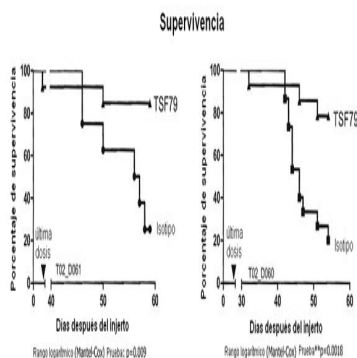


DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES

SOLICITUD FASE NACIONAL - PCT



1	Título de la Invención (200 caracteres o espacios máximos)		
ANTICUERPOS ANTI-CD38			
2	Datos del Solicitante / Titular		
	Nombre:	TAKEDA PHARMACEUTICAL COMPANY LIMITED	Dirección Electrónica: castellanos@castellanosyco.co
	Dirección:	1-1, Doshomachi 4- chome, Chuo-ku, Osaka- shi, Osaka, 541-0045	Nacionalidad/País de constitución: JAPON - OSAKA - CHUO-KU
Identificación:			
☐ CEDULA DE CIUDADANIA ☒ EMPRESA EXTRANJERA ☐ NIT		☐ CEDULA DE EXTRANJERIA ☐ IDENTIFICACION INTERNACIONAL ☐ PASAPORTE	
Número:		2463470800-	
3	Solicitantes		

Apellidos - Nombres o Razón Social		Tipo	Identificación
1.	TAKEDA PHARMACEUTICAL COMPANY LIMITED	EE	2463470800
4	Datos del Inventor		
Nombre:		KATHLEEN ANN ELIAS	Dirección Electrónica: castellanos@castellanosyco.co
Dirección:		Takeda San Francisco, Inc., 285 East Grand Avenue, South San Francisco, CA 94080	Nacionalidad/País de constitución: ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA - CALIFORNIA - SAN FRANCISCO
Identificación: ☐ CEDULA DE CIUDADANIA ☐ EMPRESA EXTRANJERA ☐ NIT ☒ No Aplica ☐ CEDULA DE EXTRANJERIA ☐ IDENTIFICACION INTERNACIONAL ☐ PASAPORTE Número: -			
5	Inventor(es)		
Apellidos - Nombres		Nacionalidad	
1.	ELIAS KATHLEEN ANN	ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA	
2.	LANDES GREGORY	ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA	
3.	SINGH SHWETA	ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA	
4.	KORVER WOUTER	ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA	
5.	DRAKE ANDREW WALLING	ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA	
6.	HAAK-FRENDSCHO MARY	ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA	
7.	SNELL GYORGY PAL	ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA	
8.	BHASKAR VINAY	ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA	

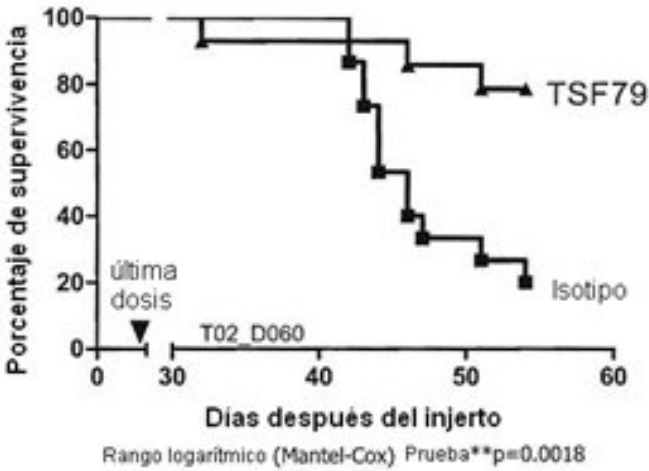
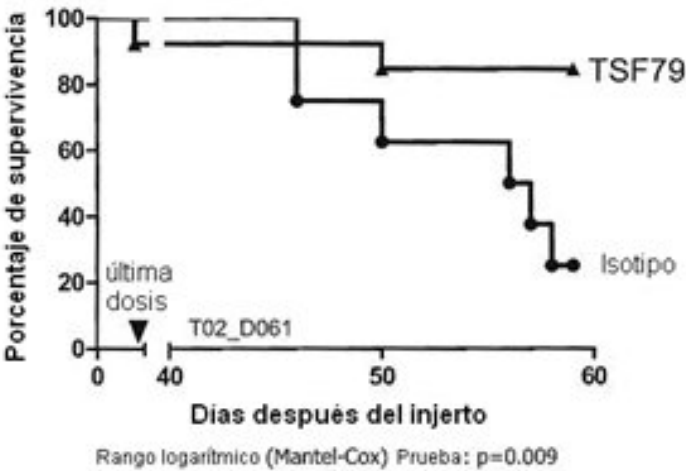
6	Datos Inventor(es)			
	País de Residencia	Departamento/Estado	Ciudad	Dirección
1.	ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA	CALIFORNIA	SAN FRANCISCO	Takeda San Francisco, Inc., 285 East Grand Avenue, South San Francisco, CA 94080
2.	ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA	CALIFORNIA	SAN FRANCISCO	Takeda San Francisco, Inc., 285 East Grand Avenue, South San Francisco, CA 94080
3.	ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA	CALIFORNIA	SAN FRANCISCO	Takeda San Francisco, Inc., 285 East Grand Avenue, South San Francisco, CA 94080
4.	ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA	CALIFORNIA	SAN FRANCISCO	Takeda San Francisco, Inc., 285 East Grand Avenue, South San Francisco, CA 94080
5.	ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA	CALIFORNIA	SAN FRANCISCO	Takeda San Francisco, Inc., 285 East Grand Avenue, South San Francisco, CA 94080
6.	ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA	CALIFORNIA	SAN FRANCISCO	Takeda San Francisco, Inc., 285 East Grand Avenue, South San Francisco, CA 94080

