mantenimiento, tal como, por ejemplo, una vez a la semana durante un periodo de 6 meses o más.
- En otra realización, los anticuerpos anti-CD38 pueden administrarse mediante un régimen que incluye una infusión de un anticuerpo anti-CD38 de la presente invención seguido de una infusión de un anticuerpo anti-CD38 de la presente invención conjugado con un radioisótopo. El régimen puede repetirse, por ejemplo, de 7 a 9 días después.
- 45 Como ejemplos no limitantes, los anticuerpos para su uso en el tratamiento según la presente invención, pueden proporcionarse como una dosificación diaria de un anticuerpo de la presente invención en una cantidad de aproximadamente 0,1-100 mg/kg, tal como 0,5, 0,9, 1,0, 1,1, 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90 o 100 mg/kg, al día, 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 como alternativa, al menos una de las semanas 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, usando dosis
- 50 únicas o divididas de cada 24, 12, 8, 6, 4 o 2 horas, o cualquier combinación de las mismas.
- Una "cantidad eficaz" para la terapia tumoral también puede medirse por su capacidad para estabilizar la progresión de la enfermedad. La capacidad de un compuesto para inhibir el cáncer puede evaluarse en un sistema modelo animal que predice la eficacia en tumores humanos. Como alternativa, esta propiedad de una composición puede evaluarse examinando la capacidad del compuesto para inhibir el crecimiento celular o para inducir la apoptosis mediante ensayos *in vitro* conocidos por el facultativo experto. Una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto terapéutico puede disminuir el tamaño del tumor, o de otro modo, mejorar los síntomas en un sujeto.
- 60 Una "cantidad terapéuticamente eficaz" para la artritis reumatoide puede dar como resultado una definición de mejoría preliminar en los pacientes de al menos ACR₂₀, tal como una definición de mejoría preliminar de al menos ACR₅₀, por ejemplo, una definición de mejoría preliminar de al menos ARC₇₀.
- 65

La definición de mejoría preliminar ACR₂₀ se define como:

- 5 mejoría $\geq 20\%$ en: Recuento de articulaciones sensibles (TJC, siglas del inglés *Tender Joint Count*) y recuento de articulaciones inflamadas (SJC, siglas del inglés *Swollen Joint Count*) y mejoría $\geq 20\%$ en 3 de las 5 evaluaciones siguientes: evaluación del dolor del paciente (EVA, Escala visual analógica), evaluación global del paciente (EVA), evaluación global médica (EVA), discapacidad de autoevaluación patente (CES, cuestionario de evaluación de la salud), Reactantes de la fase aguda (PCR (proteína C reactiva) o TSE (tasa de sedimentación eritrocítica). La ACR₅₀ y ACR₇₀ se definen de la misma manera con mejorías $\geq 50\%$ y $\geq 70\%$, respectivamente. Para más detalles véase Felson et al., en American College of Rheumatology Preliminary Definition of Improvement in Rheumatoid Arthritis; *Arthritis Rheumatism* 38, 727-735 (1995).

- 15 Como alternativa, una cantidad terapéuticamente eficaz para la artritis reumatoide se puede medir mediante PAE (puntuación de actividad de la enfermedad), incluyendo PAE₂₈ y/o PAE₅₆, según lo definido por la EULAR (*European League against Rheumatism*).

- 20 Un anticuerpo anti-CD38 también puede administrarse profilácticamente para reducir el riesgo de desarrollar cáncer, retrasar la aparición de que se produzca un evento en la progresión del cáncer y/o reducir el riesgo de recidiva cuando un cáncer está en remisión. Esto puede ser especialmente útil en pacientes en los que es difícil localizar un tumor que se sabe que está presente debido a otros factores biológicos.

Terapia de combinación

- 25 Los anticuerpos anti-CD38 de la presente invención también pueden administrarse en terapia de combinación, es decir, combinados con otros agentes terapéuticos relevantes para la enfermedad o afección que se vaya a tratar. Dicha administración puede ser simultánea, individual o secuencial. Para la administración simultánea, los agentes pueden administrarse como una composición o como composiciones individuales, según sea adecuado.

- 30 Por consiguiente, la presente invención proporciona un anticuerpo anti-CD38 de la presente invención para su uso en métodos para el tratamiento de un trastorno que implica células que expresan CD38 como se describe anteriormente, cuyos métodos comprenden la administración de un anticuerpo anti-CD38 de la presente invención combinado con uno o más agentes terapéuticos adicionales como se describe a más adelante.

- 35 En una realización de la invención, los anticuerpos de la presente invención se administran como una combinación con otros anticuerpos anti-CD38. Dichos anticuerpos se describen en la presente invención y en la técnica anterior. Específicamente, los anticuerpos se describen en el documento WO2006099875. De manera más específica, una combinación de los presentes anticuerpos anti-CD38 con anticuerpos anti-CD38 que bloquean de manera no cruzada, tal como el anticuerpo 003 descrito en el documento WO2006099875, son realizaciones de la presente invención.

- 45 En una realización, la terapia de combinación puede incluir la administración de una composición de la presente invención junto con al menos un agente citotóxico, al menos un agente quimioterapéutico, al menos un agente antiangiogénico, al menos un agente antiinflamatorio y/o al menos un agente inmunosupresor y/o inmunomodulador.

- 50 En una realización, la presente invención proporciona un anticuerpo anti-CD38 de la presente invención para su uso en un método para el tratamiento de un trastorno que implica células que expresan CD38, tal como cáncer, en un sujeto, cuyo método comprende la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo anti-CD38 de la presente invención y de al menos un agente quimioterapéutico a un sujeto que lo necesite

- 55 En una realización, la presente invención proporciona un anticuerpo anti-CD38 de la presente invención para su uso en un método para el tratamiento del mieloma múltiple, cuyo método comprende la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo anti-CD38 de la presente invención y de al menos un agente quimioterapéutico a un sujeto que lo necesite.

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

- 60 En una realización, dicho agente quimioterapéutico puede seleccionarse de un agente alquilante, tal como mecloretamina, tioepa, clorambucilo, melfalán, carmustina (BSNU), lomustina (CCNU), ciclofosfamida, busulfán, dibromomanitol, estreptozotocina, dacarbacina (DTIC), procarbacina, mitomicina C, cisplatino y otros derivados de platino, tales como carboplatino y agentes similares.

- 65 En una realización, dicho agente quimioterapéutico puede seleccionarse de un antibiótico, tal como dactinomicina (anteriormente actinomicina), bleomicina, daunorrubicina (anteriormente daunomicina), doxorubicina, idarrubicina,

mitramicina, mitomicina, mitoxantrona, plicamicina, antramicina (AMC) y agentes similares.

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

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

En una realización, dicho agente quimioterapéutico puede seleccionarse de un inhibidor del factor de crecimiento, tal como un inhibidor de ErbB1 (EGFR) (tal como gefitinib (Iressa®), cetuximab (Erbix®), erlotinib (Tarceva®), HuMax-EGFR (zalutumumab, 2F8 desvelado en el documento WO 2002/100348) y agentes similares), un inhibidor de ErbB2 (Her2 / neu) (tal como trastuzumab (Herceptin®) y agentes similares) y agentes similares. En una realización, dicho inhibidor del factor de crecimiento puede ser un inhibidor de farnesil transferasa, tal como SCH-66336 y R115777.

En una realización, dicho inhibidor del factor de crecimiento puede ser un inhibidor del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), tal como bevacizumab (Avastin®).

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

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

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

En una realización, la presente invención proporciona un anticuerpo anti-CD38 de la presente invención para su uso en un método para el tratamiento de un trastorno que implica células que expresan CD38 en un sujeto, cuyo método comprende la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo anti-CD38 de la presente invención y de al menos un inhibidor de angiogénesis, neovascularización y/u otra vascularización, a un sujeto que lo necesite

En una realización, la presente invención proporciona un anticuerpo anti-CD38 de la presente invención para su uso en un método para el tratamiento del mieloma múltiple, cuyo método comprende la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo anti-CD38 de la presente invención y de al menos un inhibidor de angiogénesis, neovascularización y/u otra vascularización, a un sujeto que lo necesite.

Son ejemplos de dichos inhibidores de angiogénesis los inhibidores de urocinasa, inhibidores de metaloproteasas de la matriz (tales como marimastat, neovastat, BAY 12-9566, AG 3340, BMS-275291 y agentes similares), inhibidores de la migración y proliferación de células endoteliales (tales como TNP-470, escualamina, 2-metoxiestradiol, combretastatina, endostatina, angiostatina, penicilamina, SCH66336 (Schering-Plough Corp, Madison, NJ), R115777 (Janssen Pharmaceutica, Inc, Titusville, NJ) y agentes similares), antagonistas de factores de crecimiento angiogénico (tales como ZD6474, SU6668, anticuerpos contra agentes angiogénicos y/o sus receptores (tales como VEGF, bFGF y angiopoyetina-1), talidomida (Thalomid®), análogos de talidomida (tales como CC-5013 (lenalidomida, Revlimid™) y CC4047 (Actimid™), Sugem 5416, SU5402, ribozima antiangiogénica (tal como angiozima), interferón α (tal como interferón α 2a), suramina y agentes similares), inhibidores de cinasa VEGF-R y otros inhibidores de tirosina cinasa antiangiogénicos (tales como SU011248), inhibidores de la señalización de supervivencia/integrina específica del endotelio (tales como vitaxina y agentes similares), antagonistas/quelantes de cobre (tales como tetratiomolibdato, captopril y agentes similares), carboxiamido triazol (CAI), ABT-627, CM101, interleucina-12 (IL-12), IM862, PNU145156E así como moléculas de nucleótidos que inhiben la angiogénesis (tales como ADNc antisentido de VEGF, ADNc codificante de angiostatina, ADNc codificante de p53 y ADNc codificante del receptor 2 deficiente del VEGF) y agentes similares.

Otros ejemplos de dichos inhibidores de angiogénesis, neovascularización y/u otra vascularización, son derivados antiangiogénicos de heparina y moléculas relacionadas (por ejemplo, heparinasa III), temozolomida, NK4, factor inhibidor de la migración de macrófagos (FIM), inhibidores de ciclooxigenasa-2, inhibidores del factor 1 inducible por hipoxia, isoflavonas antiangiogénicas de soja, oltipraz, fumagilina y sus análogos, análogos de somatostatina, polisulfato de pentosán, tecogalan de sodio, dalteparina, tumstatina, trombospodina, NM-3, combrestatina, canstatina, avastatina, anticuerpos contra otras dianas relevantes (tales como anticuerpos monoclonales anti- α -v/beta-3 y anti-quinostatina) y agentes similares.

En una realización, la presente invención proporciona el uso de un anticuerpo anti-CD38 de la presente invención para la preparación de una composición farmacéutica para administrar con talidomida (Thalomid®), análogos de talidomida (tales como CC-5013 (lenalidomida, Revlimid™) y/o CC4047 (Actimid™)). En una realización adicional, la presente invención proporciona el uso de un anticuerpo anti-CD38 de la presente invención para la preparación de una composición farmacéutica para administrar con talidomida.

En una realización, la presente invención proporciona el uso de un anticuerpo anti-CD38 de la presente invención para la preparación de una composición farmacéutica para administrar con un anticuerpo anti-CD20, tal como rituximab (Rituxan®, Mabthera®), un anticuerpo monoclonal humano anti-CD20 como se desvela en el documento WO 2004/035607, tal como 11B8, 2F2 (ofatumumab, Arzerra®) o 7D8.

En una realización, un agente terapéutico para su uso en combinación con el anticuerpo anti-CD38 de la presente invención para el tratamiento de los trastornos descritos anteriormente, puede ser un inhibidor del proteasoma, tal como bortezomib (Velcade®).

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

En una realización, el anticuerpo anti-CD38 de la presente invención se usa en combinación con lenalidomida y dexametasona para el tratamiento de los trastornos descritos anteriormente, tal como mieloma múltiple, por ejemplo, mieloma múltiple recidivante.

En una realización, el anticuerpo anti-CD38 de la presente invención se usa en combinación con bortezomib y dexametasona para el tratamiento de los trastornos descritos anteriormente, tal como mieloma múltiple, por ejemplo, mieloma múltiple recidivante.

En una realización, el anticuerpo anti-CD38 de la presente invención se usa en combinación con bortezomib y prednisolona para el tratamiento de los trastornos descritos anteriormente, tal como mieloma múltiple, por ejemplo, mieloma múltiple recidivante.

En una realización, un agente terapéutico para su uso en combinación con el anticuerpo anti-CD38 de la presente invención para el tratamiento de los trastornos descritos anteriormente, puede ser un inmunógeno antineoplásico, tal como un antígeno canceroso/antígeno asociado a tumor (por ejemplo, molécula de adhesión de células epiteliales (EpCAM/TACSTD1), mucina 1 (MUC1), antígeno carcinoembrionario (ACE), glucoproteína 72 asociada a tumor (TAG-72), gp100, Melan-A, MART-1, KDR, RCAS1, MDA7, vacunas víricas asociadas a cáncer (por ejemplo, vacunas contra el virus del papiloma humano), proteínas de choque térmico derivadas de tumores y agentes similares. En dicha realización también pueden usarse, como alternativa, diversos otros antígenos cancerosos/antígenos asociados a tumores adecuados descritos en cualquier otra parte del presente documento y moléculas similares conocidas en la técnica. Los péptidos inmunogénicos antineoplásicos también incluyen "vacunas" antiidiotípicas, tales como anticuerpos antiidiotípicos BEC2, Mitumomab, CeaVac y anticuerpos antiidiotípicos relacionados, anticuerpo antiidiotípico contra el anticuerpo MG7 y otros anticuerpos antiidiotípicos antineoplásicos (véase, por ejemplo, Birebent et al., Vaccine. 21(15), 1601-12 (2003), Li et al., Chin Med J (Engl). 114(9), 962-6 (2001), Schmitt et al., Hybridoma. 13(5), 389-96 (1994), Maloney et al., Hybridoma. 4(3), 191-209 (1985), Raychardhuri et al., J Immunol. 137(5), 1743-9 (1986), Pohl et al., Int J Cancer. 50(6), 958-67 (1992), Bohlen et al., Cytokines Mol Ther. 2(4), 231-8 (1996) y Maruyama, J Immunol Methods. 264(1-2), 121-33 (2002)). Dichos anticuerpos antiidiotípicos pueden conjugarse opcionalmente con un vehículo, que puede ser un vehículo de molécula sintética (normalmente inerte), una proteína (por ejemplo, hemocianina de lapa californiana (KLH, *keyhole limpet hemocyanin*) (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, un agente terapéutico para su uso en combinación con el anticuerpo anti-CD38 de la presente invención para el tratamiento de los trastornos descritos anteriormente, puede ser un bisfosfonato. Son ejemplos de bifosfonatos posiblemente adecuados, pamidronato (Aredia®), ácido zoledrónico (Zometa®), clodronato (Bonefos®), risedronato (Actonel®), ibandronato (Boniva®), etidronato (Didronel®), alendronato (Fosamax®), tiludronato (Skelid®), incadronato (Yamanouchi Pharmaceutical) y minodronato (YM529, Yamanouchi).

En una realización, un agente terapéutico para su uso en combinación con el anticuerpo anti-CD38 de la presente invención para el tratamiento de los trastornos descritos anteriormente puede ser un factor estimulante de colonias. Son ejemplos de factores estimulantes de colonias adecuados, los factores estimulantes de colonias de granulocitos (G-CSF, siglas del inglés *granulocyte-colony stimulating factors*), tales como filgrastim (Neupogen®) y pegfilgrastim (Neulasta®), y factores estimulantes de colonias de macrófagos y granulocitos (GM-CSF, siglas del inglés *granulocyte macrophage-colony stimulating factors*) tal como sargramostim (Leukine®).

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

En una realización, un agente terapéutico para su uso en combinación con el anticuerpo anti-CD38 de la presente

invención para el tratamiento de los trastornos descritos anteriormente, puede ser una citocina, quimiocina, o combinaciones de las mismas, antineoplásica. Como ejemplos de citocinas y factores de crecimiento adecuados se 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 (por ejemplo, IFN α 2b), IFN β , GM-CSF, CD40L, ligando Flt3, factor de células madre, ancestim y TNF α . Las quimiocinas adecuadas pueden incluir quimiocinas Glu-Leu-Arg (ELR) negativas, tales como IP-10, MCP-3, MIG y SDF-1 α de las familias de quimiocinas CXC y C-C humanas. Las citocinas adecuadas incluyen derivados de citocinas, variantes de citocinas, fragmentos de citocinas y proteínas de fusión de citocinas. En el presente documento, estos y otros métodos o usos que implican ácidos nucleicos que codifican péptidos de origen natural, pueden realizarse de manera alternativa o adicional mediante "activación génica" y técnicas de regulación positiva de genes recombinantes homólogos, tal como se describe en los documentos US 5 968 502, US 6 063 630 y US 6 187 305 y EP 0505500.

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

En una realización, un agente terapéutico para su uso en combinación con el anticuerpo anti-CD38 de la presente invención para el tratamiento de los trastornos descritos anteriormente, puede ser un regulador (o "agente regulador") del control del ciclo celular/apoptosis. Un regulador del control del ciclo celular/apoptosis puede incluir moléculas (i) que se dirigen a, y modulan, reguladores del control del ciclo celular/apoptosis tales como cdc-25 (tales como NSC 663284), (ii) cinasas dependientes de ciclina que sobreestiman el ciclo celular (tal como flavopiridol (L868275, HMR1275), 7-hidroxi-estaurosporina (UCN-01, KW-2401) y roscovitina (R-roscovitina, CYC202)) y (iii) moduladores de telomerasa (tales como BIBR1532, SOT-095, GRN163 y composiciones descritas, por ejemplo, en los documentos US 6 440 735 y US 6 713 055). Ejemplos no limitantes de moléculas que interfieren con las rutas apoptóticas, incluyen ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF (TRAIL)/ligando 2 de apoptosis (Apo-2L), agentes inductores de bloqueo de NF- κ B que conducen a la inhibición de la producción de IL-6, anticuerpos que activan a receptores de TRAIL, los IFN, Bcl-2 antisentido y As₂O₃ (tríóxido de arsénico, Trisenox®).

En una realización, un agente terapéutico para su uso en combinación con el anticuerpo anti-CD38 de la presente invención para el tratamiento de los trastornos descritos anteriormente, puede ser un agente regulador hormonal, tal como agentes útiles para terapia antiandrogénica y antiestrogénica. Son ejemplos de dichos agentes reguladores hormonales tamoxifeno, idoxifeno, fulvestrant, droloxifeno, toremifeno, raloxifeno, dietilestilbestrol, etinil estradiol/etinilo, un antiandrógeno (tal como flutamida/eulexin), una progestina (tal como caproato de hidroxiprogesterona, medroxiprogesterona/provera, acetato de megestrol/megace), un adrenocorticoesteroide (tal como hidrocortisona, prednisona), hormona liberadora de hormona luteinizante (LHRH) (y sus análogos y otros agonistas de la LHRH, tales como buserelina y goserelina), un inhibidor de aromatasas (tal como anastrozol/arimidex, aminoglutetimida/citraden, exemestano), un inhibidor hormonal (tal como octreótido/sandostatina) y agentes similares.

En una realización, un agente terapéutico para su uso en combinación con el anticuerpo anti-CD38 de la presente invención para el tratamiento de los trastornos descritos anteriormente, puede ser un agente antianérgico (por ejemplo, compuestos de molécula pequeña, proteínas, glicoproteínas o anticuerpos que frenan la tolerancia contra antígenos tumorales y cancerosos). Son ejemplos de dichos compuestos, moléculas que bloquean la actividad de CTLA-4, tales como MDX-010 (Phan et al., PNAS USA 100, 8372 (2003)).