7.	ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA	CALIFORNIA	SAN FRANCISCO	Takeda San Francisco, Inc., 285 East Grand Avenue, South San Francisco, CA 94080
8.	ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA	CALIFORNIA	SAN FRANCISCO	Takeda San Francisco, Inc., 285 East Grand Avenue, South San Francisco, CA 94080
7	Datos del Representante Legal / Apoderado			
Nombre:		MARGARITA CASTELLANOS ABONDANO	Dirección Electrónica:	castellanos@castellanosyco.co
Dirección:		calle 94 A No. 7A 09	Nacionalidad/País de constitución:	COLOMBIA - BOGOTA D.C. - BOGOTA D.C.
Identificación: ☒ CEDULA DE CIUDADANIA ☐ CEDULA DE EXTRANJERIA ☐ EMPRESA EXTRANJERA ☐ IDENTIFICACION INTERNACIONAL ☐ NIT ☐ PASAPORTE Número: 39779654-				
Presentación de Poder				
Año de Radicación				
Número de Radicación				
8	Datos Solicitud: PCT / WO			
Número Solicitud:		PCT/US2011/068235	Fecha Solicitud:	30/12/2011
Número Publicacion:		WO2012/092612	Fecha Publicacion:	05/07/2012
9	Declaraciones de prioridad		☒ SI ☐ NO	
	(33) País de origen	Codigo del país	(31) No. Solicitud	(32) Fecha
1.	ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA	US	61/428,699	30/12/2010
2.	ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA	US	61/470,406	31/03/2011

3.	ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA	US	61/470,382	31/03/2011
4.	ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA	US	61/485,104	11/05/2011

10	Reducción de tasas.
<i>Declaro que carezco de medios económicos para presentar la solicitud de patente.</i> ☐ SI ☒ NO Nota: En caso de ser persona natural y carecer de medios económicos, y por lo tanto, aplique la reducción de tasas a que se refiere la resolución vigente en tarifas, debe firmar la presente solicitud bajo la gravedad de juramento.	
☐ Micro, pequeñas y medianas empresas ☐ Universidades públicas o privadas ☐ Entidades sin ánimo de lucro Debe aportar los documentos que se indican en el numeral 17 de anexos	
11	Documentos Anexos
☒ Reivindicaciones ☒ Descripción ☒ Dibujos y/o Figuras ☒ Resumen ☐ Certificado Depósito Material Biológico ☐ Uso de Conocimiento tradicional ☒ Listado de secuencias ☒ Artes finales 12 x 12 cm ☒ Poderes, si fuere el caso ☐ Copia de la primera solicitud si se reivindica prioridad ☐ Traducción simple de la primera solicitud, si se reivindica prioridad ☒ Otros Anexos	

Supervivencia



ANTICUERPOS ANTI-CD38

ANTECEDENTES

5 La CD38, también conocida como hidrolasa ADP-ribosa cíclica es una glicoproteína transmembrana tipo II con un dominio extracelular del extremo C terminal largo y un dominio citoplásmico del extremo N terminal corto. La CD38 es un miembro de un grupo de enzimas solubles o unidas a membrana relacionada, que comprenden CD157 y ciclase Aplysia ADPR. Esta familia de enzimas tiene la
10 capacidad excepcional de convertir NAD en ADP-ribosa cíclica o ácido nicotínico-adenina dinucleótido fosfato.

 Además, se ha informado que la CD38 está implicada en la movilización de Ca^{2+} y en la transducción de señal mediante la fosforilación de tirosina de
15 diversas moléculas de señalización, incluyendo fosfolipasa $\text{C}\gamma$, ZAP-70, syk y c-cbl. Con base en estas observaciones, se propuso a la CD38 como una molécula de señalización importante en la maduración y activación de células linfoides durante su desarrollo normal.

20 Entre las células hematopoyéticas, se ha atribuido una variedad de efectos funcionales a la señalización mediada por CD38, incluyendo proliferación de linfocitos, liberación de citocina, regulación de B y desarrollo y supervivencia de células mieloides e inducción de maduración de células dendríticas.

25 Sin embargo, el papel exacto de la CD38 en la transducción de señales y la hematopoyesis sigue siendo poco claro, debido a que la mayoría de los estudios de transducción de señales han usado líneas celulares que sobreexpresaban de

forma ectópica la CD38 y anticuerpos monoclonales anti-CD38, que son ligandos no fisiológicos.

El supuesto ligando natural de la CD38 es CD31 (PECAM-1; molécula de adhesión celular endotelial plaquetaria-1). La CD31 es un miembro de 130kD de la superfamilia de inmunoglobulinas que se expresa en la superficie de plaquetas circulantes, neutrófilos, monocitos y linfocitos B vírgenes. Funcionalmente, se cree que la CD31 actúa como una molécula de adhesión. Se ha sugerido que la interacción de la CD38 con la CD31 puede actuar en la promoción de la supervivencia de células de leucemia.

Los modelos animales que no tienen una molécula simple han sido en muchos casos herramientas fundamentales para el entendimiento del papel biológico de la molécula en el animal. La suposición subyacente es que si la proteína ejerce una función no redundante entonces su falta completa dará como resultado la pérdida completa de esa función.

Se generaron ratones con CD38 inactivada. Estos animales muestran una pérdida casi completa de tejido asociada con la actividad de NADasa. Sin embargo, estos animales son viables, lo que lleva a la conclusión de que la CD38 y sus actividades no son necesarias para la vida. Sin embargo, estos ratones presentan un defecto en su inmunidad innata y una respuesta humoral dependiente de las células T reducida.

En contraste con los resultados en ratones, en los humanos existe una fuerte evidencia circunstancial de que la ausencia de la CD38 no es compatible con la vida. El análisis de más de 5,000 muestras de sangre de recién nacidos no logró identificar un único CD38⁻ individual; lo que sugiere que, a diferencia de los

ratones, la CD38 es necesaria para la supervivencia. Por lo tanto, no está claro si las observaciones realizadas en ratones con respecto a la función de la CD38 se pueden extrapolar a humanos.

5 La CD38 se regula por aumento en muchas neoplasias hematopoyéticas y en líneas celulares derivadas de diversas neoplasias hematopoyéticas incluyendo linfoma no de Hodgkin (NHL), linfoma de Burkitt (BL), mieloma múltiple (MM), leucemia linfocítica crónica B (B-CLL), leucemia linfocítica aguda B y T (ALL), linfoma de células T (TCL), leucemia mieloide aguda (AML), leucemia de células
10 pilosas (HCL), linfoma de Hodgkin (HL) y leucemia mieloide crónica (CML). Por otro lado, la mayoría de las células madre pluripotentes primitivas del sistema hematopoyético son CD38⁻ (Figura 1).

Pese al avance reciente en el descubrimiento y desarrollo de agentes
15 anticáncer, muchas formas de cáncer que implican tumores que expresan CD38 siguen teniendo un mal pronóstico. Por lo tanto, existe una necesidad de métodos mejorados para tratar tales formas de cáncer.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

20 En la presente se proporcionan reactivos y métodos para unirse a la CD38 y métodos para el tratamiento de enfermedades asociadas con la CD38 y para detectar la CD38 usando agentes de unión específicos para la CD38 que incluyen anticuerpos específicos para la CD38.

25 Por consiguiente, en algunas modalidades, se describe un anticuerpo aislado específico para la CD38 humana (SEQ ID NO:1) y la CD38 de cinomolgo

(SEQ ID NO:2). Este anticuerpo consta de una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera, donde la región variable de cadena pesada está compuesta por tres regiones determinantes de complementariedad (CDR), HCDR1, HCDR2 y HCDR3 y donde la región variable de cadena ligera también
5 consta de tres CDR, LCDR1, LCDR2 y LCDR3. Las secuencias de las CDR están representadas por: HCDR1 (SEQ ID NO:3), HCDR2 (SEQ ID NO:4), HCDR3 (SEQ ID NO:5), LCDR1 (SEQ ID NO:6), LCDR2 (SEQ ID NO:7) y LCDR3 (SEQ ID NO:8).

10 En otras modalidades, el anticuerpo aislado está compuesto por una región variable de cadena pesada, donde la secuencia de la región variable de cadena pesada está abarcada por la SEQ ID NO:9. En otras modalidades, el anticuerpo aislado está compuesto por una región variable de cadena ligera, donde la secuencia de región variable de cadena ligera está abarcada por la SEQ
15 ID NO:10.

En algunas modalidades, el anticuerpo aislado está compuesto por una región variable de cadena pesada donde la secuencia de la región variable de cadena pesada está abarcada por la SEQ ID NO:9. En otras modalidades, el
20 anticuerpo aislado está compuesto por una región variable de cadena ligera, donde la secuencia de región variable de cadena ligera está abarcada por la SEQ ID NO:10. Esta combinación de región variable de cadena pesada y región variable de cadena ligera se denomina Ab79.

25 En algunas modalidades, el anticuerpo aislado está compuesto por una cadena pesada y una cadena ligera, donde la secuencia de cadena pesada está

abarcada por la SEQ ID NO:11 y la cadena ligera está abarcada por la SEQ ID NO:12.

En algunas modalidades, el anticuerpo aislado incluye un dominio Fc. En otras modalidades, el dominio Fc es un dominio Fc humano. En aun otras 5 modalidades, el dominio Fc es un dominio Fc variante.

En algunas modalidades, se proporciona un ácido nucleico aislado que codifica la cadena pesada de la SEQ ID NO:11. En otras modalidades, se proporciona un ácido nucleico aislado que codifica la cadena ligera de la SEQ ID 10 NO:12.

En algunas modalidades, se proporciona una célula hospedadora, la célula hospedadora contiene el ácido nucleico aislado que codifica la cadena pesada de la SEQ ID NO: 11 y el ácido nucleico asilado que codifica la cadena 15 ligera de la SEQ ID NO: 12.

En algunas modalidades, se proporciona un método para producir el anticuerpo de la invención. El método comprende cultivar una célula hospedadora que contiene el ácido nucleico aislado que codifica la cadena pesada de la SEQ ID 20 NO:11 y el ácido nucleico aislado que codifica la cadena ligera de la SEQ ID NO:12 en condiciones donde se expresa el o los ácidos nucleicos aislados y se produce un anticuerpo.