En una realización, un agente terapéutico para su uso en combinación con el anticuerpo anti-CD38 de la presente invención para el tratamiento de los trastornos descritos anteriormente, puede ser un ácido nucleico o un vector que contenga un gen supresor tumoral, tal como un adenovirus deficiente en replicación que codifique p53/SCH58500 de tipo silvestre 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 tumorales incluyen, por ejemplo, BRCA1, RB1, BRCA2, DPC4 (Smad4), MSH2, MLH1 y DCC.

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

En una realización, un agente terapéutico para su uso en combinación con el anticuerpo anti-CD38 de la presente invención para el tratamiento de los trastornos descritos anteriormente, puede ser una molécula de ARN inhibidora antineoplásica (véase, por ejemplo, Lin et al., Curr Cancer Drug Targets. 1(3), 241-7 (2001), Erratum in: 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 Suppl), S144 (2003), Yang et al., Oncogene. 22(36), 5694-701 (2003) y Zhang et al., Biochem Biophys Res Commun. 303(4), 1169-78 (2003)).

Las composiciones y combinaciones para su uso en los métodos de administración según la presente invención, también incluyen la administración de vacunas de ácido nucleico, tales como vacunas de ADN desnudo que codifican dichos antígenos cancerosos/antígenos asociados a tumor (véanse, por ejemplo, los documentos US 5 589 466, US 5 593 972, US 5 703 057, US 5 879 687, US 6 235 523 y US 6 387 888). En una realización, el método de administración de combinación y/o la composición de combinación comprende una composición de vacuna autóloga. En una realización, la composición de combinación y/o el método de administración de combinación comprende una vacuna de célula completa o célula que expresa citocinas (por ejemplo, un fibroblasto que expresa IL-2 recombinante, células dendríticas que expresan citocinas recombinantes y similares) (véase, por ejemplo, Kowalczyk et al., Acta Biochim Pol. 50(3), 613-24 (2003), Reilly et al., Methods Mol Med. 69, 233-57 (2002) y Tirapu et al., Curr Gene Ther. 2(1), 79-89 (2002). Otro ejemplo de dicha estrategia de células autólogas que puede ser útil en los métodos de combinación de la presente invención, es el método de inmunoterapia personalizada MyVax® (anteriormente denominado GTO-99) (Genitope Corporation - Redwood City, CA, EE.UU.).

En una realización, la presente invención proporciona composiciones de combinación y su uso en métodos de administración de combinación en los que un anticuerpo anti-CD38 se combina o se administra conjuntamente con un virus oncolítico.

Las composiciones de combinación y las combinaciones para su uso en métodos de administración de combinación según la presente invención, también pueden implicar métodos de inmunoterapia de "célula entera y" adoptiva". Por ejemplo, dichos métodos pueden comprender la infusión o reinfusión de células del sistema inmunitario (por ejemplo, linfocitos infiltrantes de tumor (TIL, *tumor-infiltrating lymphocytes*), tales como células T CD4+ y/o CD8+ (por ejemplo, células T expandidas con antígenos específicos de tumor y/o mejoras genéticas), células B que expresan anticuerpos u otras células productoras/presentadoras de anticuerpos, células dendríticas (por ejemplo, células dendríticas recombinantes que expresan anti-citocinas, células dendríticas cultivadas con un agente de expansión de CD tal como GM-CSF y/o Flt3-L, y/o células dendríticas cargadas de antígeno asociado a tumor), células NK antitumorales, denominadas células híbridas, o sus combinaciones. Los lisados celulares también pueden ser útiles en dichos métodos y composiciones. Las "vacunas" celulares en ensayos clínicos que pueden ser útiles en dichos aspectos incluyen Canvaxin™, APC-8015 (Dendreon), HSPPC-96 (Antigenics), y lisados de células Melacine®. Los antígenos que se desprenden de las células cancerosas, y de sus mezclas (véase, por ejemplo, Bystryk et al., Clinical Cancer Research vol. 7, 1882-1887, Julio de 2001), opcionalmente mezclados con adyuvantes tales como alumbre, también pueden ser componentes en dichos métodos y composiciones de combinación.

En una realización, un anticuerpo anti-CD38 de la presente invención puede suministrarse a un paciente en combinación con la aplicación de un método de vacunación interna. La vacunación interna se refiere a tumor inducido o a muerte de células cancerosas, tal como muerte celular de células tumorales inducida por fármacos o por radiación, en un paciente, que normalmente conduce a suscitar una respuesta inmunitaria dirigida hacia (i) las células tumorales en su conjunto o (ii) partes de las células tumorales que incluyen (a) proteínas secretadas, glucoproteínas u otros productos, (b) proteínas o glucoproteínas asociadas a la membrana u otros componentes asociados con, o insertados en, membranas, y/o (c) proteínas intracelulares u otros componentes intracelulares. Una respuesta inmunitaria inducida por vacunación interna puede ser humoral (es decir, mediada por complementos-anticuerpos) o mediada por células (por ejemplo, el desarrollo y/o aumento de linfocitos T citotóxicos endógenos que reconocen las células tumorales destruidas internamente o partes de ellas). Además de la radioterapia, son ejemplos no limitantes de fármacos y agentes que pueden usarse para inducir dicha muerte celular tumoral y vacunación interna, agentes quimioterapéuticos convencionales, inhibidores del ciclo celular, fármacos antiangiogénicos, anticuerpos monoclonales, agentes inductores de apoptosis e inhibidores de la transducción de señales.

Ejemplos de otros agentes antineoplásicos, que pueden ser relevantes como agentes terapéuticos para su uso en combinación con el anticuerpo anti-CD38 de la presente invención para el tratamiento de los trastornos descritos anteriormente son agentes inductores de diferenciación, ácido retinoico y análogos del ácido retinoico (tales como ácido retinoico todo trans, 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, PDGFR α , PDGFR β , Flk2, Flt4, FGFR1, FGFR2, FGFR3, FGFR4, TrkA, TRKC, c-met, Ron, Sea, Tie, Tie2, Eph, Ret, Ros, Alk, LTK, PTK7 y agentes similares.

Ejemplos de otros agentes antineoplásicos, que pueden ser relevantes como agentes terapéuticos para su uso en combinación con el anticuerpo anti-CD38 de la presente invención para el tratamiento de los trastornos descritos anteriormente son catepsina B, moduladores de la actividad deshidrogenasa de la catepsina D, glutatión-S-transferasa (tal como glutatión-S-transferasa sintética y lactato deshidrogenasa), estramustina, epirrubicina, inhibidor de HSP90 como 17-alil amino geldanamycin, anticuerpos dirigidos contra un antígeno tumoral como APE, CA125, KSA, etc., integrinas como integrina β 1, inhibidores de VCAM y agentes similares.

Ejemplos de otros agentes antineoplásicos, que pueden ser relevantes como agentes terapéuticos para su uso en combinación con los anticuerpos anti-CD38 de la presente invención para el tratamiento de los trastornos descritos

anteriormente, son inhibidores de calcineurina (tales como valspodar, PSC 833 y otros inhibidores de MDR-1 o de glucoproteína p), inhibidores de TOR (tales como sirolimus, everolimus y rapamicina) e inhibidores de mecanismos de "migración dirigida de linfocitos" (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, la presente invención proporciona el anticuerpo anti-CD38 de la presente invención para su uso en un método para tratar un trastorno que implica células que expresan CD38, tal como cáncer, en un sujeto, cuyo método comprende la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo anti-CD38 de la presente invención y radioterapia a un sujeto que lo necesite.

En una realización, la presente invención proporciona un anticuerpo anti-CD38 de la presente invención para su uso en un método para el tratamiento del mieloma múltiple, cuyo método comprende la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo anti-CD38 de la presente invención y radioterapia a un sujeto que lo necesite.

La radioterapia puede comprender radiación o administración asociada de radiofármacos a un paciente. La fuente de radiación puede ser externa o interna al paciente que se está tratando (el tratamiento con radiación puede ser, por ejemplo, en forma de radioterapia de haz externo (EBRT, por las siglas en inglés *external beam radiation therapy*), braquiterapia (BT) o radioterapia dirigida al esqueleto). Los elementos radiactivos que pueden usarse para llevar a la práctica dichos métodos incluyen, por ejemplo, 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, la presente invención proporciona un anticuerpo anti-CD38 de la presente invención para su uso en un método para el tratamiento de un trastorno que implica células que expresan CD38 en un sujeto, cuyo método comprende la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo anti-CD38 de la presente invención a un sujeto que lo necesite combinado con un trasplante autólogo de células madre periféricas o de médula ósea.

En una realización, la presente invención proporciona un anticuerpo anti-CD38 de la presente invención para su uso en un método para el tratamiento del mieloma múltiple, cuyo método comprende la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo anti-CD38 de la presente invención a un sujeto que lo necesite combinado con un trasplante autólogo de células madre periféricas o de médula ósea.

En una realización, la presente invención proporciona un anticuerpo anti-CD38 de la presente invención para su uso en un método para el tratamiento de un trastorno que implica células que expresan CD38 en un sujeto, cuyo método comprende la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo anti-CD38 de la presente invención a un sujeto que lo necesite combinado con intervención ortopédica.

En una realización, la presente invención proporciona un anticuerpo anti-CD38 de la presente invención para su uso en un método para el tratamiento de un trastorno que implica células que expresan CD38 en un sujeto, cuyo método comprende la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo anti-CD38 de la presente invención y al menos un agente antiinflamatorio a un sujeto que lo necesite.

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

En una realización, dicho agente antiinflamatorio puede seleccionarse de aspirina y otros salicilatos, inhibidores de Cox-2 (tales como rofecoxib y celecoxib), fármacos AINE (tales como ibuprofeno, fenoprofeno, naproxeno, sulindaco, diclofenaco, piroxicam, ketoprofeno, diflunisal, nabumetona, etodolaco, oxaprozina e indometacina), anticuerpos anti-IL6R, anticuerpos anti-IL8 (por ejemplo, anticuerpos descritos en el documento WO2004058797, por ejemplo, 10F8), anticuerpos anti-IL15 (por ejemplo, anticuerpos descritos en los documentos WO03017935 y WO2004076620), anticuerpos anti-IL15R, anticuerpos anti-CD4 (por ejemplo, zanolimumab), anticuerpos anti-CD11a (por ejemplo, efalizumab), anticuerpos anti-alfa-4/beta-1 integrina (VLA4) (por ejemplo, natalizumab), CTLA4-Ig para el tratamiento de enfermedades inflamatorias, prednisolona, prednisona, fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad (FARME) tales como metotrexato, hidroxicloroquina, sulfasalazina, inhibidores de la síntesis de pirimidina (tales como leflunomida), agentes bloqueadores de receptores de IL-1 (tal como anakinra), agentes bloqueadores de TNF- α (tales como etanercept, infliximab y adalimumab) y agentes similares.

En una realización, la presente invención proporciona un anticuerpo anti-CD38 de la presente invención para su uso en un método para el tratamiento de un trastorno que implica células que expresan CD38 en un sujeto, cuyo método comprende la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo anti-CD38 de la presente invención y al menos un agente inmunosupresor y/o inmunomodulador a un sujeto que lo necesite.

En una realización, dicho agente inmunosupresor y/o inmunomodulador puede seleccionarse de ciclosporina, azatioprina, ácido micofenólico, micofenolato de mofetilo, corticosteroides, tales como prednisona, metotrexato, sales de oro, sulfasalazina, antipalúdicos, brequinar, leflunomida, mizoribina, 15-desoxiespergualina, 6-mercaptopurina,

ciclofosfamida, rapamicina, tacrolimus (FK-506), OKT3, globulina antitumócica, timopentina, timosina-o y agentes similares.

En una realización, dicho agente inmunosupresor y/o inmunomodulador puede seleccionarse de 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.

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

En una realización, el anticuerpo anti-CD38 de la presente invención puede administrarse en combinación con dos o más agentes inmunosupresores y/o inmunomoduladores, tal como en combinación con prednisona y ciclosporina; prednisona, ciclosporina y azatioprina; o prednisona, ciclosporina y micofenolato de mofetilo.

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

En una realización, la presente invención proporciona un método para el tratamiento de un trastorno que implica células que expresan CD38 en un sujeto, cuyo método comprende la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo anti-CD38 de la presente invención y un anticuerpo anti-CD32b a un sujeto que lo necesite. En una realización de la presente invención, el anticuerpo anti-CD32b se selecciona de HuMab-016, -020, -022, -024, 026, 028, -034, -038 o -053, todos ellos desvelados en el documento WO2009/083009.

En una realización, un agente terapéutico para su uso en combinación con el anticuerpo anti-CD38 de la presente invención para el tratamiento de los trastornos descritos anteriormente, puede seleccionarse de inhibidores de histona desacetilasa (por ejemplo fenilbutirato) y/o de agentes reparadores de ADN (por ejemplo enzimas reparadoras de ADN y composiciones relacionadas tales como dimericina).

un anticuerpo anti-CD38 de la presente invención para su uso en la presente invención para el tratamiento de un trastorno descrito anteriormente, que comprende la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo anti-CD38 de la presente invención, también puede comprender terapia antineoplásica fotodinámica dirigida (por ejemplo, terapia antineoplásica con láser, que opcionalmente se puede practicar con el uso de un agente fotosensibilizante, véase, por ejemplo, Zhang et al., J Control Release. 93(2), 141-50 (2003)), anti-cancer sound-wave and shock-wave therapies (véase, por ejemplo, Kambe et al., Hum Cell. 10(1), 87-94 (1997)), y/o terapia nutracéutica antineoplásica (véase, por ejemplo, Roudebush et al., Vet Clin North Am Small Anim Pract. 34(1), 249-69, viii (2004) y Rafi, Nutrition. 20(1), 78-82 (2004). Del mismo modo, para la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento de un trastorno como se ha descrito anteriormente para administrar con terapia antineoplásica fotodinámica dirigida (por ejemplo, terapia antineoplásica con láser, que opcionalmente se puede practicar con el uso de un agente fotosensibilizante, terapias antineoplásicas con ondas sonoras y ondas de choque y/o terapia nutracéutica antineoplásica), se puede usar un anticuerpo anti-CD38 de la presente invención.

En una realización adicional, el anticuerpo anti-CD38 de la presente invención se administra junto con complemento.

Como se ha descrito anteriormente, una composición farmacéutica de la presente invención puede administrarse en terapia de combinación, es decir, combinada con uno o más agentes relevantes para la enfermedad o afección a tratar bien como composiciones farmacéuticas individuales o con un compuesto de la presente invención formulado conjuntamente con uno o más agentes terapéuticos adicionales como los descritos anteriormente. Dichas terapias de combinación pueden requerir dosis más bajas del compuesto de la presente invención y/o los agentes administrados conjuntamente, evitando así posibles toxicidades o complicaciones asociadas a las diversas monoterapias.

En una realización, la presente invención proporciona un anticuerpo anti-CD38 de la presente invención para su uso en un método para el tratamiento de un trastorno que implica células que expresan CD38 en un sujeto, cuyo método comprende la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo anti-CD38 de la presente invención y al menos un agente inmunosupresor y/o inmunomodulador a un sujeto que lo necesite

Usos diagnósticos

Los anticuerpos anti-CD38 de la invención también pueden usarse con fines diagnósticos. Por tanto, en un aspecto adicional, la invención proporciona una composición de diagnóstico que comprende un anticuerpo anti-CD38 como se define en el presente documento.

En una realización, los anticuerpos anti-CD38 de la presente invención pueden usarse *in vivo* o *in vitro* para diagnosticar enfermedades en las que las células activadas que expresan CD38 desempeñan un papel activo en la patogenia, detectando niveles de CD38, o niveles de células que contienen CD38, en la superficie de su membrana. Esto puede realizarse, por ejemplo, poniendo en contacto una muestra que se va a someter a ensayo, opcionalmente junto con una muestra de control, con el anticuerpo anti-CD38, en condiciones que permitan la formación de un complejo entre el anticuerpo y CD38. Después, se detecta la formación del complejo (por ejemplo, usando un ELISA). Cuando se usa una muestra de control junto con la muestra de ensayo, el complejo se detecta en ambas muestras y cualquier diferencia estadísticamente significativa en la formación de complejos entre las muestras es indicativa de la presencia de CD38 en la muestra de ensayo.

Por tanto, en un aspecto adicional, la invención se refiere a un método para detectar la presencia de antígeno CD38 o una célula que expresa CD38, en una muestra que comprende:

- poner en contacto la muestra con un anticuerpo anti-CD38 de la invención o una molécula biespecífica de la invención, en condiciones que permitan la formación de un complejo entre el anticuerpo y CD38; y
- analizar si se ha formado un complejo.

En una realización, el método se realiza *in vitro*.

De manera más específica, la presente invención proporciona métodos para la identificación y el diagnóstico de células invasivas y tejidos invasivos, y otras células a las que se dirigen los anticuerpos anti-CD38 de la presente invención, y para el control del progreso de los tratamientos terapéuticos, estado después del tratamiento, riesgo de desarrollar cáncer, progresión del cáncer y similares.

En un ejemplo de dicho ensayo de diagnóstico, la presente invención proporciona un método para diagnosticar el nivel de células invasivas en un tejido que comprende formar un inmunocomplejo entre un anticuerpo anti-CD38 y posibles tejidos que contengan CD38, y detectar la formación del inmunocomplejo, en donde la formación del inmunocomplejo se correlaciona con la presencia de células invasivas en el tejido. El contacto puede realizarse *in vivo*, utilizando anticuerpos aislados marcados y técnicas de obtención de imágenes estándar, o puede realizarse *in vitro* en muestras tisulares.

Como ejemplos de inmunoensayos convencionales permitidos por la presente invención, se incluyen, sin limitación, ensayos ELISA, RIA, FACS, ensayos de resonancia de plasmón, ensayos cromatográficos, inmunohistoquímica tisular, transferencia Western y/o inmunoprecipitación usando un anticuerpo anti-CD38. Como marcadores adecuados para el anticuerpo anti-CD38 y/o anticuerpos secundarios usados en dichas técnicas se incluyen, sin limitación, varias enzimas, grupos protésicos, materiales fluorescentes, materiales luminiscentes y materiales radiactivos.

Los anticuerpos anti-CD38 son particularmente útiles en la obtención de imágenes *in vivo* de tumores. La obtención de imágenes *in vivo* de tumores asociados a CD38, puede realizarse mediante cualquier técnica adecuada. Por ejemplo, puede usarse marcaje con ⁹⁹Tc o con otro isótopo emisor de rayos gamma para marcar anticuerpos anti-CD38 en tumores o complejos entre anticuerpos secundarios anti-CD38 marcados (por ejemplo, marcados con FITC) y CD38 de tumores y obtener imágenes con una cámara de centelleo gamma (por ejemplo, un dispositivo Elscint Apex 409ECT), normalmente usando un colimador de baja energía y alta resolución o un colimador universal de baja energía. Después, los tejidos teñidos pueden evaluarse con respecto al recuento de la radiactividad como un indicador de la cantidad de péptidos asociados a CD38 en el tumor. Las imágenes obtenidas usando dichas técnicas pueden usarse para evaluar la biodistribución de CD38 en un paciente, mamífero o tejido, por ejemplo, en el contexto del uso de CD38 o fragmentos CD38, como un biomarcador para detectar la presencia de células cancerosas invasivas. Las variaciones en esta técnica pueden incluir el uso de obtención de imágenes con resonancia magnética (RM) para mejorar la obtención de imágenes sobre las técnicas con cámara gamma. Se describen métodos y principios de inmunoescintografía similares, por ejemplo, en Srivastava (ed.), Radiolabeled Monoclonal Antibodies For Imaging And Therapy (Plenum Press 1988), Chase, "Medical Applications of Radioisotopes", en Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª edición, Gennaro et al., (eds.), págs. 624-652 (Mack Publishing Co., 1990) y Brown, "Clinical Use of Monoclonal Antibodies", en Biotechnology And Pharmacy 227-49, Pezzuto et al., (eds.) (Chapman y Hall 1993).