En algunas modalidades, se describe un anticuerpo aislado específico 25 para la CD38 humana (SEQ ID NO:1) y la CD38 de cinomolgo (SEQ ID NO:2). Este anticuerpo está compuesto por seis CDR, donde cada CDR de este

anticuerpo pueden diferir de la SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7 y SEQ ID NO:8 por 0, 1 o 2 sustituciones de aminoácidos.

En otras modalidades, se describe un anticuerpo aislado específico para la CD38 humana (SEQ ID NO:1) y la CD38 de cinomolgo (SEQ ID NO:2) . Este anticuerpo está compuesto por una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera, donde la región variable de cadena pesada está compuesta por tres regiones determinantes de complementariedad (CDR), HCDR1, HCDR2 y HCDR3 y donde la región variable de cadena ligera también está compuesta por tres CDR, LCDR1, LCDR2 y LCDR3. Las secuencias de las CDR están representadas por: HCDR1 (SEQ ID NO:13), HCDR2 (SEQ ID NO:14), HCDR3 (SEQ ID NO:15), LCDR1 (SEQ ID NO:16), LCDR2 (SEQ ID NO:17) y LCDR3 (SEQ ID NO:18).

En otras modalidades, el anticuerpo aislado está compuesto por una región variable de cadena pesada, donde la secuencia de la región variable de cadena pesada está abarcada por la SEQ ID NO:19. En otras modalidades, el anticuerpo aislado está compuesto por una región variable de cadena ligera, donde la secuencia de región variable de cadena ligera está abarcada por la SEQ ID NO:20.

En algunas modalidades, el anticuerpo aislado está compuesto por una región variable de cadena pesada donde la secuencia de la región variable de cadena pesada está abarcada por la SEQ ID NO:19. En otras modalidades, el anticuerpo aislado está compuesto por una región variable de cadena ligera, donde la secuencia de la región variable de cadena ligera está abarcada por la

SEQ ID NO:20. Esta combinación de región variable de cadena pesada y región variable de cadena ligera se denomina Ab19.

5 En algunas modalidades, el anticuerpo aislado está compuesto por una cadena pesada y una cadena ligera, donde la secuencia de cadena pesada está abarcada por la SEQ ID NO:21 y la cadena ligera está abarcada por la SEQ ID NO:22.

10 En algunas modalidades, se proporciona un ácido nucleico aislado que codifica la cadena pesada de la SEQ ID NO:21. En otras modalidades, se proporciona un ácido nucleico aislado que codifica la cadena ligera de la SEQ ID NO:22.

15 En algunas modalidades, se proporciona una célula hospedadora, la célula hospedadora contiene el ácido nucleico aislado que codifica la cadena pesada de la SEQ ID NO:21 y el ácido nucleico aislado que codifica la cadena ligera de la SEQ ID NO: 22.

20 En algunas modalidades, se proporciona un método para producir el anticuerpo de la invención. El método comprende cultivar una célula hospedadora que contiene el ácido nucleico aislado que codifica la cadena pesada de la SEQ ID NO:21 y el ácido nucleico aislado que codifica la cadena ligera de la SEQ ID NO:22 en condiciones donde se expresa el o los ácidos nucleicos aislados y se produce un anticuerpo.

25 En otras modalidades, se describe un anticuerpo aislado específico para la CD38 humana (SEQ ID NO:1) y la CD38 de cinomolgo (SEQ ID NO:2) . Este anticuerpo está compuesto por seis CDR, donde cada CDR de este anticuerpo

puede diferir de la SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:17 y SEQ ID NO:18 por 0, 1 o 2 sustituciones de aminoácidos.

En algunas modalidades, se proporciona un anticuerpo anti-CD38 aislado que se une específicamente a la CD38 humana (SEQ ID NO:1) y la CD38 de cinomolgo (SEQ ID NO:2), donde el anticuerpo se une a la CD38 humana con una KD de alrededor de 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} o más y se une a la CD38 de cinomolgo con una KD de alrededor de 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} o más.

En algunas modalidades, se proporcionan anticuerpos que compiten con Ab79 y/o Ab19 para unirse a la CD38 humana y/o CD38 de cinomolgo.

Estas y otras modalidades, características y posibles ventajas se volverán aparentes con referencia a la siguiente descripción y dibujos.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La FIG. 1 ilustra el perfil de expresión de la CD38 en células de linaje linfoide, donde una estrella indica una alta expresión de CD38. La expresión de la CD38 ha sido identificada en células pro-B ($CD34^{+}CD19^{+}CD20^{-}$), células B activadas ($CD19^{+}CD20^{+}$), células plasmáticas ($CD138^{+}CD19^{-}CD20^{-}$), células T $CD4^{+}$ y $CD8^{+}$ activadas, células NKT ($CD3^{+}CD56^{+}$) y células NK ($CD56^{+}CD16^{+}$). Además, la expresión de CD38 se encuentra en células progenitoras linfoides ($CD34^{+}CD45RA^{+}CD10^{+}CD19^{-}$) pero no la célula madre linfoide. Además, se observa una expresión de CD38 aumentada en DC maduras y monocitos activados.

La FIG. 2 muestra las secuencias de cadena pesada y ligera de Ab79 y Ab19.