En un aspecto adicional, la invención se refiere a un kit para detectar, en una muestra, la presencia de antígeno CD38, o de una célula que exprese CD38, comprendiendo el kit

- un anticuerpo anti-CD38 de la invención o una molécula biespecífica de la invención; e
- instrucciones para el uso del kit.

En una realización, la presente invención proporciona un kit para el diagnóstico de cáncer que comprende un recipiente que comprende un anticuerpo anti-CD38 y uno o más reactivos para detectar la unión del anticuerpo anti-CD38 con un péptido CD38. Los reactivos pueden incluir, por ejemplo, etiquetas fluorescentes, etiquetas enzimáticas u otras etiquetas detectables. Los reactivos también pueden incluir anticuerpos secundarios o terciarios o reactivos

para reacciones enzimáticas, en donde las reacciones enzimáticas producen un producto que puede visualizarse. En una realización, la presente invención proporciona un kit de diagnóstico que comprende uno o más anticuerpos anti-CD38 de la presente invención, marcados o no, en uno o más recipientes adecuados, reactivos para las incubaciones para un ensayo indirecto, y sustratos o agentes derivatizantes para la detección en dicho ensayo, dependiendo de la naturaleza del marcador. También pueden incluirse uno o más reactivos de control.

En un aspecto adicional, la invención se refiere a un anticuerpo antiidiotípico que se une a un anticuerpo anti-CD38 de la invención como se describe en el presente documento.

Un anticuerpo antiidiotípico (Id) es un anticuerpo que reconoce determinantes únicos generalmente asociados al sitio de unión con el antígeno de un anticuerpo. Se puede preparar un anticuerpo Id inmunizando un animal de la misma especie y tipo genético que la fuente de un mAb anti-CD38 con el mAb para el que se está preparando un anti-Id. Normalmente, el animal inmunizado puede reconocer y responder a los determinantes idiotípicos del anticuerpo inmunizante produciendo un anticuerpo para estos determinantes idiotípicos (el anticuerpo anti-Id). Dichos anticuerpos se describen, por ejemplo, en el documento US 4 699 880.

Como "inmunógeno" también puede utilizarse un anticuerpo anti-Id para inducir una respuesta inmunitaria en otro animal, produciendo un anticuerpo denominado anticuerpo anti-Id. Un anticuerpo anti-Id puede ser, desde el punto de vista del epítipo, idéntico al mAb original, que indujo el anti-Id. Por tanto, usando anticuerpos contra los determinantes idiotípicos de un mAb, es posible identificar otros clones que expresen anticuerpos de idéntica especificidad. Los anticuerpos anti-Id pueden modificarse (produciendo así variantes de anticuerpos anti-Id) y/o derivatizarse mediante cualquier técnica adecuada, tal como se describe en cualquier otra parte en el presente documento con respecto a los anticuerpos anti-CD38 de la presente invención.

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

Ejemplos

Ejemplo 1

Generación de anticuerpos

Cada dos semanas, se inmunizaron ratones HCo12 con HA-CD38 20 µg purificado, alternando con células transfectadas con NIH-3T3-CD38. La primera inmunización se realizó con 5×10^6 células en PBS 100 µl, mezclado con CFA 100 µl, i.p., la segunda y siguientes inmunizaciones con HA-CD38 s.c., en presencia de PBS 100 µl, mezclado con IFA 100 µl. Las siguientes inmunizaciones se realizaron con células transfectadas en presencia de PBS 200 µl. Después de revelar el título, los ratones recibieron un refuerzo de HA-CD38 20 µg en PBS, i.v.

Los bazo de estos ratones se extrajeron, se aislaron los esplenocitos, y basándose en protocolos estándar, se fusionaron con PEG a una línea celular de mieloma de ratón. Después, los hibridomas resultantes se exploraron con respecto a la producción de anticuerpos humanos mediante ELISA y con respecto a la especificidad de CD38 usando células NS/O humanas transfectadas con CD38 mediante análisis FACS y unión de proteína HA-CD38 recombinante mediante ELISA.

Análisis de secuencias de los dominios variables del HuMab anti-CD38 y clonación en vectores de expresión

A partir de 5×10^6 células de hibridoma, se preparó ARN total de los HuMab (anticuerpos monoclonales humanos) anti-CD38 y a partir de 100 ng de ARN total se preparó ADN complementario (ADNc) con 5'-RACE (siglas del inglés *rapid amplification of cDNA ends*, amplificación rápida de extremos de ADNc), utilizando el kit de amplificación de ADNc SMART RACE (Clontech), de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Las regiones codificantes de VH y VL se amplificaron por PCR y se clonaron en el vector pCR-Blunt II-TOPO (Invitrogen) usando el kit de clonación de PCR Zero Blunt (Invitrogen). Para cada HuMab, se secuenciaron 16 clones de VL y 8 clones de VH. Las regiones codificantes de VL y VH se clonaron en los vectores pKappa y pGlf.

Las regiones CDR se indicaron según el IMGT. (http://imgt.cines.fr/IMGT_vquest/vquest?livret=0&Option=hu-manlg)

Se identificaron los siguientes anticuerpos monoclonales humanos IgG1k:

	VH	VL
025	SEQ ID NO: 7	SEQ ID NO: 32
026	SEQ ID NO: 12	SEQ ID NO: 37
028	SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO: 27

(continuación)

	VH	VL
049	SEQ ID NO: 17	SEQ ID NO: 42
056	SEQ ID NO: 22	SEQ ID NO: 47

Ejemplo 2**5 Espectrometría de masas con tiempo de vuelo de cuadrupolo con ionización mediante electropulverización de anticuerpos anti-CD38**

Los datos de peso molecular intacto de los anticuerpos anti-CD38, 025, 057 (misma secuencia de aminoácidos que el anticuerpo 026), 028, 049 y 056, se obtuvieron usando EM con electropulverización de tipo nanopulverización en un espectrómetro de masas Q-TOF (*Quadrupole-Time of Flight*, tiempo de vuelo de cuadrupolo). Las partes alícuotas de cada muestra de anticuerpo se desalinizaron fuera de línea (*offline*) usando un cartucho micro-tap C₄ y se eluyeron en disolvente de propanol/ácido trifluoroacético. El instrumento se calibró utilizando iones de fragmentos de glufibrinopéptido en modo EM/EM. Para desconvolucionar los datos de carga múltiple obtenidos, se usó el programa informático MassLynx 4.0.

La información sobre el peso molecular de los componentes de la cadena ligera y pesada de estos anticuerpos se obtuvo después de la reducción usando ditiotretol y el análisis como se describió anteriormente.

Tabla 1: Masa de los anticuerpos CD38 (en Dalton)

Anticuerpo	PM intacto			Cadena ligera	Cadena pesada	
	K0	K1	K2		K0	K1
-025	144742,8	144874,1	144999,8	23357,8	49017,4	49145,8
-057	144828,2	144946,4	145071,2	23357,8	49047,4	49175,8
-028	144818,3	144946,4	145074,7	23357,8	49054,5	49182,8
-049	144864,0	144990,6	145117,8	23384,8	49049,3	49177,9
-056		145100,7	145222,7	23384,8	49099,5	49226,4

Ejemplo 3*Estudios de bloqueo cruzado usando FACS*

Células CHO-CD38 se incubaron con un exceso de anticuerpos específicos de CD38 no marcados (4° C, 15 min). Después, las células se incubaron con el anticuerpo 005 marcado con FITC (la concentración se aproxima a la CE₉₀, 4° C, 45 min) (005 se desvela en el documento WO2006099875). Después de lavar las células dos veces con PBS-BSA, se midió la fluorescencia mediante citometría de flujo. La unión del anticuerpo 005 marcado con FITC, se bloqueó debido al exceso de anticuerpos 025, 026, 028, 049 y 056 no marcados, lo que indicaba que estos anticuerpos tenían epítomos solapantes. La unión del anticuerpo 005 marcado con FITC, no se bloqueó debido al exceso del anticuerpo 003 no marcado (desvelado en el documento WO2006099875) lo que pone de manifiesto la unión a un epítomo diferente.

Estudios de bloqueo cruzado usando ELISA

Sobre la superficie de una placa ELISA, se aplicó la CD38 humana soluble. El CD38 aplicado se incubó con un exceso de anticuerpos específicos de CD38 no marcados durante aproximadamente 15 minutos y posteriormente se añadieron anticuerpos específicos de CD38 marcados con biotina (la concentración se aproxima a la CE₉₀, TA, 1 hora). Después de lavar tres veces con PBS/Tween, se añadió estreptavidina conjugada con peroxidasa de rábano picante (HRP, *horseradish peroxidase*) y la mezcla se incubó durante 1 hora a TA (temperatura ambiente). El complejo se detectó mediante la adición de una solución de ABTS y la transformación de sustrato, mediada por HRP, se midió usando un lector de ELISA a una DO de 405 nm.

Estudios de bloqueo cruzado usando ELISA de tipo sándwich

Sobre la superficie de una placa ELISA, se aplicaron anticuerpos anti-CD38. Los anticuerpos unidos a la placa se incubaron con CD38 soluble marcado con biotina en presencia de un exceso de anticuerpos anti-CD38 en fase fluida. Después de lavar con PBS/Tween, el CD38 unido, marcado con biotina, se detectó con estreptavidina conjugada con HRP durante 1 hora a TA. Este complejo se detectó mediante la adición de una solución de ABTS (después del lavado con PBS/Tween) y la transformación de sustrato, mediada por HRP, se midió usando un lector de ELISA a una DO de 405 nm.

Ejemplo 4**Maqueo epitópico***Construcción de los vectores de expresión HA-CD38 e His-CD38.*

Las secuencias codificantes del dominio extracelular de la CD38 humana (idénticas a los aminoácidos 45-300 de la entrada AAA68482 del Genbank) se amplificaron a partir del plásmido pClpuroCD38 (proporcionado por el Prof. M. Glennie, Tenovus Research Laboratory, Southampton General Hospital, Southampton, RU) usando PCR, introduciendo, sitios de restricción, una secuencia Kozak ideal (GCCGCCACC) y secuencias que codifican un péptido señal y una etiqueta de HA N-terminal (ypdyvpdy). La construcción se clonó en el vector de expresión de mamífero pEE13.4 (Lonza Biologics). Esta construcción se denominó pEE13.4HACD38.

Se realizó una construcción similar sintéticamente y totalmente optimizada con codones (GeneArt, Ratisbona, Alemania), reemplazando la parte codificante de la etiqueta de HA por una parte codificante de la etiqueta de His (HHHHHH). La construcción se clonó en pEE13.4 y se denominó pEE13.4HisCD38.

Mutagénesis dirigida a sitio

En la molécula CD38, se introdujeron varias mutaciones en el supuesto sitio de unión al anticuerpo.

Se generaron sustituciones de ADN que condujeron a las sustituciones de aminoácidos T237A, Q272R o S274F usando el kit de mutagénesis dirigida a sitio de QuickChange II XL (Stratagene, Ámsterdam, Países Bajos) en el vector pEE13.4HACD38. De manera similar, se introdujo una sustitución codificante D202G en el vector pEE13.4HisCD38.

Expresión transitoria en células HEK-293F

Se obtuvieron células Freestyle™ 293-F (un subclón de HEK-293 adaptado al crecimiento en suspensión y al medio Freestyle definido químicamente, (HEK-293F)) en Invitrogen y se transfectaron con pEE13.4HACD38, pEE13.4HisCD38 o con las cuatro construcciones que llevaban las mutaciones, según el protocolo del fabricante usando el reactivo 293fectin (Invitrogen). Para los estudios de unión del anti-CD38, se utilizaron sobrenadantes de cultivo celular de células transfectadas en ELISA.

Unión de anticuerpos anti-CD38

Mutaciones T237A, Q272R y S274F: Durante la noche, placas de ensayo ELISA (Greiner, nº 655092) se revistieron a 4° C con anticuerpo anti-HA 1 µg (Sigma, nº. H-9658) y posteriormente se bloquearon con suero de pollo al 2 %. Los sobrenadantes de cultivo de células HEK293F transfectadas se diluyeron, se aplicaron a las placas de ensayo ELISA y se incubaron durante 1 hora a TA. Después del lavado, se añadieron diluciones en serie de anticuerpos anti-CD38 y se incubaron durante 1 hora a TA. Los anticuerpos unidos se detectaron con anticuerpos de cabra anti IgG humana conjugados con HRP. El ensayo se reveló con ABTS (Roche, nº. 1112597) y la absorbancia se midió a 405 nm usando un espectrofotómetro.

Mutación D202G: Placas de ensayo ELISA (Greiner, nº. 655092) se revistieron durante la noche a 4°C con penta-His 1 µg (Qiagen nº. 34660) y posteriormente se bloquearon con PBS/BSA al 2 %. Los sobrenadantes de cultivo de células HEK293F transfectadas se diluyeron, se aplicaron a las placas de ensayo ELISA y se incubaron durante 2 horas a TA. Después del lavado, se añadieron diluciones en serie de anticuerpos anti-CD38 y se incubaron durante 1 hora a TA. Los anticuerpos unidos se detectaron con anticuerpos de cabra anti IgG humana conjugados con HRP. El ensayo se reveló con ABTS (Roche, nº. 1112597) y la absorbancia se midió a 405 nm usando un espectrofotómetro.

Este estudio reveló que la unión de 025, 026, 028 y 049 no era sensible a las mutaciones T237A, Q272R, S274F y A199T, pero se vio gravemente afectada por D202G (025, 028, 049) (Figura 2).

Ejemplo 5**Unión de anticuerpos anti-CD38 a células CHO transfectadas con CD38 (CHO-CD38) y a células Daudi-luc**

Después de recoger y contar, células Daudi-luc, células CHO transfectadas con CD38 y células CHO de control, se resuspendieron en PBS (1×10^6 células/ml). Las células se transfirieron a placas de fondo en V de 96 pocillos (100 µl/pocillo) y se lavaron dos veces en PBS-BSA (PBS complementado con BSA al 0,1 % y Na-azida al 0,02 %). Se añadieron 50 µl de anticuerpo en PBS-BSA en diluciones triples que variaban de 0,3 a 30 µg/ml (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 marcado con FITC en PBS-BSA (4° C en la oscuridad, 30 minutos). Las células se lavaron tres veces y la unión específica de los anticuerpos CD38 con las células CHO-CD38 y Daudi-luc se detectó mediante citometría de flujo.

En la figura 3 se muestra que los anticuerpos 025, 026, 028, 049 y 056 se unen a células CHO-CD38 y a células Daudi-luc.

Ejemplo 6

Citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (CCDA)

La capacidad de los anticuerpos anti-CD38 para realizar CCDA de células Daudi-luc, se determinó como se explica a continuación. Como células efectoras, se utilizaron células mononucleares de sangre periférica de voluntarios sanos (UMC Utrecht, Países Bajos).

Se recogieron células Daudi-luc (5×10^6 células) en RPMI++ (medio de cultivo RPMI 1640 complementado con suero de ternero Cosmic al 10 % (HyClone, Logan, UT, EE. UU.)), a las que se añadieron ^{51}Cr 100 μCi (cromo-51; Amersham Biosciences Europe GmbH, Roosendaal, Países Bajos), 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, 1500 rpm, 5 min), las células se resuspendieron en RPMI++ y se contaron por exclusión con azul de tripano. Las células se llevaron a una concentración de 1×10^5 células/ml.

Preparación de células efectoras

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

Configuración de la CCDA

Con una pipeta, 50 μl células diana objetivo marcadas con ^{51}Cr , se transfirieron a placas de 96 pocillos, y se añadieron 50 μl de anticuerpo, diluido en RPMI++ (concentraciones finales de 10, 1, 0,1, 0,01 $\mu\text{g/ml}$). Las células se incubaron (TA, 15 min) y se añadieron 50 μl de células efectoras, dando como resultado una relación de células efectoras con respecto a células diana de 100: 1 (para la determinación de la lisis máxima, se añadieron 100 μl de Triton-X100 al 5 % en lugar de células efectoras; para la determinación de la lisis espontánea, se usaron 50 μl de células diana y 100 μl de RPMI++). Las células se centrifugaron (500 rpm, 5 min) y se incubaron (a 37°C , con CO_2 al 5 % durante 4 horas). Después de centrifugar las células (1 500 rpm, 5 min), se recogieron 100 μl de sobrenadante en tubos micrónicos y se contaron en un contador gamma. El porcentaje de lisis específica se calculó de la siguiente manera:

$$(\text{cpm muestra} - \text{cpm solo de células diana}) / (\text{cpm lisis máxima} - \text{cpm solo de células diana})$$

en donde cpm es cuentas por minuto.

Los anticuerpos 025, 026, 028, 049 y 056 indujeron la lisis mediada por CCDA en células Daudi (Figura 4).

Ejemplo 7

Citotoxicidad dependiente del complemento (CDC)

Después de recoger y contar las células Daudi-luc, la viabilidad de las células debe ser $\geq 90\%$. Después del lavado (PBS), las células se resuspendieron a $2,0 \times 10^6$ células/ml en RPMI-B (RPMI complementado con BSA al 1 %). Después de eso, las células se colocaron en placas de fondo redondo de 96 pocillos a 1×10^5 células/pocillo (50 μl /pocillo). Después, se añadieron 50 μl de anticuerpos a los pocillos (intervalo de concentración final entre 0-100 $\mu\text{g/ml}$ (diluciones triples en RPMI-B)). Después de la incubación (a TA durante 15 min), se añadieron 11 μl de suero humano agrupado (grupo de 18 donantes sanos) a cada pocillo (a 37°C durante 45 min). Los pocillos se resuspendieron una vez y se transfirieron 120 μl a tubos FACS (Greiner). Después, a esta suspensión, se añadieron 10 μl de yoduro de propidio (PI; Sigma-Aldrich Chemie BV) (solución de 10 $\mu\text{g/ml}$). La lisis se detectó por citometría de flujo (FACScalibur™, Becton Dickinson, San Diego, CA, EE. UU.) midiendo el porcentaje de células muertas (que corresponde a células positivas a PI).

En la figura 5 se presenta la lisis de células CHO-CD38 mediada por CDC causada por los anticuerpos anti-CD38, 025, 026, 028, 049 y 056. Estos anticuerpos anti-CD38 no lograron inducir CDC de las células Daudi-luc.

Ejemplo 8

Actividad enzimática

Se determinaron los efectos de los anticuerpos anti-CD38 sobre las actividades enzimáticas de CD38. Se sabe que

CD38 cataliza diversas reacciones enzimáticas diferentes, incluyendo una reacción ciclasa que transforma el NAD en ADP ribosa cíclica (ADPRc), una reacción de hidrolasa que transforma NAD o ADPRc en ADP ribosa, y una reacción de intercambio de bases en la que se produce ácido nicotínico adenina dinucleótido 2'-fosfato (NAADP).

5 Actividad ciclasa

Ensayo con NGD

La capacidad de los anticuerpos anti-CD38 para interferir con la actividad ciclasa de CD38 usando NGD como sustrato, se midió en un ensayo esencialmente como se describe en Graeff et al., J. Biol. Chem. 269, 30260-30267 (1994):

Resumiendo, el sustrato NGD+ (80 μ M) se incubó con CD38 (dominio extracelular de CD38 humana etiquetado con His 0,6 μ g/ml, véase el ejemplo 3 del documento WO2006099875 con respecto a la purificación de His-CD38 en un tampón que contiene Tris-HCl 20 mM, pH 7,0). La producción de GDPrc puede monitorizarse espectrofotométricamente a la longitud de onda de emisión de 410 nm (excitación a 300 nm). En este ejemplo, se utilizaron un filtro de excitación de 340 ± 60 nm y un filtro de emisión de 430 ± 8 nm.

Para ensayar el efecto de los anticuerpos 025, 026, 028, 049 y 056 sobre la actividad enzimática de CD38, la proteína recombinante His-CD38 se preincubó durante 15 minutos a temperatura ambiente con 3 μ g/ml de los anticuerpos antes de añadir el sustrato NGD+. La producción de GDP-ribosa cíclica (GDPrc) se registró después de 90 minutos.

En la figura 6A se muestra que los anticuerpos 025, 026, 028, 049 y 056 tienen un pronunciado efecto inhibitor sobre la producción de GDPrc. Después de 90 minutos, 3 μ g/ml de anticuerpo (025, 026, 028, 049 o 056) dieron como resultado una producción reducida de 53-66 % de GDPrc. En un experimento a lo largo del tiempo, se demostró que la tasa de producción de GDPrc se reducía en muestras tratadas con el anticuerpo mAb 028 específico de CD38 en comparación con la producción de GDPrc en presencia de HuMab-KLH o en muestras de control no tratadas con CD38 (Figura 6B). En la figura 6C se muestra una curva de respuesta a la dosis (0,01 - 30 μ g/ml) para el anticuerpo 028. En este experimento se observa una reducción máxima de la producción de GDPrc del 41 %.

Para ensayar el efecto del anticuerpo 028 sobre la actividad enzimática de CD38 expresada en las células, células CHO-CD38 se preincubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente con una dilución en serie de 028 (0,01 - 30 μ g/ml) antes de añadir el sustrato NGD+. La producción de GDP-ribosa cíclica (GDPrc) se registró después de 90 minutos. Como se muestra en la Figura 6D, el anticuerpo 028 inhibe la producción de GDPrc de una manera dependiente de la concentración.

Reacción de ciclasa inversa

El efecto del mAb 028 sobre la producción de ADPRc a partir de NAD por CD38, se determinó mediante la reacción de ciclasa inversa. Este ensayo se basa en la reversibilidad de la reacción catalizada por CD38. En presencia de altas concentraciones de nicotinamida y ADPRc, las ADP-ribosil ciclasas pueden producir NAD. Los anticuerpos se diluyeron a 10 μ g/ml en Tris-HCl 20 mM, BSA al 0,01 % (v/v), pH 7,2 (Tris/BSA). El CD38 humano recombinante se diluyó a 2 μ g/ml con Tris/BSA. Los anticuerpos se incubaron previamente durante 10 minutos con CD38 mezclando los mismos volúmenes (50 μ l) de los anticuerpos diluidos con el CD38 diluido. La preincubación se realizó a temperatura ambiente. La reacción se inició transfiriendo 25 μ l de CD38/mezcla de anticuerpos a 25 μ l de una solución que contenía ADPRc 1 mM y nicotinamida 10 mM. Se dejó que la reacción continuase a temperatura ambiente durante 1 a 20 minutos y se detuvo en el momento apropiado filtrando toda la muestra a través de un filtro Millipore MultiScreen-IP de placa de 96 pocillos para eliminar las proteínas. El NAD resultante producido se midió por el método de Graeff y Lee (1). Se procesaron controles que contenían nicotinamida sin ADPRc para estimar la cantidad de NAD que contaminaba los reactivos. En estos experimentos, había NAD contaminante no detectable.

En la Tabla 2 se muestra que 1 μ g/ml del mAb-028 redujo la producción de ADPRc a partir de NAD en un 67 %. El mAb-KLH no tuvo efecto sobre la producción de ADPRc a partir de NAD.

Tabla 2: El efecto del anticuerpo 028 sobre la producción de ADPRc a partir de NAD

Condición	pmoles de ADPRc/min
control de CD38	4,3
mAb-KLH	4,3
mAb-028	1,4

Ensayo con 8-amino-NAD (8NH₂-NAD)

Como la producción de ADPRc solo representa aproximadamente el 1 % del producto generado a partir de NAD por CD38 (ADPR representa el resto), la actividad ribosil ciclasa también se evaluó utilizando, como sustrato, 8-amino-

NAD (8NH₂-NAD). A diferencia de NAD, una cantidad considerablemente mayor (aproximadamente 8 %) del sustrato 8NH₂-NAD se cicla a 8-amino-ADPRc (8NH₂-ADPRc) y es detectable mediante análisis de HPLC. Resumiendo, los anticuerpos se diluyeron a 10 µg/ml en Tris-HCl 20 mM, BSA al 0,01 % (v/v), pH 7,2 (Tris/BSA). El CD38 humano recombinante se diluyó a 2 µg/ml con Tris/BSA. Los anticuerpos se incubaron previamente durante 10 minutos con CD38 mezclando los mismos volúmenes (50 µl) de los anticuerpos diluidos con el CD38 diluido. La preincubación se realizó a temperatura ambiente. La reacción se inició transfiriendo 25 µl de mezcla de CD38/anticuerpos a 75 µl de 8NH₂-NAD 0,5 mM. Se dejó que la reacción continuase a temperatura ambiente durante 10 minutos y se detuvo en el momento apropiado filtrando toda la muestra a través de un filtro Millipore MultiScreen-IP de placa de 96 pocillos para eliminar las proteínas. Los productos de reacción (8NH₂-ADPRc y 8NH₂-ADPR) se analizaron mediante HPLC de fase inversa de la siguiente manera. La columna era una columna de fase inversa LC18-T de 0,46 x 15 cm de Supelco. El disolvente A consistía en KH₂PO₄ 20 mM, fosfato de tetrabutilamonio 5 mM, pH 6 y el disolvente B consistía en 50 % de A y 50 % de metanol. El caudal fue de 1 ml/min y la composición inicial de los disolventes fue del 15 % de B. La separación de los sustratos y productos se realizó utilizando el siguiente gradiente: de 0 a 3,5 minutos (15 % de B), de 3,5 a 5,5 minutos (del 15 al 32,5 % de B), de 5,5 a 9 minutos (del 32,5 al 40 % de B), de 9 a 11,5 minutos (del 40 al 50 % de B) y se usó un gradiente de 16 a 18 minutos (del 50 al 15 % de B) para eluir los sustratos y productos. Las muestras se prepararon añadiendo 400 µl de disolvente A a 100 µl de muestra filtrada. Se inyectó toda la muestra. El caudal y la composición del tampón se controlaron con bombas de HPLC Beckman 125 y el programa informático System Gold, y los picos se detectaron con un detector de UV Beckman 166. Las áreas de los picos de 8NH₂-NAD, 8NH₂-ADPRc y 8NH₂-ADPR, se utilizaron para calcular la cantidad de 8NH₂-ADPRc producida en el ensayo. El sistema de HPLC se basa en un sistema descrito por Schweitzer et al. (2).

En la figura 7A se muestra que el mAb-028 inhibe 8NH₂-ADPRc en un 78 %. El mAb-028 inhibe la producción de 8NH₂-ADPRc de una manera dependiente de la concentración (Figura 7B)

Por tanto, el mAb-028 inhibe la reacción de ADP-ribosil ciclasa de CD38 como se ensayó por tres métodos diferentes.

Actividad hidrolasa

Análisis de actividad hidrolasa mediante HPLC

La actividad hidrolasa se midió determinando la cantidad de ADPR producida a partir de ADPRc o NAD por HPLC. Los anticuerpos se diluyeron a 10 µg/ml o se titularon en Tris-HCl 20 mM, BSA al 0,01 % (v/v), pH 7,2 (Tris/BSA). El CD38 humano recombinante se diluyó a 2 µg/ml con Tris/BSA. Los anticuerpos se incubaron previamente durante 10 minutos con CD38 mezclando los mismos volúmenes (50 µl) de los anticuerpos diluidos con el CD38 diluido. La preincubación se realizó a temperatura ambiente. Para el método basado en HPLC, la reacción de ADPRc hidrolasa se inició transfiriendo 40 µl de mezcla de CD38/anticuerpos a 10 µl de ADPRc 4,3 mM y la reacción NADasa se inició transfiriendo 40 µl de mezcla de CD38/anticuerpos a 10 µl de NAD 1 mM. Se dejó que la reacción continuase a temperatura ambiente y se detuvo en el momento apropiado mediante la adición de 25 µl de HCl 1 M. La proteína se eliminó filtrando toda la muestra a través de un filtro Millipore MultiScreen-IP de placa de 96 pocillos. Cada filtrado se neutralizó añadiendo 15 µl de base Tris 2 M y se mantuvo en hielo hasta que se analizó por HPLC. El análisis de actividad hidrolasa se basa en el ensayo de HPLC desarrollado por Lee y Aarhus (3). Las muestras se analizaron en una columna de 0,5 x 5 cm de AG MP-1 (forma de trifluoroacetato) eluidas a 3 ml/min con un gradiente cóncavo ascendente de ácido trifluoroacético (TFA) de 0 a 150 mM durante 10 minutos. El caudal y la composición del tampón se controlaron con bombas de HPLC Beckman 125 y el programa informático System Gold, y los picos se detectaron con un detector de UV Beckman 166. Las áreas de NAD, ADPRc y ADPR se utilizaron para calcular la cantidad de ADPR producida en el ensayo.

A concentraciones de 10 µg/ml el mAb-028, pero no el mAb-KLH, estimuló la actividad hidrolasa de ADPRc en un 62 % y la actividad hidrolasa de NAD en un 37 % en comparación con el control CD38 (Figura 8A). En la figura 8B se muestra que el mAb-028 estimuló la hidrólisis de ADPRc de una manera dependiente de la dosis. A concentraciones de 30 µg/ml, el mAb-028 estimuló la actividad hidrolasa en un 78 %.

Análisis de la actividad hidrolasa por cromatografía en capa fina (TLC)

La actividad hidrolasa se midió midiendo la cantidad de ³²P-ADPR producida a partir de ³²P-ADPRc por cromatografía en capa fina (4). La reacción de hidrolasa de ADPRc basada en ³²P se inició añadiendo 20 µl de mezcla de CD38/anticuerpos (como anteriormente) a 5 µl de una mezcla que contenía ADPRc 0,5 mM y aproximadamente 0,1 µCi de ³²P-ADPRc. Se dejó que la reacción continuase a temperatura ambiente y en el momento apropiado, para detener la reacción, se añadieron 5 µl de la reacción a 5 µl de TFA 150 mM. La reacción se analizó mediante cromatografía en capa fina (TLC, siglas del inglés *thin layer chromatography*) de PEI-celulosa (polietilenimina-celulosa). En el origen de una placa de TLC de PEI-celulosa (10 x 20 cm), se detectó 1 µl de cada muestra de reacción detenida. Las placas se revelaron con NaCl 0,2 M en etanol al 30 % (v/v). Las placas se secaron y se expusieron a pantallas de fósforo de obtención de imágenes. Las pantallas se analizaron en un Packard Cyclone Phosphorimager para determinar la cantidad de ³²P-ADPR producida.

En la figura 8C se muestra que el mAb-028 estimuló la hidrólisis de ^{32}P -ADPRc de una manera dependiente de la dosis. Estos resultados fueron similares a los resultados de la actividad de hidrolasa de ADPRc medida mediante HPLC (véase la Figura 8B).

Actividad de intercambio de bases

Se evaluó el efecto de los anticuerpos CD38 sobre la síntesis de ácido nicotínico adenina dinucleótido 2'-fosfato (NAADP) mediante la actividad de intercambio de bases de CD38. Los anticuerpos (mAb-KLH y 028) se diluyeron a 40 µg/ml en Hepes 20 mM, pH 7,3, BSA al 0,01 % (v/v) (Hepes/BSA). El CD38 humano recombinante se diluyó a 2 µg/ml con Hepes/BSA. Los anticuerpos se incubaron previamente durante 10 minutos con CD38 mezclando los mismos volúmenes (90 µl) de los anticuerpos diluidos con el CD38 diluido. La preincubación se realizó a temperatura ambiente. La reacción de intercambio de bases se inició transfiriendo 50 µl de mezcla de CD38/anticuerpos a 50 µl de una mezcla de reacción que contenía acetato de sodio 200 mM, pH 4,0, ácido nicotínico 25 mM y nicotinamida adenina dinucleótido 2'-fosfato (NADP) 2 mM. Se dejó que la reacción continuase a temperatura ambiente durante 30 minutos y se detuvo filtrando toda la muestra a través de un filtro Millipore MultiScreen-IP de placa de 96 pocillos para eliminar las proteínas. Los productos de reacción en los filtrados se determinaron mediante HPLC de intercambio aniónico en una columna de AG MP-1 (forma trifluoroacetato) de 0,5 x 5 cm, eluida a 1 ml/min con un gradiente cóncavo ascendente de ácido trifluoroacético (TFA) de 0 a 150 mM más de 30 minutos (5). Los filtrados (50 µl) se neutralizaron añadiendo 5 µl de base Tris 2 M justo antes de la inyección. El caudal y la composición del tampón se controlaron con bombas de HPLC Beckman 125 y el programa informático System Gold, y los picos se detectaron con un detector de UV Beckman 166. Las áreas de los picos de NADP, NAADP (producto de intercambio de bases) y adenosina difosfo ribosa 2'-fosfato (ADPR-P, producto hidrolítico) se utilizaron para calcular las tasas de síntesis de NAADP e hidrólisis de NADP.

En la figura 9 se muestra que el mAb-028 inhibe la capacidad de CD38 para catalizar la formación de NAADP. La inhibición de la producción de NAADP por el mAb-028 depende de la concentración (Figura 9B) con una CI₅₀ de 0,14 µg/ml.

LISTA DE REFERENCIAS

1. Graeff, R. y H. C. Lee. 2002. A novel cycling assay for cellular cADP-ribose with nanomolar sensitivity. *Biochem J* 361:379-384.
2. Schweitzer, K., G. W. Mayr y A. H. Guse. 2001. Assay for ADP-ribosyl cyclase by reverse-phase high-performance liquid chromatography. *Anal Biochem* 299:218-226.
3. Lee, H. C. y R. Aarhus. 1993. Wide distribution of an enzyme that catalyzes the hydrolysis of cyclic ADP-ribose. *Biochim Biophys Acta* 1164:68-74.
4. White, T. A., S. Johnson, T. F. Walseth, H. C. Lee, R. M. Graeff, C. B. Munshi, Y. S. Prakash, G. C. Sieck y M. S. Kannan. 2000. Localización subcelular de las actividades de ADP-ribosil ciclase cíclica y ADP-ribosa hidrolasa cíclica en el músculo liso de las vías respiratorias porcinas. *Biochim Biophys Acta* 1498:64-71.
5. Aarhus, R., R. M. Graeff, D. M. Dickey, T. F. Walseth y H. C. Lee. 1995. ADP-ribosyl cyclase and CD38 catalyze the synthesis of a calcium-mobilizing metabolite from NADP. *J Biol Chem* 270:30327-30333.

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> Genmab A/S
- <120> NUEVOS ANTICUERPOS CONTRA LA CD38 HUMANA
- <130> P/54.WO
- <160> 52
- <170> PatentIn versión 3.5
- <210> 1
- <211> 363
- <212> ADN
- <213> *Homo sapiens*
- <400> 1

ES 2 764 791 T3

cagggtccaac tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctgggtcctc ggtgaaggtc 60
 tcctgcaagg cttttggagg caccttcagc agctacgcta tcagctgggt gcgacaggcc 120
 cctggacaag ggcttgagtg gatgggaagg atcatccgtt tccttggtat agcaaactac 180
 gcacagaagt tccagggcag agtcacgctt atcgcggaaca aatccacgaa cacagcctac 240
 atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgctt attactgtgc gggggaacct 300
 ggggagcggg accccgatgc tgttgatata tggggccaag ggacaatggt caccgtctct 360
 tca 363

<210> 2
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 2

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 Phe Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Arg Ile Ile Arg Phe Leu Gly Ile Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Leu Ile Ala Asp Lys Ser Thr Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Gly Glu Pro Gly Glu Arg Asp Pro Asp Ala Val Asp Ile Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 3
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 3

ES 2 764 791 T3

Gly Gly Thr Ser Phe Ser Ser Tyr Ala
1 5

5 <210> 4
<211> 8
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 4

Ile Ile Arg Phe Leu Gly Ile Ala
1 5

10

15 <210> 5
<211> 14
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 5

Ala Gly Glu Pro Gly Glu Arg Asp Pro Asp Ala Val Asp Ile
1 5 10

20

25 <210> 6
<211> 364
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<400> 6

caggtccaac tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctgggtcctc ggtgaaggtc	60
tcctgcaagg cttttggagg caccttcagc agctatgcta tcagctgggt acgacaggcc	120
cctggacaag ggcttgagtg gatgggaagg atcatccgtt tccttggtaa agcaaatac	180
gcacagaagt tccagggcag agtcacgctt accgcggaca aatccacgaa cacagcctac	240
atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgttt attactgtgc gggggaacct	300
ggggatcggg accccgatgc tgttgatata tggggccaag ggacaatggt caccgtctct	360
tcag	364

30 <210> 7
<211> 121
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

35 <400> 7

ES 2 764 791 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 Phe Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Arg Ile Ile Arg Phe Leu Gly Lys Ala Asn His Ala Gln Lys Phe
 50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Thr Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Gly Glu Pro Gly Asp Arg Asp Pro Asp Ala Val Asp Ile Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 8
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 8

Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr Ala
 1 5

<210> 9
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 9

Ile Ile Arg Phe Leu Gly Lys Ala
 1 5

<210> 10
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 10

ES 2 764 791 T3

Ala Gly Glu Pro Gly Asp Arg Asp Pro Asp Ala Val Asp Ile

1

5

10

5

<210> 11
<211> 364
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<400> 11

cagggtccaac tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctgggtcctc ggtgaaggtc 60
tcctgcaagg cttttggagg caccttcagc agttatgcta ttagctgggt gcgacaggcc 120
cctggacaag ggcttgagtg gatgggaagg atcatccgtt tccttggtaa aacaaatcac 180
gcacagaagt tccagggcag agtcacactt accgcggaca aatccacgaa cacagcctac 240
atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgttt attactgtgc gggggaacct 300
ggggatcggg accccgatgc tgttgatatc tggggccaag ggacaatggt caccgtctct 360
tcag 364

10

<210> 12
<211> 121
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 12

15

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 Phe Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Arg Ile Ile Arg Phe Leu Gly Lys Thr Asn His Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Thr Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Gly Glu Pro Gly Asp Arg Asp Pro Asp Ala Val Asp Ile Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115 120