La FIG. 3 ilustra las secuencias de la CD38 humana y de cinomolgo.

5

La FIG. 4 muestra los epítomos de la CD38 humana que se unen a cada uno de los anticuerpos, referencia 1 y 2, Ab19 y Ab79.

La FIG. 5 ilustra la expresión aumentada de la CD38 en PMBC de
10 pacientes con SLE usando un anticuerpo CD38 humano comercialmente disponible.

La FIG. 6 ilustra el cambio porcentual en la cantidad de células en monos
cino 24 horas después de la dosificación.

15

La FIG. 7 muestra la recuperación del agotamiento después de una única dosis de Ab79.

La FIG. 8 muestra los resultados de un único ratón HuSCID en términos
20 de reducciones significativas de todos los isotipos de Ig luego de una única dosis de Ab79.

La FIG. 9 es similar a la Figura 8 para la actividad de agotamiento de Ab79 en ratones HuSCID según se describe en los Ejemplos.

25

La FIG. 10 ilustra la reducción significativa de la respuesta anti-tétano en el modelo HuSCID luego del tratamiento con Ab79.

La Figura 11 muestra, nuevamente en el modelo HuSCID, el aumento significativo en la supervivencia luego del tratamiento con Ab79, esencialmente un tipo de modelo de injerto contra huésped.

5

La Figura 12 ilustra las diferencias en la expresión del antígeno de CD38 en PBMC humanas y de ratón, usando anticuerpos comerciales para cada uno.

La Figura 13 muestra el efecto terapéutico en un marco inflamatorio, al
10 mostrar que el anticuerpo anti-CD38 de ratón sustituto agota las células inmunes de la sangre periférica.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

15 Visión general

Se ha mostrado que el dominio extracelular de la CD38 posee actividad enzimática bifuncional, con actividades tanto de ADP-ribosil ciclasa como de ADP-ribosil hidrolasa. Por lo tanto, la CD38 puede catalizar la conversión de NAD⁺ en
20 cADPR (ciclasa) y puede hidrolizarla adicionalmente a ADP-ribosa (hidrolasa). La cADPR está implicada en la movilización de calcio desde reservas intracelulares que es una actividad de mensajero secundario importante para la proliferación, diferenciación y apoptosis celular.

25 Se ha documentado una expresión aumentada de CD38 en una variedad de enfermedades de origen hematopoyético y se ha descrito como un marcador de pronóstico negativo en la leucemia linfoblástica crónica. Tales enfermedades

incluyen, a modo no taxativo, mieloma múltiple (Jackson et ál. (1988)), leucemia linfoblástica crónica (Moribito et ál. (2001), Jelinek et ál. (2001), Chevalier et ál. (2002), Dürig et ál. (2002)), leucemia linfocítica crónica de células B, leucemia linfoblástica aguda (Keyhani et ál (2000)) incluyendo leucemia linfocítica aguda de
5 células B, macroglobulinemia de Waldenstrom, amiloidosis sistémica primaria, linfoma de células del manto, leucemia pro-linfocítica/mielocítica, leucemia mieloide aguda (Keyhani et ál. (1993)), leucemia mieloide crónica (Marinov et ál. (1993)), linfoma folicular, leucemia de células NK y leucemia de células plasmáticas. Como tal, la CD38 proporciona una diana útil en el tratamiento de
10 enfermedades del sistema hematopoyético.

Diversos anticuerpos anti-CD38 se encuentran en ensayos clínicos para el tratamiento de cánceres asociados con la CD38. Por consiguiente, son útiles los anticuerpos para CD38 con efecto terapéutico y/o aplicaciones de diagnóstico. La
15 invención proporciona dos conjuntos anti-CD38 de CDR que se unen a diferentes epítomos de CD38 y que se unen a las formas tanto humanas como de cinomolgo de CD38 y anticuerpos que contienen estas CDR.

Además, la presente invención muestra que los anticuerpos anti-CD38 se
20 pueden usar en el diagnóstico y/o tratamiento de inflamación y/o trastornos inmunológicos asociados con los linfocitos activados, incluyendo específicamente enfermedades autoinmunes. Como se usa en la presente, la CD38 se expresa en células hematopoyéticas inmaduras, se regula por disminución en células maduras y se vuelve a expresar a altos niveles en células plasmáticas y linfocitos activados.
25 Por ejemplo, la alta expresión de CD38 se observa en células B activadas, células plasmáticas, células T CD4+ activadas, células T CD8+ activadas, células NK, células NKT, células dendríticas maduras (DC) y monocitos activados.

Los hallazgos en la presente son sorprendentes en el sentido que la presencia de autoanticuerpos para CD38 ha estado asociada con la diabetes, tiroiditis autoinmunitaria crónica y enfermedad de Grave (véase Antonelli et ál,
5 Clin. Exp. Immunol. 2001 126:426-431; Mallone et ál., Diabetes 50:752 (2001) y Antonelli et ál., J. Endocrinol. Invest. 27:695-707 (2004), todos incorporados a la presente mediante esta referencia.

Por consiguiente, los anticuerpos de la invención son útiles en el
10 diagnóstico y/o tratamiento de una cantidad de enfermedades, incluyendo, a modo no taxativo, enfermedades autoinmunes como se discute a continuación, incluyendo, a modo no taxativo, lupus eritematoso sistémico (SLE), artritis reumatoide (RA), enfermedad inflamatoria intestinal (IBD) y colitis ulcerosa.