20

ES 2 764 791 T3

5
 <210> 13
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 13

Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr Ala
 1 5

10
 <210> 14
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 15 <400> 14

Ile Ile Arg Phe Leu Gly Lys Thr
 1 5

20
 <210> 15
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 25 <400> 15

Ala Gly Glu Pro Gly Asp Arg Asp Pro Asp Ala Val Asp Ile
 1 5 10

30
 <210> 16
 <211> 364
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 16

cagggtccagc	tggtgcagtc	tggggctgag	gtgatgaagc	ctgggtcctc	ggtgaaggtc	60
tcctgcaagg	cttccggagg	caccttccgc	agctatgcta	tcagttgggt	gcgacaggcc	120
cctggacaag	ggcttgagtg	gatgggaagg	atcatcgttt	tccttggtaa	aacaaactac	180
gcacagaagt	tccagggcag	agtcacgctt	accgcgga	aatccacgac	cacagcctac	240
atggagctga	gcagcctgag	atctgaggac	acggccgtgt	attactgtac	gggggaacct	300
ggggctcggg	accccgacgc	ttttgatatc	tggggccaag	ggacaatggg	caccgtctct	360
tcag						364

35
 <210> 17
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 40 <400> 17

ES 2 764 791 T3

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Met Lys Pro Gly Ser
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Arg Ser Tyr
20 25 30

Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Arg Ile Ile Val Phe Leu Gly Lys Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Thr Thr Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Thr Gly Glu Pro Gly Ala Arg Asp Pro Asp Ala Phe Asp Ile Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115 120

5 <210> 18
<211> 8
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

10 <400> 18

Gly Gly Thr Phe Arg Ser Tyr Ala
1 5

15 <210> 19
<211> 8
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

20 <400> 19

Ile Ile Val Phe Leu Gly Lys Thr
1 5

25 <210> 20
<211> 14
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 20

ES 2 764 791 T3

Thr Gly Glu Pro Gly Ala Arg Asp Pro Asp Ala Phe Asp Ile
1 5 10

<210> 21
<211> 364
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<400> 21

cagggtccagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctgggtcctc ggtgaaggtc 60
tcctgcaagc cttccggagg caccttcagg agctacgcta tcagctgggt acgacaggcc 120
cctggacaag ggcttgagtg gatgggaagg atcatcgttt tccttggtaa agtaaaactac 180
gcacagaggt ttcagggcag agtcacgctt accgcggaca aatccacgac cacagcctac 240
atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtac gggggaacct 300
ggggctcggg accccgacgc ttttgatatac tggggccaag ggacaatggt caccgtctct 360
tcag 364

<210> 22
<211> 121
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 22

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 Pro Ser Gly Gly Thr Phe Arg Ser Tyr
20 25 30

Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Arg Ile Ile Val Phe Leu Gly Lys Val Asn Tyr Ala Gln Arg Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Thr Thr Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Thr Gly Glu Pro Gly Ala Arg Asp Pro Asp Ala Phe Asp Ile Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115 120

ES 2 764 791 T3

<210> 23
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 5
 <400> 23

 Gly Gly Thr Phe Arg Ser Tyr Ala
 1 5

 10 <210> 24
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 15 <400> 24

 Ile Ile Val Phe Leu Gly Lys Val
 1 5

 20 <210> 25
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 25 <400> 25

 Thr Gly Glu Pro Gly Ala Arg Asp Pro Asp Ala Phe Asp Ile
 1 5 10

 30 <210> 26
 <211> 321
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 26

 gacatccaga tgacccagtc tccatcctca ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
 atcacttgtc gggcgagtca gggatttcgc agctgggttag cctgggtatca gcagaaacca 120
 gagaaagccc ctaagtcctt gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
 aggttcagcg gcagtggatc tgggacagat ttactcttca ccatcagcag cctgcagcct 240
 gaagattttg caacttatta ctgccaacag tataatagtt acccgctcac tttcggcgga 300
 35 gggaccaagg tggagatcaa a 321

 40 <210> 27
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 27

ES 2 764 791 T3

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg 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 Leu
85 90 95

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

<210> 28
<211> 6
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
<400> 28

5

Gly Gly Ile Arg Ser Trp
1 5

10

<210> 29
<211> 3
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
<400> 29

15

Ala Ala Ser
1

20

<210> 30
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
<400> 30

25

Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Leu Thr
1 5

30

<210> 31

ES 2 764 791 T3

<211> 322
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

5 <400> 31

```

gacatccaga tgacccagtc tccatcctca ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc      60
atcacttgtc gggcgagtca ggggtattcgc agctgggttag cctgggtatca gcagaaacca    120
gagaaagccc ctaagtccct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca      180
aggttcagcg gcagtggatc tgggacagat ttcaactctca ccatcagcag cctgcagcct      240
gaagattttg caacttatta ctgccaacag tataatagtt acccgctcac tttcggcgga      300
gggaccaagg tggagatcaa ac                                              322

```

10 <210> 32
<211> 107
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

15 <400> 32

```

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1           5           10           15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg 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 Leu
          85           90           95

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

```

20 <210> 33
<211> 6
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 33

ES 2 764 791 T3

Gln Gly Ile Arg Ser Trp
1 5

5 <210> 34
<211> 3
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 34

Ala Ala Ser
1

10

15 <210> 35
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 35

Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Leu Thr
1 5

20

25 <210> 36
<211> 322
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<400> 36

gacatccaga tgacccagtc tccatcctca ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc	60
atcacttgtc gggcgagtca gggatttcgc agctggtag cctggatatca gcagaaacca	120
gagaaagccc ctaagtcctt gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca	180
aggttcagcg gcagtggatc tgggacagat ttactctca ccatcagcag cctgcagcct	240
gaagattttg caacttatta ctgccaacag tataatagtt acccgctcac ttctggcgga	300
gggaccaagg tggagatcaa ac	322

30 <210> 37
<211> 107
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

35 <400> 37

ES 2 764 791 T3

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg 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 Leu
85 90 95

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

<210> 38
<211> 6
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
<400> 38

Gln Gly Ile Arg Ser Trp
1 5

<210> 39
<211> 3
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
<400> 39

Ala Ala Ser
1

<210> 40
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
<400> 40

Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Leu Thr
1 5

<210> 41

ES 2 764 791 T3

<211> 322
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

5 <400> 41

```

gacatccaga tgaccagtc tccatcctca ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc      60
atcacttgtc gggcgagtc gggattcgc agctggtag cctggtagc gcagaaacca      120
gagaaagccc ctaagtccct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca      180
aggttcagcg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct      240
gaagattttg caacttatta ctgccaacag tataataatt atccgctcac tttcggcgga      300
gggaccaagg tggagatcaa ac                                             322
  
```

<210> 42
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

10

<400> 42

15

```

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1           5           10           15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg 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 Asn Tyr Pro Leu
          85           90           95

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

<210> 43
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

20

<400> 43