15 Por lo tanto, por ejemplo, se pueden seleccionar los pacientes con un alto contenido de células plasmáticas, tal como pacientes con SLE que presentan un alto contenido de células plasmáticas, así como pacientes con RA que se sabe que responden a las terapias basadas en CD20.

20 Los anticuerpos anti-CD38 terapéuticos de la presente invención se unen a células positivas de CD38, lo que da como resultado el agotamiento de estas células, tal como linfocitos activados, mediante múltiples mecanismos de acción incluyendo, a modo no taxativo, vía de apoptosis, CDC y ADCC, como se resume en la presente, lo que lleva al tratamiento y/o mejora de enfermedades
25 autoinmunes.

Una ventaja, que no se observa en algunos de los anticuerpos anti-CD38 en las pruebas clínicas oncológicas es la capacidad de unirse a la CD38 de cinomolgo, ya que estos primates se pueden usar en las pruebas preclínicas y por lo tanto esto puede llevar a una evaluación temprana de dosificación, toxicidad, eficacia, etc.

Proteínas CD38

Por consiguiente, la presente invención proporciona anticuerpos anti-CD38 aislados que se unen específicamente a la proteína CD38 humana (y, como se describe a continuación, de forma adicional y preferente se unen específicamente a la proteína CD38 de primate). Como se sabe en la técnica, las proteínas CD38 se encuentran en una cantidad de especies. De uso particular en la presente invención son los anticuerpos que se unen a las proteínas CD38 tanto humana como de primates, particularmente primates usados en ensayos clínicos, tales como monos cinomolgo (*Macaca fascicularis*, macaco cangrejero, al que se hace referencia en la presente a veces como "cino"). "CD38 humana" o "antígeno de CD38 humana" se refiere a la proteína de la SEQ ID NO:1 o una fracción funcional, tal como un epítipo, como se describe en la presente. En general, la CD38 posee una cola intracitoplásmica corta, un dominio transmembrana y un dominio extracelular, en modalidades específicas, los anticuerpos de la invención se unen a la parte extracelular de la proteína CD38. "CD38 de cinomolgo" en la presente significa la SEQ ID NO:2, que es 92% idéntica a la CD38 humana.

Los sinónimos de CD38 incluyen, ADP ribosil ciclasa 1, cADPr hidrolasa 1, Cd38-rs1, ADP-ribosa hidrolasa cíclica 1, 1-19 y antígeno NIM-R5.

En algunas modalidades, los anticuerpos Ab79 anti-CD38 de la invención interactúan con la CD38 en una cantidad de residuos de aminoácidos incluyendo K121, F135, Q139, D141, M142, D202, V203, H205, Q236, E239, W241, S274, C275, K276, F284, C287, V288, K289, N290, P291, E292, D293. Como se
5 destaca en la presente, otros anticuerpos que interactúan con estos residuos también son útiles en aplicaciones terapéuticas y de diagnóstico.

En algunas modalidades, los anticuerpos anti-CD38 de la presente invención opcionalmente (y en algunos casos preferentemente) no se unen a otros
10 miembros de la familia de la CD38 tal como CD157. Por ejemplo, las modalidades preferidas de la presente no se unen a la CD157 humana de la SEQ ID NO:23 (acceso Genbank NP_004325).

Anticuerpos

15

La presente invención proporciona anticuerpos anti-CD38, generalmente anticuerpos terapéuticos y/o de diagnóstico, como se describe en la presente. Los anticuerpos útiles en la presente invención pueden adoptar una cantidad de formatos como se describe en la presente, incluyendo anticuerpos tradicionales
20 así como derivados, fragmentos y miméticos de anticuerpos, descritos a continuación. Esencialmente, la invención proporciona estructuras de anticuerpos que contienen un conjunto de 6 CDR como se define en la presente (incluyendo pequeñas cantidades de cambios de aminoácidos como se describe a continuación).

25

Las unidades estructurales de anticuerpos tradicionales típicamente comprenden un tetrámero. Cada tetrámero está compuesto típicamente por dos

pares idénticos de cadenas polipeptídicas, cada par tiene una cadena "ligera" (que típicamente tiene un peso molecular de alrededor de 25 kDa) y una "pesada" (que típicamente tiene un peso molecular de alrededor de 50-70 kDa). Las cadenas ligeras humanas se clasifican como cadenas ligeras kappa y lambda. Las cadenas pesadas se clasifican como mu, delta, gamma, alfa o épsilon, y definen el isotipo del anticuerpo como IgM, IgD, IgG, IgA e IgE, respectivamente. La IgG tiene varias subclases que incluyen, a modo no taxativo, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. IgM tiene subclases que incluyen, a modo no taxativo, IgM1 e IgM2. Por lo tanto, "isotipo" como se usa en la presente significa cualquiera de las subclases de inmunoglobulinas definidas por las características químicas y antigénicas de sus regiones constantes. Los isotipos de inmunoglobulina humana conocidos son IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2, IgM1, IgM2, IgD e IgE. Se debería entender que los anticuerpos terapéuticos también pueden comprender híbridos de isotipos y/o subclases.