```

Gln Gly Ile Arg Ser Trp
1           5
  
```

25

<210> 44

ES 2 764 791 T3

<211> 3
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 5 <400> 44

 Ala Ala Ser
 1

 <210> 45
 10 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

 <400> 45
 15

 Gln Gln Tyr Asn Asn Tyr Pro Leu Thr
 1 5

 <210> 46
 20 <211> 322
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

 <400> 46

 gacatccaga tgacccagtc tccatcctca ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
 atcacttgtc gggcgagtca gggatattcgc agctgggttag cctgggtatca gcagaaacca 120
 gagaaagccc ctaagtccct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
 aggttcagcg gcagtggatc tgggacagat ttactctca ccatcagcag cctgcagcct 240
 gaagattttg caacttatta ctgccaacag tataataatt atccgctcac tttcggcgga 300
 25 gggaccaagg tggagatcaa ac 322

 <210> 47
 30 <211> 107
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

 <400> 47

ES 2 764 791 T3

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg 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 Asn Tyr Pro Leu
85 90 95

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

<210> 48
<211> 6
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 48

Gln Gly Ile Arg Ser Trp
1 5

<210> 49
<211> 3
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 49

Ala Ala Ser
1

<210> 50
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 50

Gln Gln Tyr Asn Asn Tyr Pro Leu Thr
1 5

<210> 51
<211> 300

ES 2 764 791 T3

<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 51

5

Met	Ala	Asn	Cys	Glu	Phe	Ser	Pro	Val	Ser	Gly	Asp	Lys	Pro	Cys	Cys	1	5	10	15
Arg	Leu	Ser	Arg	Arg	Ala	Gln	Leu	Cys	Leu	Gly	Val	Ser	Ile	Leu	Val	20	25	30	
Leu	Ile	Leu	Val	Val	Val	Leu	Ala	Val	Val	Val	Pro	Arg	Trp	Arg	Gln	35	40	45	
Gln	Trp	Ser	Gly	Pro	Gly	Thr	Thr	Lys	Arg	Phe	Pro	Glu	Thr	Val	Leu	50	55	60	
Ala	Arg	Cys	Val	Lys	Tyr	Thr	Glu	Ile	His	Pro	Glu	Met	Arg	His	Val	65	70	75	80
Asp	Cys	Gln	Ser	Val	Trp	Asp	Ala	Phe	Lys	Gly	Ala	Phe	Ile	Ser	Lys	85	90	95	
His	Pro	Cys	Asn	Ile	Thr	Glu	Glu	Asp	Tyr	Gln	Pro	Leu	Met	Lys	Leu	100	105	110	
Gly	Thr	Gln	Thr	Val	Pro	Cys	Asn	Lys	Ile	Leu	Leu	Trp	Ser	Arg	Ile	115	120	125	
Lys	Asp	Leu	Ala	His	Gln	Phe	Thr	Gln	Val	Gln	Arg	Asp	Met	Phe	Thr	130	135	140	
Leu	Glu	Asp	Thr	Leu	Leu	Gly	Tyr	Leu	Ala	Asp	Asp	Leu	Thr	Trp	Cys	145	150	155	160
Gly	Glu	Phe	Asn	Thr	Ser	Lys	Ile	Asn	Tyr	Gln	Ser	Cys	Pro	Asp	Trp	165	170	175	
Arg	Lys	Asp	Cys	Ser	Asn	Asn	Pro	Val	Ser	Val	Phe	Trp	Lys	Thr	Val	180	185	190	
Ser	Arg	Arg	Phe	Ala	Glu	Ala	Ala	Cys	Gly	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	

ES 2 764 791 T3

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 Gln
260 265 270

Phe Ser Cys Lys Asn Ile Tyr Arg Pro Asp Lys Phe Leu Gln Cys Val
275 280 285

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

<210> 52
<211> 300
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 52

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

5

10

ES 2 764 791 T3

Gly	Glu	Phe	Asn	Thr	Ser	Lys	Ile	Asn	Tyr	Gln	Ser	Cys	Pro	Asp	Trp	165	170	175
Arg	Lys	Asp	Cys	Ser	Asn	Asn	Pro	Val	Ser	Val	Phe	Trp	Lys	Thr	Val	180	185	190
Ser	Arg	Arg	Phe	Ala	Glu	Ala	Ala	Cys	Asp	Val	Val	His	Val	Met	Leu	195	200	205
Asn	Gly	Ser	Arg	Ser	Lys	Ile	Phe	Asp	Lys	Asn	Ser	Thr	Phe	Gly	Ser	210	215	220
Val	Glu	Val	His	Asn	Leu	Gln	Pro	Glu	Lys	Val	Gln	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
Lys	Asn	Pro	Glu	Asp	Ser	Ser	Cys	Thr	Ser	Glu	Ile					290	295	300

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo que se une a la CD38 humana de SEQ ID NO: 52, en donde el anticuerpo (i) no se une a una variante de CD38 humana en donde la Asp en la posición 202 se ha sustituido por Gly, (ii) se une a una variante de CD38 humana en donde la Gln en la posición 272 se ha sustituido por Arg, (iii) se une a una variante de CD38 humana en donde la Ser en la posición 274 se ha sustituido por Phe y (iv) se une a una variante de CD38 humana en donde la Thr en la posición 237 se ha sustituido por Ala.
2. El anticuerpo según la reivindicación 1, que tiene un efecto inhibitor sobre la actividad ciclasa de CD38 y un efecto estimulante sobre la actividad hidrolasa de CD38.
3. El anticuerpo según la reivindicación 2, en donde el efecto inhibitor es de al menos 50-66 % en comparación con el efecto inhibitor sobre la actividad ciclasa de CD38 en ausencia de anticuerpo, como se mide en los ensayos del Ejemplo 8.
4. Un anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, cuyo anticuerpo está codificado por un ácido nucleico de cadena pesada humana y de cadena ligera humana que comprende secuencias de nucleótidos en sus regiones variables como se expone en las SEC ID NO: 1 y 26, 6 y 31, 11 y 36, 16 y 41 o 21 y 46, respectivamente.
5. Un anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores que comprende
 - a) una CDR3 de VH que comprende la secuencia como se expone en las SEQ ID NO: 5, 10, 15, 20 o 25,
 - b) una CDR3 de VH que tiene la secuencia expuesta en las SEQ ID NO: 5, 10, 15, 20 o 25, y una CDR3 de VL que tiene la secuencia expuesta en las SEQ ID NO: 30, 35, 40, 45 o 50 o
 - c) SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 30, o SEQ ID NO: 10 y SEQ ID NO: 35, o SEQ ID NO: 15 y SEQ ID NO: 40, o SEQ ID NO: 20 y SEQ ID NO: 45, o SEQ ID NO: 25 y SEQ ID NO: 50 como la CDR3 de VH y CDR3 de VL respectivamente.
6. Un anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el anticuerpo comprende
 - (i) una CDR1 de VH que tiene la secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 3, una CDR2 de VH que tiene la secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 4, una CDR3 de VH que tiene la secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 5, una CDR1 de VL que tiene la secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 28, una CDR2 de VL que tiene la secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 29, una CDR3 de VL que tiene la secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 30,
 - (ii) una CDR1 de VH que tiene la secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 8, una CDR2 de VH que tiene la secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 9, una CDR3 de VH que tiene la secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 10, una CDR1 de VL que tiene la secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 33, una CDR2 de VL que tiene la secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 34, una CDR3 de VL que tiene la secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 35,
 - (iii) una CDR1 de VH que tiene la secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 13, una CDR2 de VH que tiene la secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 14, una CDR3 de VH que tiene la secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 15, una CDR1 de VL que tiene la secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 38, una CDR2 de VL que tiene la secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 39, una CDR3 de VL que tiene la secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 40,
 - (iv) una CDR1 de VH que tiene la secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 18, una CDR2 de VH que tiene la secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 19, una CDR3 de VH que tiene la secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 20, una CDR1 de VL que tiene la secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 43, una CDR2 de VL que tiene la secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 44, una CDR3 de VL que tiene la secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 45 o
 - (v) una CDR1 de VH que tiene la secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 23, una CDR2 de VH que tiene la secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 24, una CDR3 de VH que tiene la secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 25, una CDR1 de VL que tiene la secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 48, una CDR2 de VL que tiene la secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 49, una CDR3 de VL que tiene la secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 50.
7. Un anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende
 - (i) una región VH que comprende la secuencia de las SEQ ID NO: 2, 7, 12, 17 o 22, o
 - (ii) una región VH que tiene al menos 80 % de identidad, tal como 90 %, o 95 %, o 97 %, o 98 %, o 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de la región VH expuesta en las SEQ ID NO: 2, 7, 12, 17 o 22,
 - (iii) una región VL que comprende la secuencia de las SEQ ID NO: 27, 32, 37, 42 o 47 o
 - (iv) una región VL que tiene al menos 80 % de identidad, tal como 90 % o 95 % o 97 % o 98 % o 99 % o 100 % de identidad con una secuencia de región VL seleccionada del grupo que consiste en: las SEQ ID NO: 27, 32, 37, 42 o 47.

8. Un anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende

- (i) una región VH que comprende la secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 2 y una región VL que comprende cualquiera de la secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 27,
- (ii) una región VH que comprende la secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 7 y una región VL que comprende cualquiera de la secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 32,
- (iii) una región VH que comprende la secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 12 y una región VL que comprende cualquiera de la secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 37,
- (iv) una región VH que comprende la secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 17 y una región VL que comprende cualquiera de la secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 42 o
- (v) una región VH que comprende la secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 22 y una región VL que comprende cualquiera de la secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 47.

9. Un anticuerpo aislado que se une a la CD38 humana (SEQ ID NO: 52), en donde el anticuerpo aislado comprende

- (i) una CDR1 de VH que tiene la secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 3, una CDR2 de VH que tiene la secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 4, una CDR3 de VH que tiene la secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 5, una CDR1 de VL que tiene la secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 28, una CDR2 de VL que tiene la secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 29, una CDR3 de VL que tiene la secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 30,
- (ii) una CDR1 de VH que tiene la secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 8, una CDR2 de VH que tiene la secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 9, una CDR3 de VH que tiene la secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 10, una CDR1 de VL que tiene la secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 33, una CDR2 de VL que tiene la secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 34, una CDR3 de VL que tiene la secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 35,
- (iii) una CDR1 de VH que tiene la secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 13, una CDR2 de VH que tiene la secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 14, una CDR3 de VH que tiene la secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 15, una CDR1 de VL que tiene la secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 38, una CDR2 de VL que tiene la secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 39, una CDR3 de VL que tiene la secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 40,
- (iv) una CDR1 de VH que tiene la secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 18, una CDR2 de VH que tiene la secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 19, una CDR3 de VH que tiene la secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 20, una CDR1 de VL que tiene la secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 43, una CDR2 de VL que tiene la secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 44, una CDR3 de VL que tiene la secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 45,
- (v) una CDR1 de VH que tiene la secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 23, una CDR2 de VH que tiene la secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 24, una CDR3 de VH que tiene la secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 25, una CDR1 de VL que tiene la secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 48, una CDR2 de VL que tiene la secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 49, una CDR3 de VL que tiene la secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 50 o
- (vi) una región VH que comprende la secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 2 y una región VL que comprende cualquiera de la secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 27,
- (vii) una región VH que comprende la secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 7 y una región VL que comprende cualquiera de la secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 32,
- (viii) una región VH que comprende la secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 12 y una región VL que comprende cualquiera de la secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 37,
- (ix) una región VH que comprende la secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 17 y una región VL que comprende cualquiera de la secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 42 o
- (x) una región VH que comprende la secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 22 y una región VL que comprende cualquiera de la secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 47.

10. Un anticuerpo aislado según la reivindicación 9, que comprende

- (i) una región VH que comprende la secuencia de las SEQ ID NO: 2, 7, 12, 17 o 22, o