15

La porción aminoterminal de cada cadena incluye una región variable de aprox. 100 a 110 o más aminoácidos principalmente responsables del reconocimiento de antígenos. En la región variable, se reúnen tres bucles para cada uno de los dominios V de la cadena pesada y cadena ligera para formar un sitio de unión al antígeno. Cada uno de los bucles se denomina región determinante de complementariedad (en lo sucesivo denominada "CDR") donde la variación en la secuencia de aminoácidos es lo más significativo. "Variable" se refiere al hecho de que algunos segmentos de la región variable difieren extensivamente en secuencia entre los anticuerpos. La variabilidad dentro de la región variable no se distribuye de forma uniforme. Por el contrario, las regiones V consisten en extensiones relativamente invariables denominadas regiones flanqueantes (FR) de 15-30 aminoácidos separadas por regiones más cortas de

variabilidad extrema llamadas "regiones hipervariables", cada una de las cuales tiene 9-15 aminoácidos o más de longitud.

5 Cada VH y VL consta de tres regiones hipervariables ("regiones determinantes de complementariedad", "CDR") y cuatro FR, dispuestas desde el extremo aminoterminal al extremo carboxiterminal en el siguiente orden: FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4.

10 La región hipervariable generalmente abarca residuos de aminoácidos de aproximadamente residuos de aminoácidos 24-34 (LCDR1; "L" indica cadena ligera), 50-56 (LCDR2) y 89-97 (LCDR3) en la región variable de cadena ligera y alrededor de aproximadamente 31-35B (HCDR1; "H" indica cadena pesada), 50-65 (HCDR2) y 95-102 (HCDR3) en la región variable de cadena pesada; Kabat et ál., SEQUENCES OF PROTEINS OF IMMUNOLOGICAL INTEREST, 5ª Ed.
15 Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991) y/o esos residuos que forman un bucle hipervariable (e.j. residuos 26-32 (LCDR1), 50-52 (LCDR2) y 91-96 (LCDR3) en la región variable de cadena ligera y 26-32 (HCDR1), 53-55 (HCDR2) y 96-101 (HCDR3) en la región variable de cadena pesada; Chothia y Lesk (1987) J. Mol. Biol. 196:901-917. A continuación se
20 describen CDR específicas de la invención.

A lo largo de la presente memoria descriptiva, se usa generalmente el sistema de numeración de Kabat cuando se hace referencia a un residuo en el dominio variable (aproximadamente, residuos 1-107 de la región variable de
25 cadena ligera y residuos 1-113 de la región variable de cadena pesada) (por ej., Kabat et ál., anteriormente (1991)), donde se usa el sistema de numeración EU para la región Fc.

Las CDR contribuyen a la formación del sitio de unión al antígeno o, más específicamente, de unión al epítipo de los anticuerpos. "Epítipo" se refiere a un determinante que interactúa con un sitio de unión al antígeno específico en la
5 región variable de una molécula de anticuerpo conocida como parátipo. Los epítipos son agrupaciones de moléculas tales como aminoácidos o cadenas laterales de azúcar y generalmente tienen características estructurales específicas, así como características de carga específicas. Un antígeno simple puede tener más de un epítipo. Por ejemplo, como se muestra en la presente, los
10 dos anticuerpos diferentes a los que se hace referencia en la presente como "Ab19" y "Ab79" se unen a epítipos diferentes en la molécula de CD38.

El epítipo puede comprender residuos de aminoácidos implicados directamente en la unión (también denominado componente inmunodominante del
15 epítipo) y otros residuos de aminoácidos, que no están implicados directamente en la unión, tal como residuos de aminoácidos que se bloquean de forma eficaz por el péptido de unión específica al antígeno; en otras palabras, el residuo de aminoácidos está dentro de la huella del péptido de unión específica al antígeno.

20 Los epítipos pueden ser conformacionales o lineales. Un epítipo conformacional se produce mediante aminoácidos espacialmente yuxtapuestos de diferentes segmentos de la cadena polipeptídica lineal. Un epítipo lineal es uno producido por residuos de aminoácidos adyacentes en una cadena polipeptídica. Los epítipos conformacionales y no conformacionales se pueden distinguir porque
25 la unión al primero, pero no al segundo, se pierde en presencia de solventes desnaturizantes.

Un epítipo típicamente incluye al menos 3 y más generalmente al menos 5 u 8-10 aminoácidos en una conformación espacial excepcional. Los anticuerpos que reconocen el mismo epítipo se pueden verificar en un inmunoensayo simple que muestra la capacidad de un anticuerpo de bloquear la unión de otro anticuerpo a un antígeno diana, por ejemplo "*binning*", como se resume en los Ejemplos. Los estudios de cristalografía de rayos X, como se muestra en los Ejemplos, han identificado los residuos de aminoácidos que se unen a los anticuerpos de la invención (incluyendo Ab19 y Ab79) y de la técnica previa (referencia 1 y referencia 2), como se muestra en la Figura 4.

En la presente invención, Ab79, como se resume en los Ejemplos, interactúa con una cantidad de residuos de aminoácidos de CD38 incluyendo K121, F135, Q139, D141, M142, E239, W241, S274, C275, K276, F284, V288, K289, N290, P291, E292 y D293. Cabe destacar que estos residuos son idénticos tanto en humanos como en monos cian, con la excepción de que S274 es realmente F274 en cian. Estos residuos pueden representar el epítipo inmunodominante y/o los residuos dentro de la huella del péptido de unión específica al antígeno.