- (ii) una región VH que tiene al menos 80 % de identidad, tal como 90 %, o 95 %, o 97 %, o 98 %, o 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de la región VH expuesta en las SEQ ID NO: 2, 7, 12, 17 o 22,
- (iii) una región VL que comprende la secuencia de las SEQ ID NO: 27, 32, 37, 42 o 47 o
- (iv) una región VL que tiene al menos 80 % de identidad, tal como 90 % o 95 % o 97 % o 98 % o 99 % o 100 % de identidad con una secuencia de región VL seleccionada del grupo que consiste en: las SEQ ID NO: 27, 32, 37, 42 o 47.

11. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el anticuerpo es capaz de inducir citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (CCDA), tal como en células Daudi, preferentemente con un valor de CE_{50} de 5 nM o inferior, por ejemplo, 1 nM o inferior, tal como 0,2 nM o inferior, según lo determinado por el método descrito en el ejemplo 6 en el presente documento.

12. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el anticuerpo comprende una o más de las siguientes características

- 5 (i) no es capaz de inducir citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) en células CHO-CD38,
- (ii) se une a CD38 humana con una K_D de 10^{-8} M o inferior, preferentemente con una K_D de 10^{-9} M o inferior, según lo determinado mediante tecnología de resonancia de plasmón superficial,
- (iii) es un anticuerpo monovalente humano y/o
- 10 (iv) es un anticuerpo de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgD, IgA, IgE o IgM de longitud completa, tal como un anticuerpo IgG1, preferentemente un anticuerpo de IgG1, κ o un anticuerpo de IgM, preferentemente un anticuerpo IgM, κ .

13. Un anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende una o más de las siguientes características

- 15 (i) inhibe la síntesis catalizada por CD38 de GDPPr en al menos 25 %, tal como al menos 30 % después de 90 minutos a una concentración de 3 $\mu\text{g/ml}$ según lo determinado por el método espectrofotométrico descrito en el ejemplo 8 de la memoria descriptiva,
- (ii) inhibe la síntesis catalizada por CD38 de la ADPr en al menos 25 %, tal como al menos 30 % después de 90 minutos a una concentración de 3 $\mu\text{g/ml}$ según lo determinado por el método de HPLC descrito en Munshi et
- 20 al., J. Biol. Chem. 275, 21566-21571 (2000), o
- (iii) estimula la actividad hidrolasa de CD38 en al menos 25 %,
- (iv) estimula la actividad NAD hidrolasa de CD38 en al menos 25 %,
- (v) estimula la actividad ADPr-hidrolasa de CD38 en al menos 25 % y/o
- 25 (vi) inhibe la capacidad de CD38 para catalizar la formación, a través de una reacción de intercambio de bases, de NAADP con una CI_{50} inferior a 0,5 $\mu\text{g/ml}$, tal como inferior a 0,2 $\mu\text{g/ml}$ por el método descrito en el ejemplo 8 de la memoria descriptiva.

14. Un conjugado de anticuerpo-fármaco que comprende un anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el anticuerpo se ha conjugado con un agente citotóxico, un radioisótopo o un fármaco.

15. Un anticuerpo biespecífico que comprende un anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1-13 y una segunda especificidad de unión para una célula efectora humana o un antígeno canceroso.

16. Un ácido nucleico aislado que codifica un anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores.

17. Un vector de expresión que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una o más de las secuencias de aminoácidos según una cualquiera de las reivindicaciones 4-8.

18. Una célula hospedadora recombinante eucariota o procariota que produce un anticuerpo como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1-13.

19. Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1-13, un conjugado de anticuerpo-fármaco según la reivindicación 14, un anticuerpo biespecífico según la reivindicación 15, o un vector de expresión según la reivindicación 17 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

20. El anticuerpo como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1-13 para su uso como un medicamento.

21. Un anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1-13 para su uso en el tratamiento de un trastorno seleccionado de artritis reumatoide, leucemia linfocítica crónica (LLC), leucemia linfoblástica aguda (LLA), leucemia mielógena aguda (LMA) (en adultos), linfoma de células del manto, linfoma folicular, linfoma difuso de linfocitos B grandes y mieloma múltiple.

22. Un método para producir un anticuerpo anti-CD38 de una cualquiera de las reivindicaciones 1-13, comprendiendo dicho método las etapas de

- a) cultivar una célula hospedadora de la reivindicación 18, y
- b) purificar el anticuerpo anti-CD38 de los medios de cultivo.

23. Un método para detectar, en una muestra, la presencia de antígeno CD38, o de una célula que exprese CD38, que comprende:

- poner en contacto la muestra con un anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-13 en condiciones que permitan la formación de
- un complejo entre el anticuerpo y CD38; y
- analizar si se ha formado un complejo.

24. Un kit para detectar, en una muestra, la presencia de antígeno CD38, o de una célula que exprese CD38, comprendiendo el kit un anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-13 e instrucciones para el uso del kit.

5 25. Un anticuerpo antiidiotípico que se une a un anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-13.

Figura 1

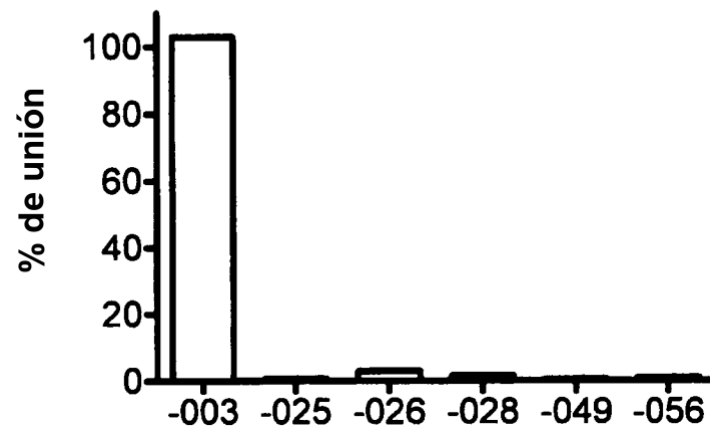


Figura 2

A)

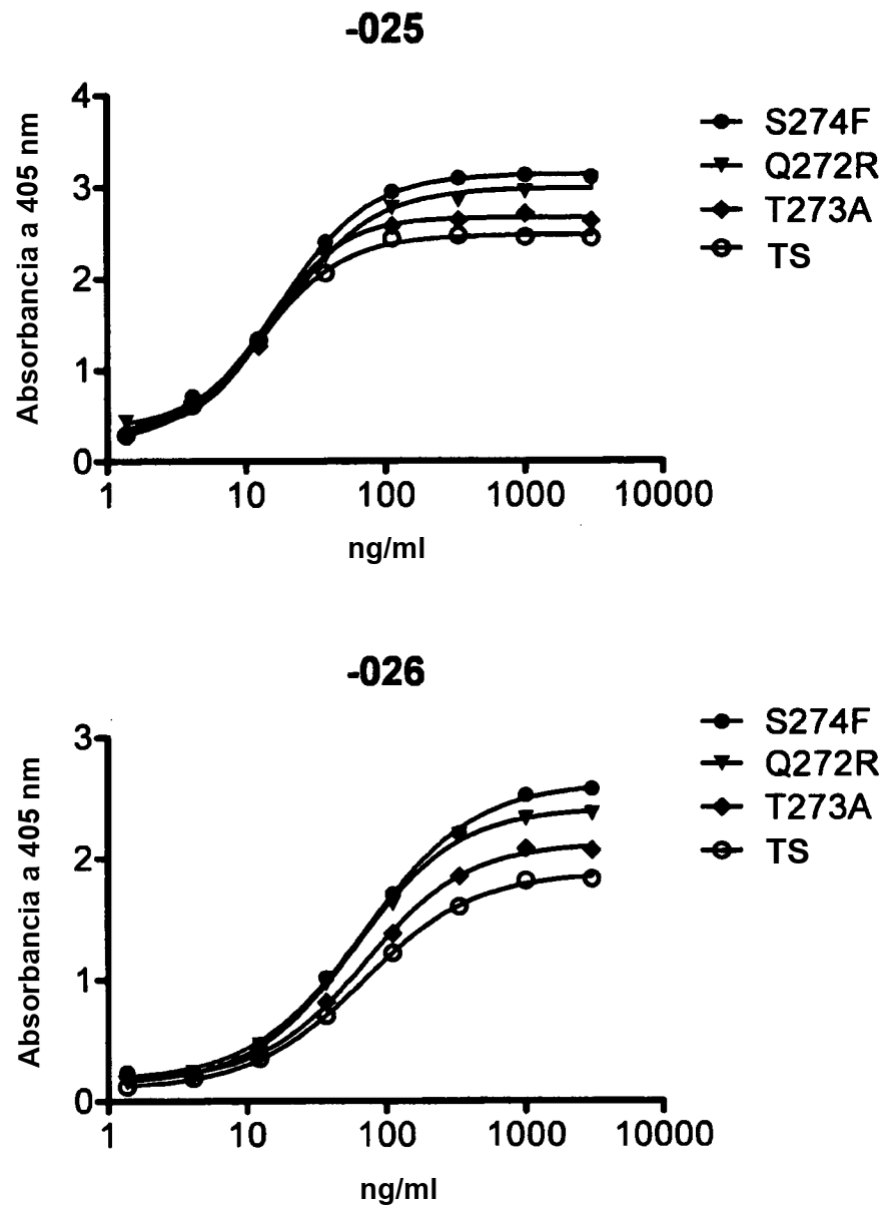


Figura 2 (continuación)

A) (continuación)

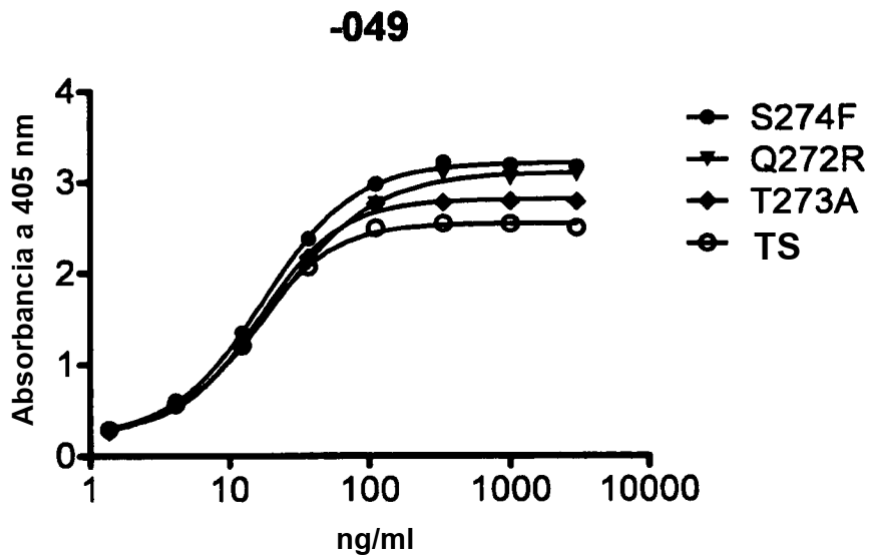
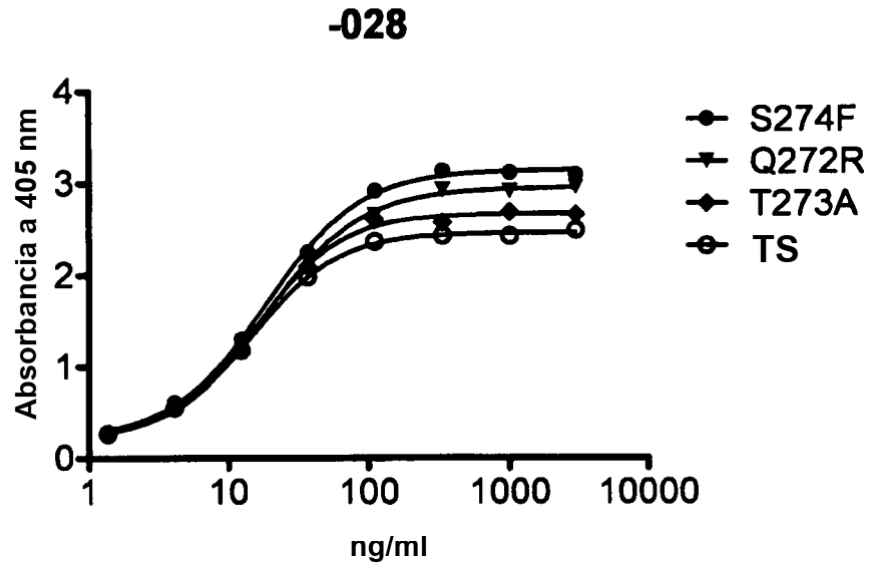


Figura 2 (continuación)

B)

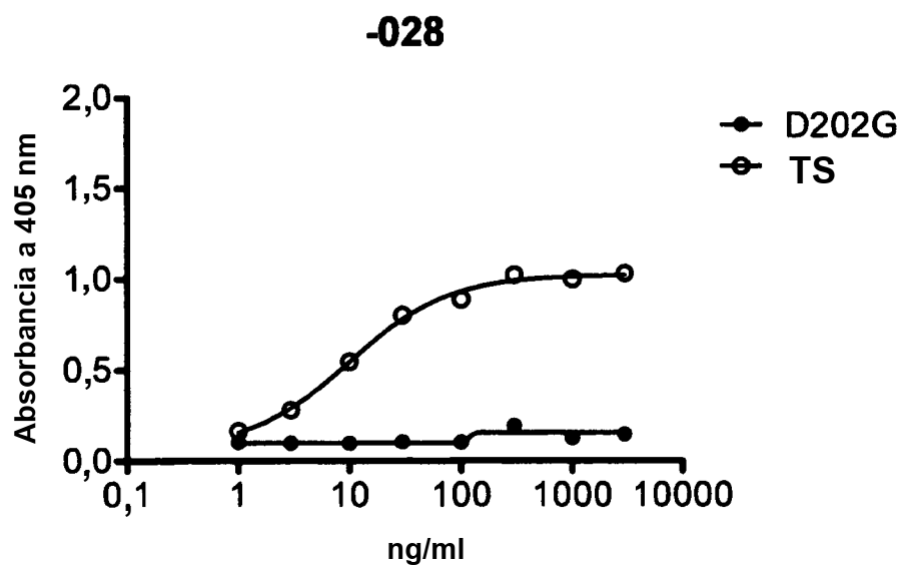
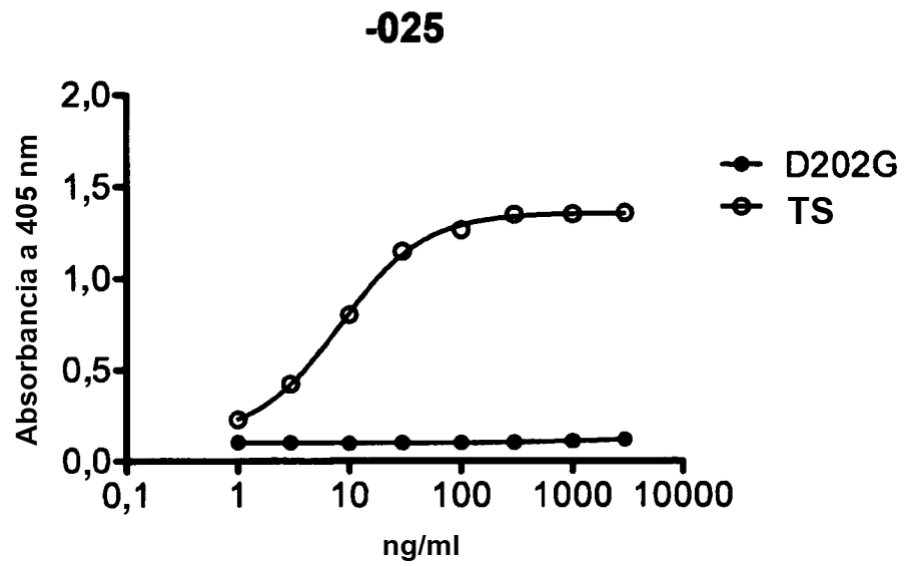


Figura 2 (continuación)

B) (continuación)

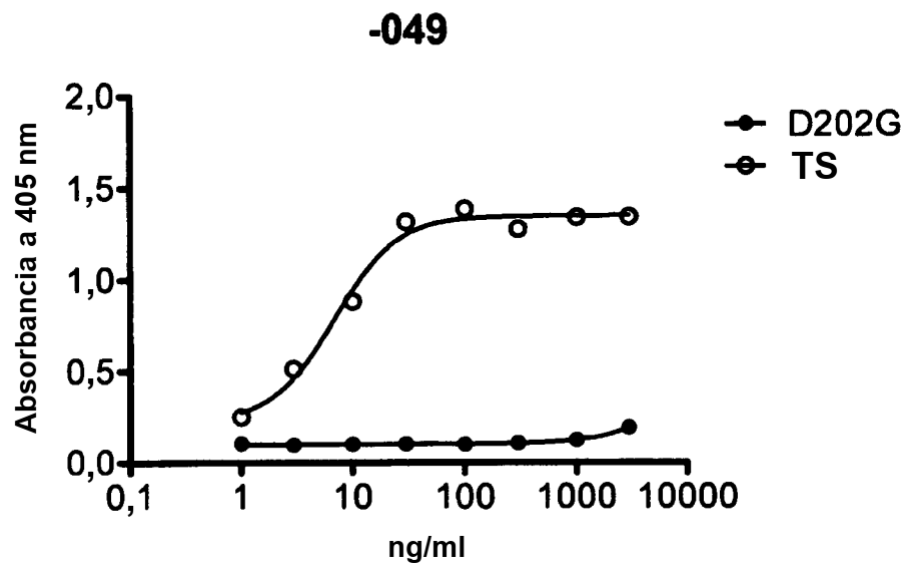


Figura 3

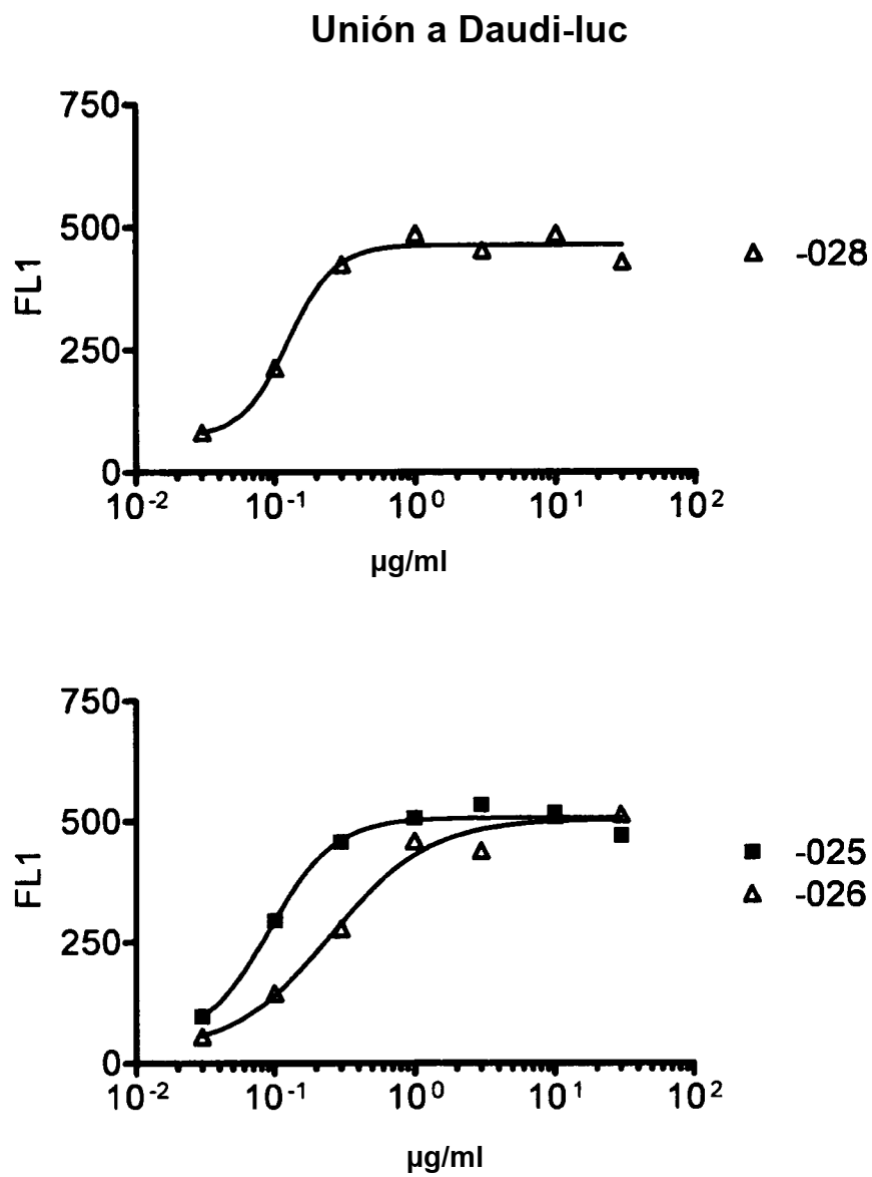


Figura 3 (continuación)

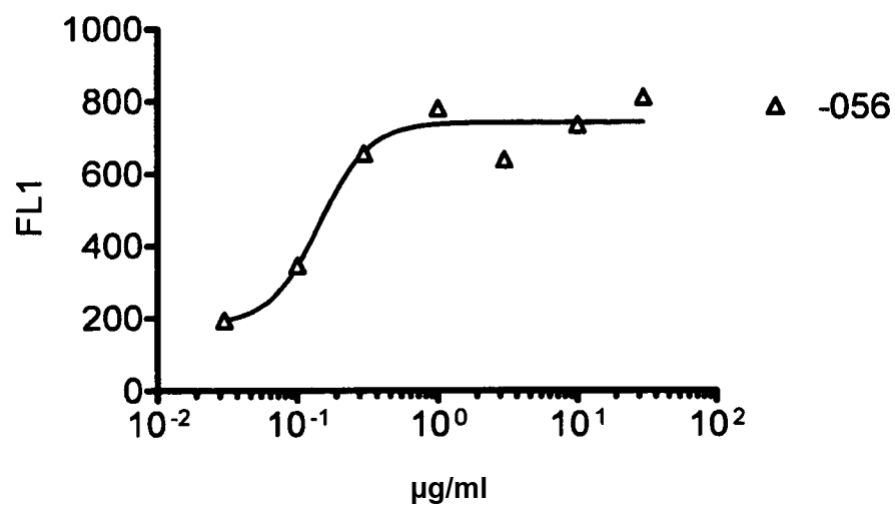
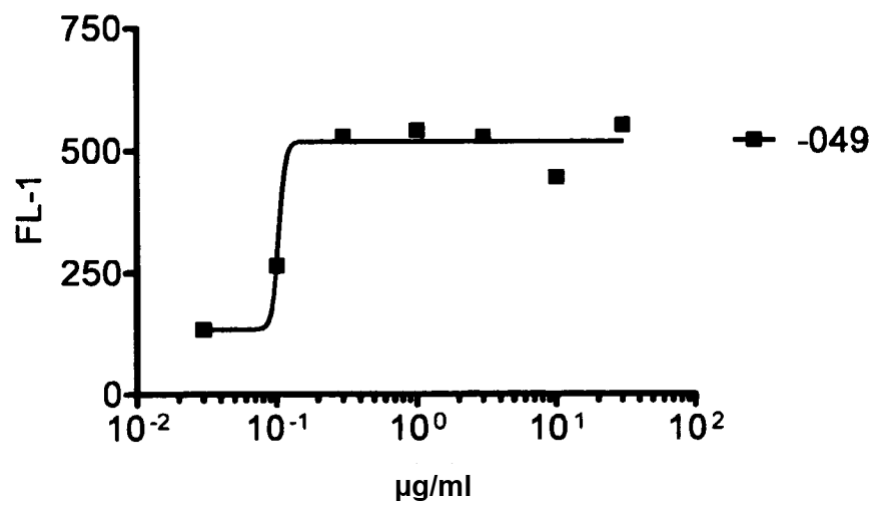


Figura 3 (continuación)

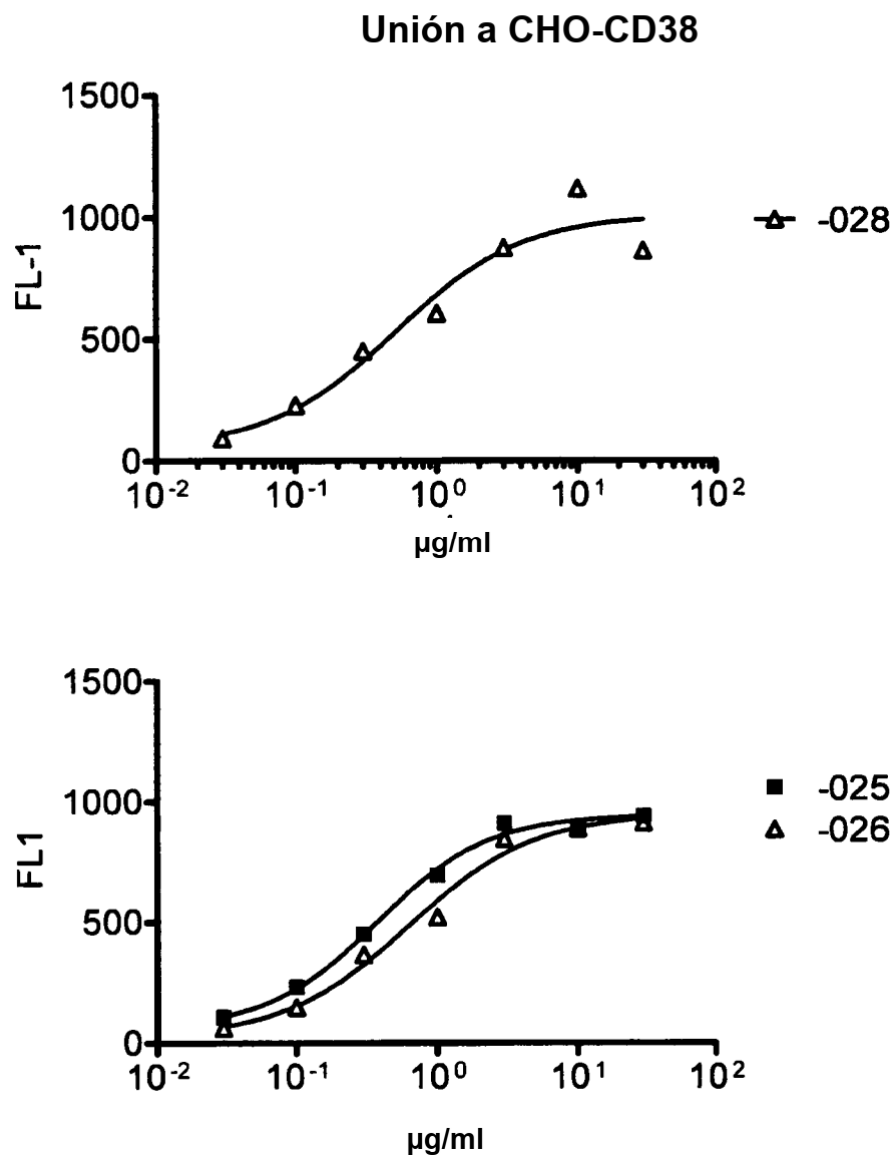


Figura 3 (continuación)

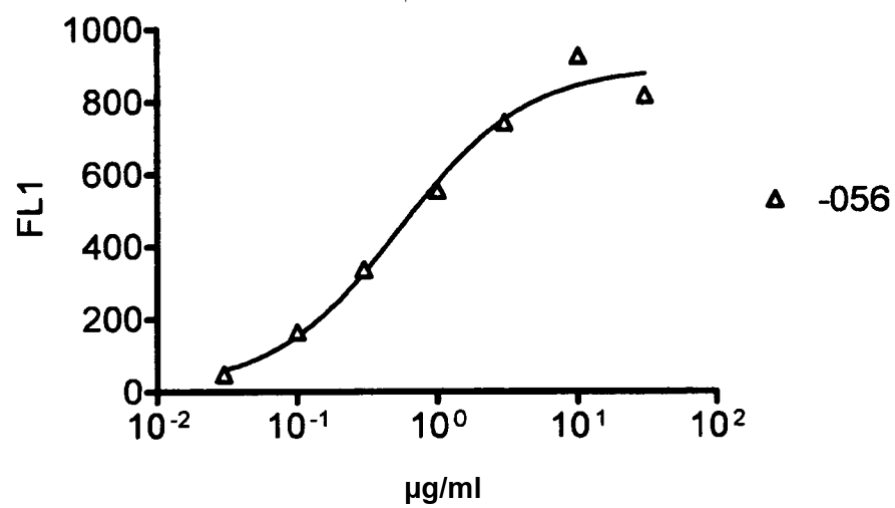
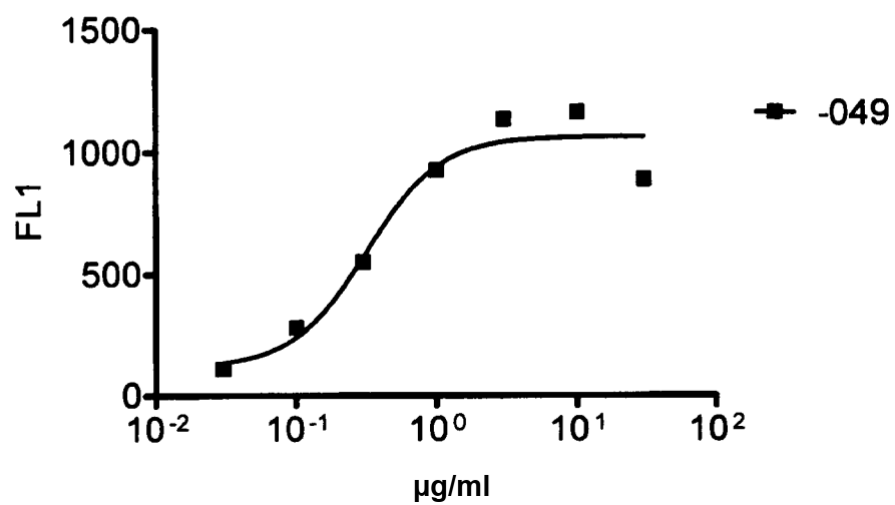


Figura 4

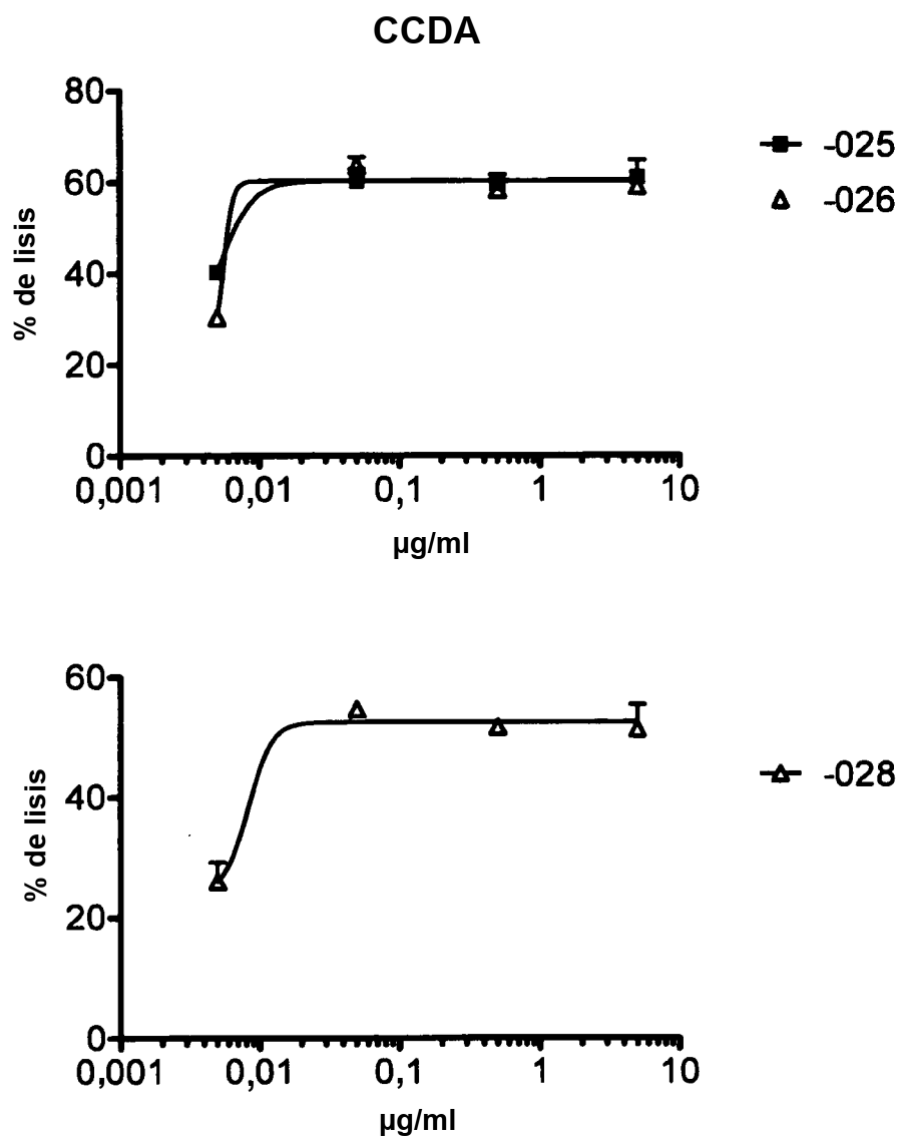


Figura 4 (continuación)

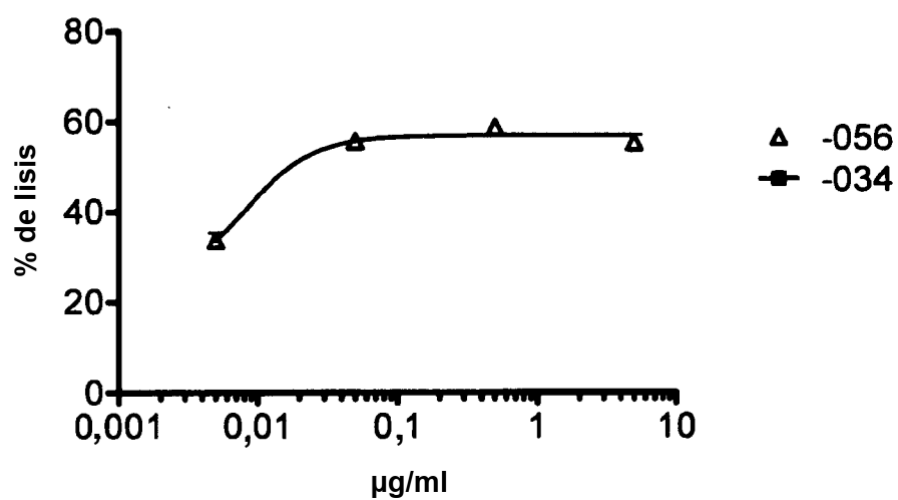
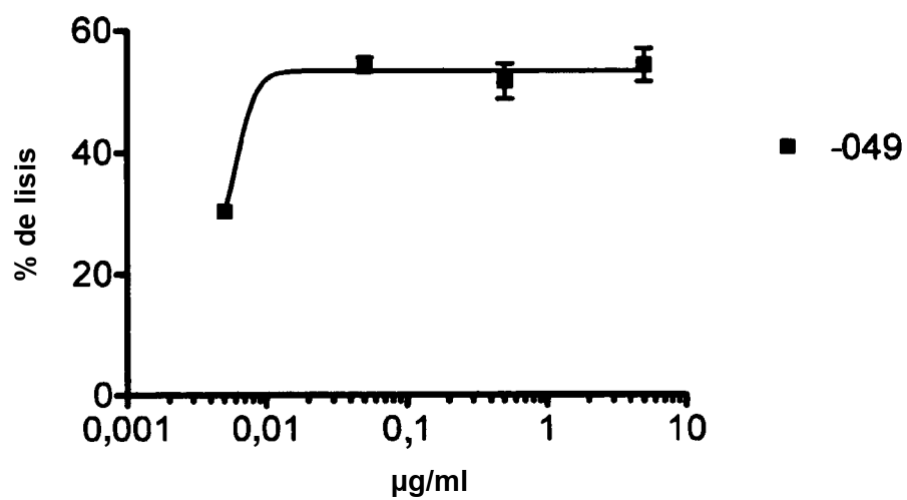


Figura 5

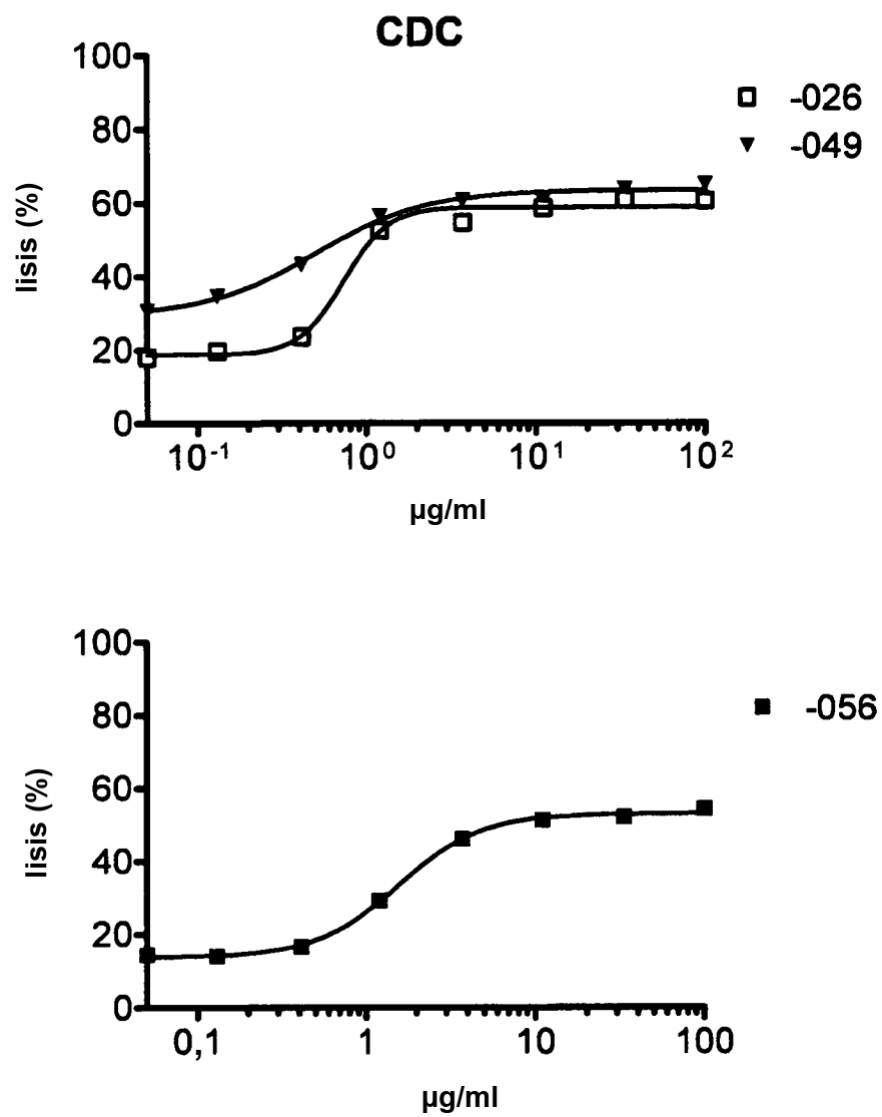


Figura 5 (continuación)

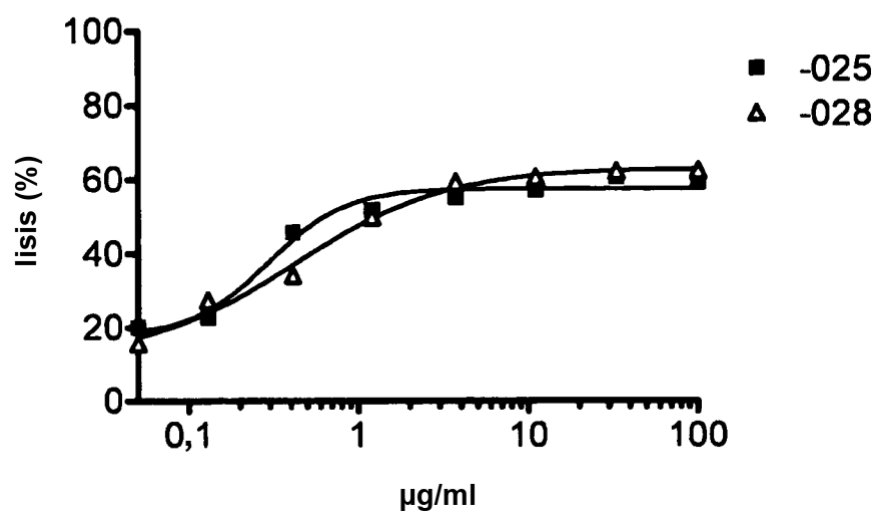
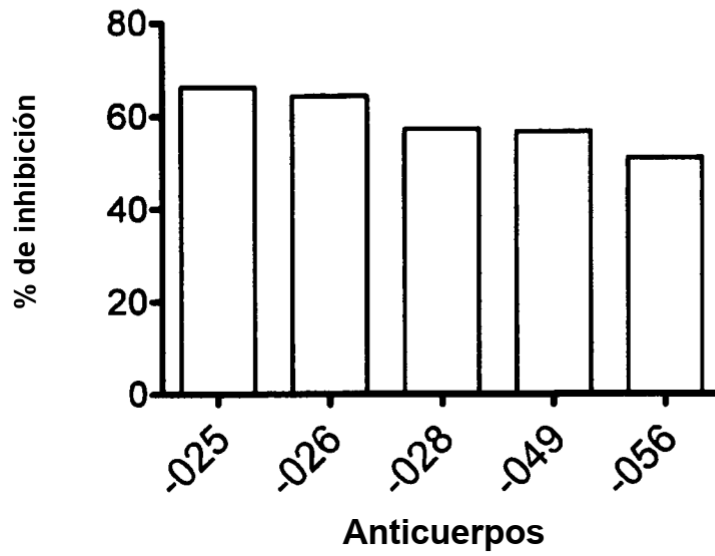


Figura 6

A)



B)

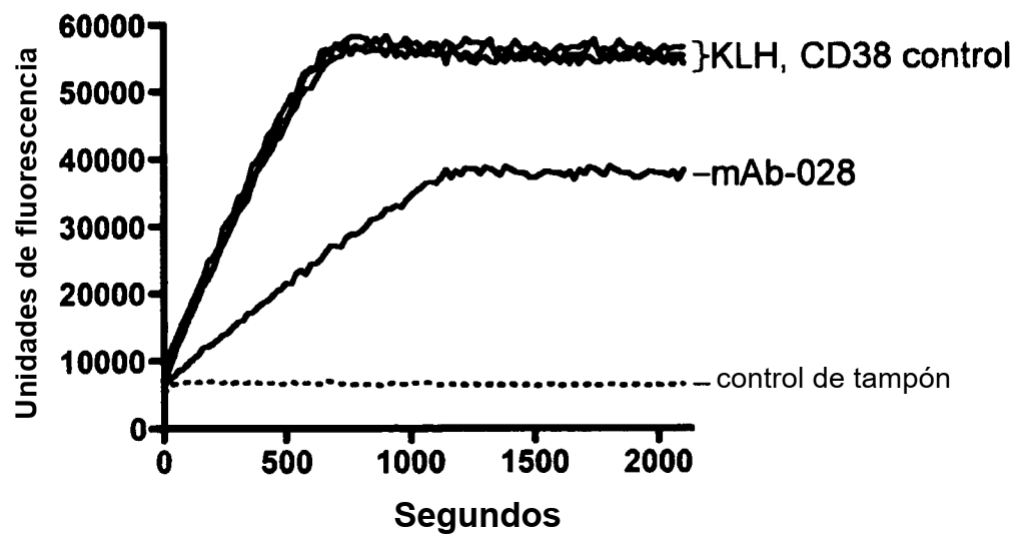
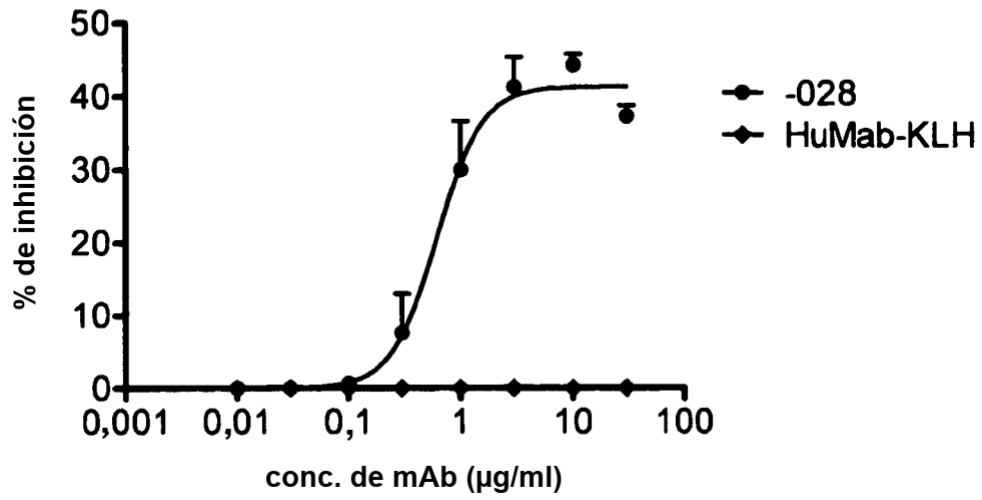


Figura 6 (continuación)

C)



D)

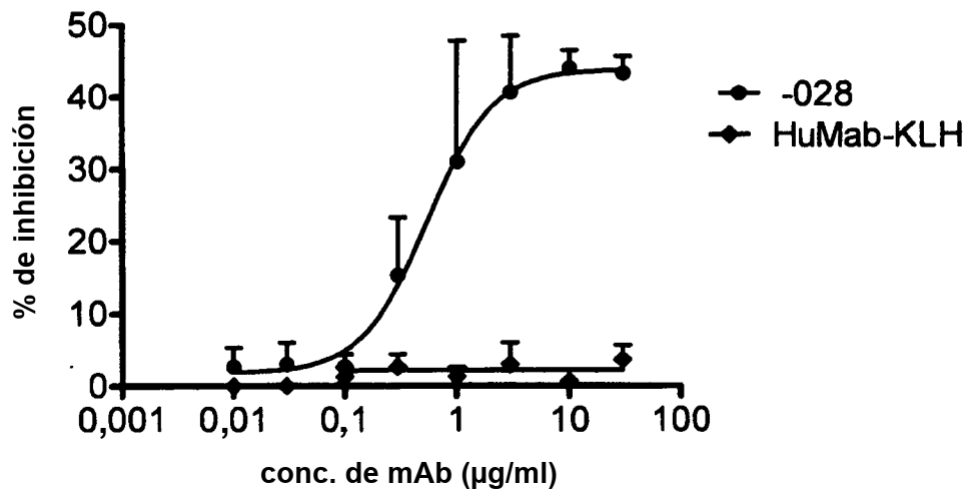
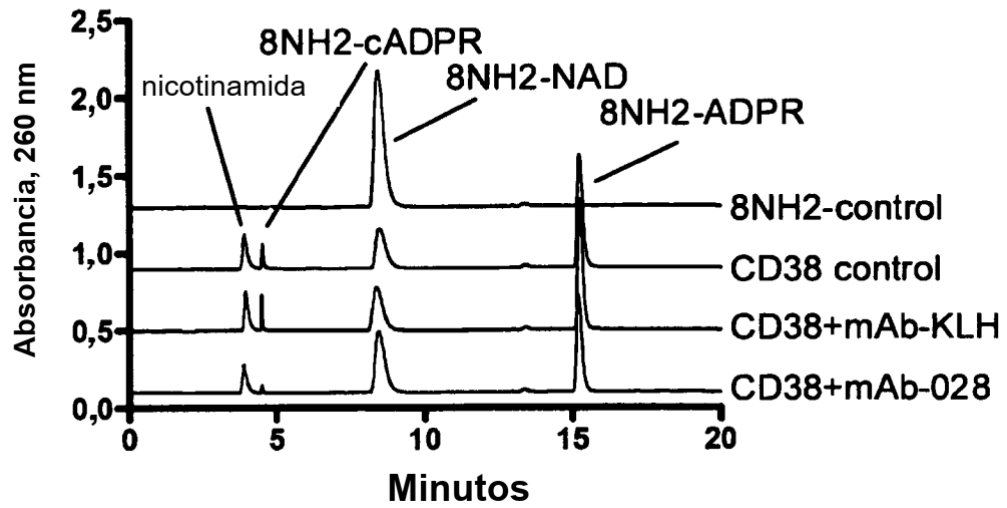


Figura 7

A)



B)

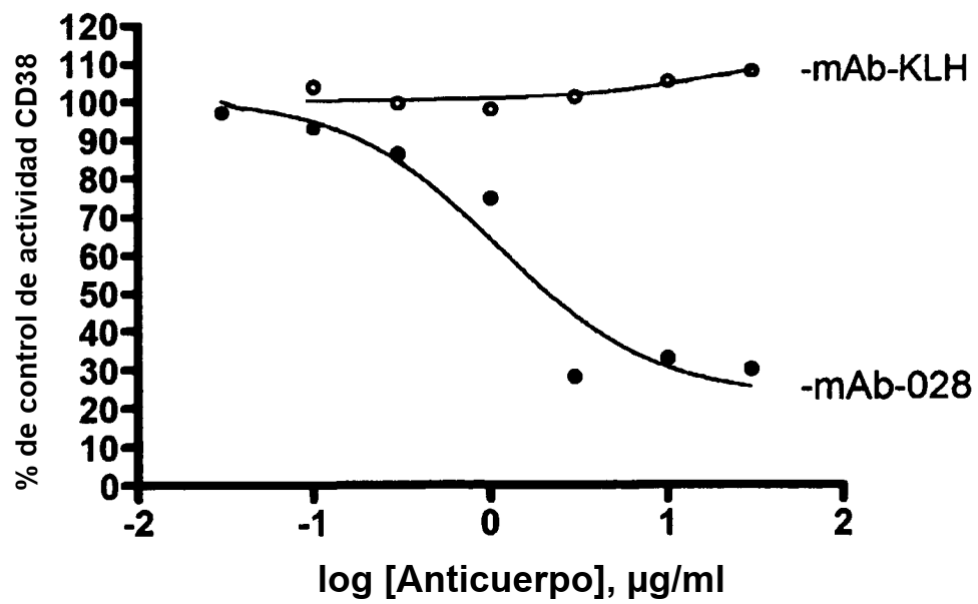


Figura 8

A)

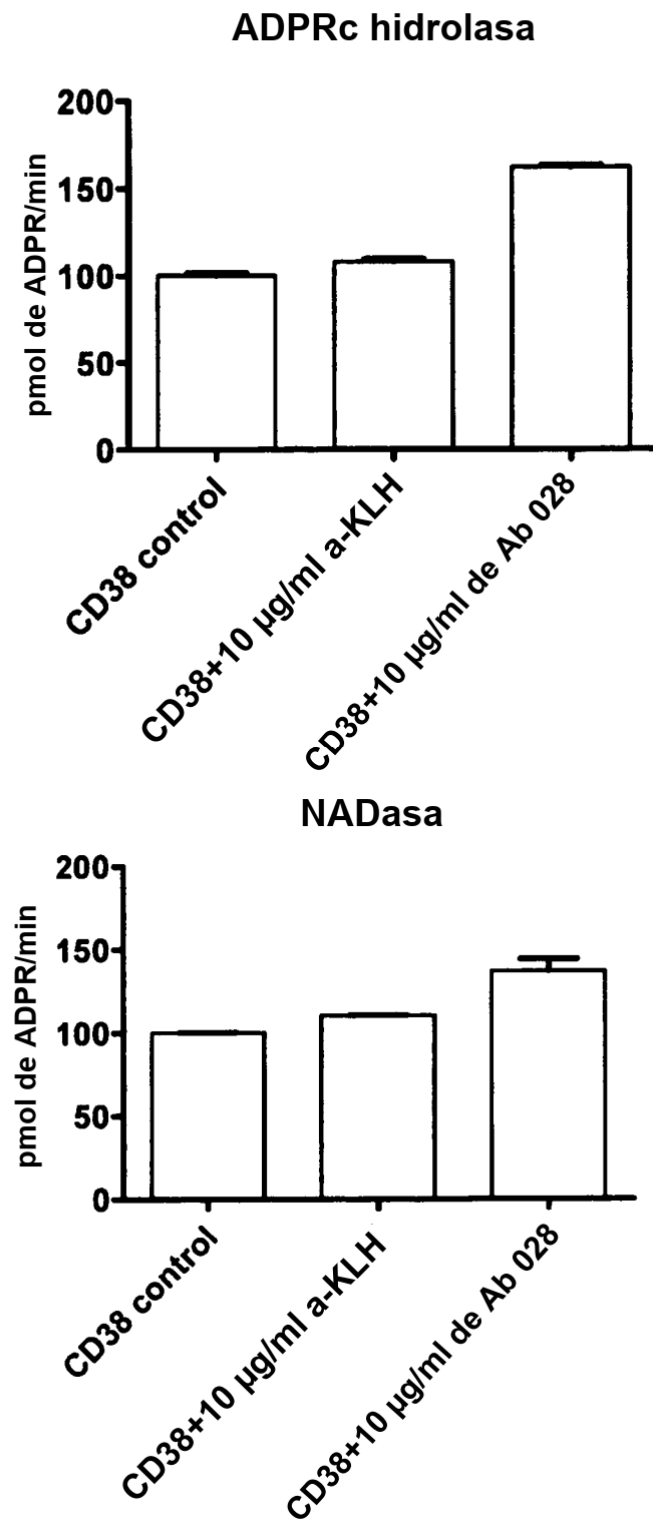
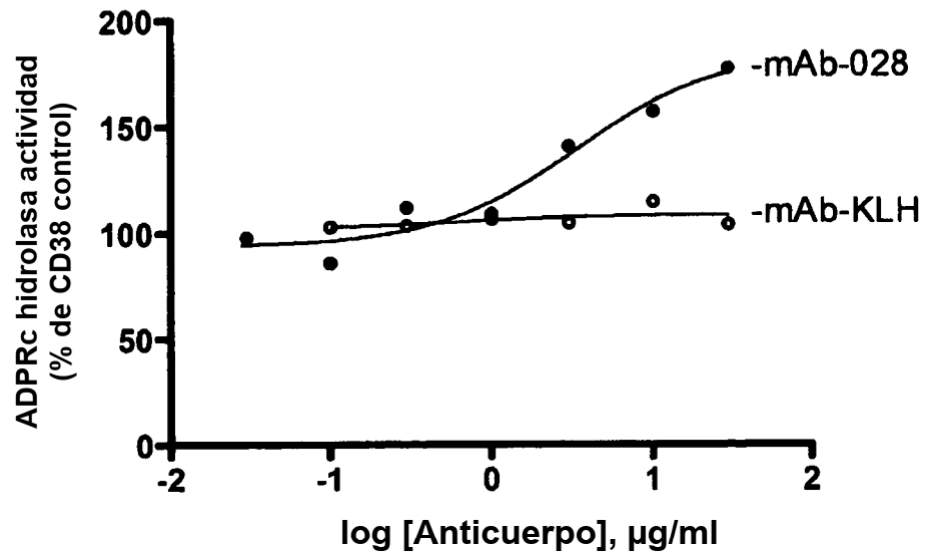


Figura 8 (continuación)

B)



C)

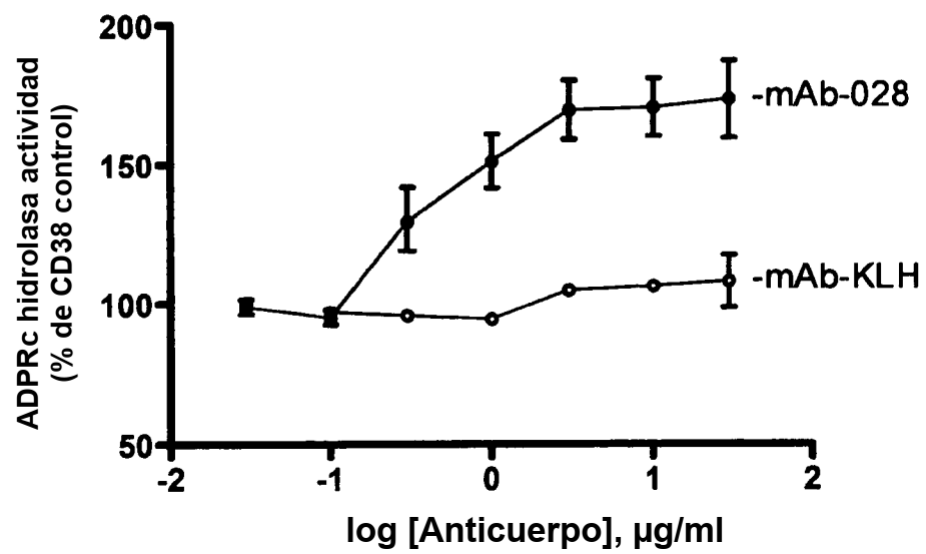


Figura 9

A)

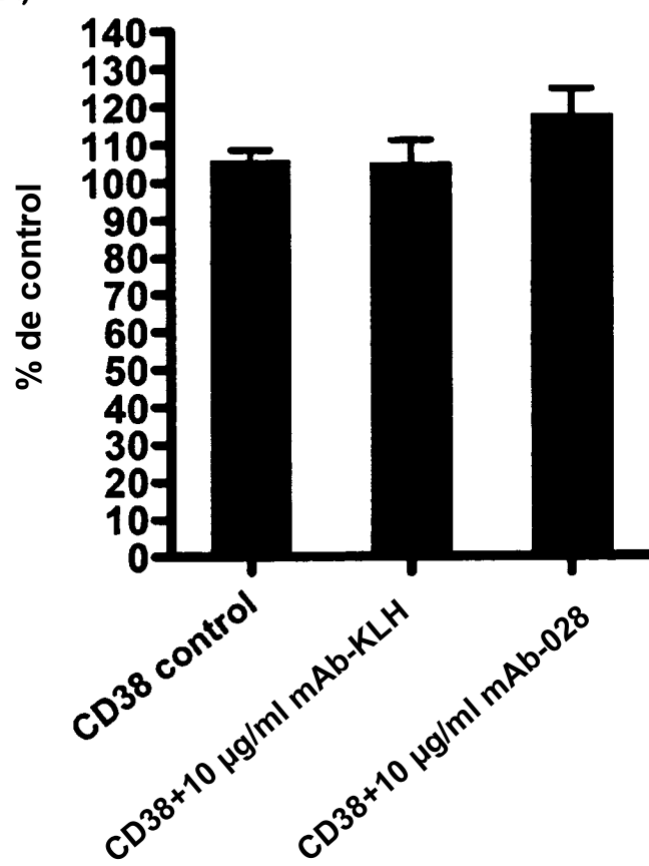


Figura 9 (continuación)

B)