En la presente invención, Ab19 se une a un epítipo diferente, incluyendo G91, E103, E1034, D105, Q107, M110, K111, T114, Q115, T148, V192, R194, R195, F196, A199, H228, N229, Q231, E233 y K234. Cabe destacar que estos residuos son idénticos tanto en humanos como en monos cian, con la excepción de que M110 es v110 en cian y A199 es T199 en cian.

Por lo tanto, en algunas modalidades, se pueden usar los anticuerpos que compiten con AB79 y Ab19 mediante la unión a cualquiera de estos epítipos, para tratar enfermedades autoinmunes. Cabe destacar que Ab79 y BM1 tienen un poco

de superposición, por lo tanto los anticuerpos que compiten con Ab79 y no son BM1 son útiles en la presente invención.

Por lo tanto, la presente invención proporciona anticuerpos que se unen a la CD38 tanto humana como de cian e interactúan con al menos 80%, 90%, 95% o 98% de estos residuos. Dicho de otra forma, el área de superficie de la zona de interacción no es mayor al área de estos residuos.

La porción carboxiterminal de cada cadena define una región constante principalmente responsable de la función efectora. Kabat *et ál.* recogieron varias secuencias primarias de la regiones variables de cadenas pesadas y cadenas ligeras. Con base en el grado de conservación de las secuencias, clasificaron las secuencias primarias individuales en la CDR y la región flanqueante e hicieron una lista de las mismas (véase SEQUENCES OF IMMUNOLOGICAL INTEREST, 5ª edición, publicación NIH, No. 91-3242, E.A. Kabat *et ál.*, incorporado en su totalidad mediante esta referencia).

En la subclase IgG de inmunoglobulinas, existen varios dominios de inmunoglobulina en la cadena pesada. "Dominio de inmunoglobulina (Ig)" en la presente significa una región de una inmunoglobulina que tiene una estructura terciaria diferente. De interés para la presente invención son los dominios de cadena pesada incluyendo los dominios constantes de cadena pesada (CH) y los dominios bisagra. En el contexto de anticuerpos de IgG, cada uno de los isotipos de IgG tiene tres regiones CH. Por consiguiente, dominios "CH" en el contexto de IgG son como obra a continuación: "CH1" se refiere a las posiciones 118-220 de acuerdo con el índice EU como en Kabat. "CH2" se refiere a las posiciones 237-

340 de acuerdo con el índice EU como en Kabat y "CH3" se refiere a las posiciones 341-447 de acuerdo con el índice EU como en Kabat.

Otro tipo de dominio de Ig de la cadena pesada es la región bisagra. En la presente, "bisagra" o "región bisagra" o "región bisagra de anticuerpo" o "región bisagra de inmunoglobulina" se refieren al polipéptido flexible que comprende los aminoácidos entre el primer y el segundo dominio constante de un anticuerpo. Desde el punto de vista de la estructura, el dominio CH1 de IgG termina en la posición EU 220 y el dominio CH2 de IgG comienza en la posición EU de residuo 237. Por lo tanto, para la IgG, la bisagra del anticuerpo se define en la presente de forma que incluya las posiciones 221 (D221 en IgG1) a 236 (G236 en IgG1) donde la numeración se hace de acuerdo con el índice EU como en Kabat. En algunas modalidades, por ejemplo, en el contexto de una región Fc, se incluye la bisagra inferior, donde la "bisagra inferior" se refiere generalmente a las posiciones 226 o 230.

Las regiones Fc son de particular interés en la presente invención. "Fc" o "región Fc" o "dominio Fc" como se usan en la presente se refieren al polipéptido que comprende la región constante de un anticuerpo que excluye el primer dominio de inmunoglobulina de región constante y en algunos casos, parte de la bisagra. Por lo tanto, Fc se refiere a los dos últimos dominios de inmunoglobulina de región constante de IgA, IgD e IgG, los últimos tres dominios de inmunoglobulina de región constante de IgE e IgM y el extremo N terminal de la bisagra flexible a estos dominios. Para IgA e IgM, Fc puede incluir la cadena J. Para IgG, el dominio Fc comprende dominios de inmunoglobulina C γ 2 y C γ 3 (C γ 2 y C γ 3) y la región bisagra inferior entre C γ 1 (C γ 1) y C γ 2 (C γ 2). Pese a que los límites de la región Fc pueden variar, la región Fc de cadena pesada de IgG

humana se define generalmente para que comprenda los residuos C226 o P230 en sus extremo carboxiloterminal, donde la enumeración se hace conforme al índice EU como en Kabat. En algunas modalidades, como se describirá con más detalle a continuación, se hacen modificaciones de aminoácidos a la región Fc, por ejemplo para alterar la unión a uno o más receptores de FcγR o al receptor de FcRn.

En algunas modalidades, los anticuerpos son de longitud completa. En la presente "anticuerpo de longitud completa" significa la estructura que constituye la forma biológica natural de un anticuerpo, incluyendo regiones variables y constantes, incluyendo una o más modificaciones como se destaca en la presente.

De manera alternativa, los anticuerpos pueden ser una variedad de estructuras, incluyendo, a modo no taxativo, fragmentos de anticuerpos, anticuerpos monoclonales, anticuerpos biespecíficos, minicuerpos, anticuerpos de dominio, anticuerpos sintéticos (a los que se hace referencia en la presente algunas veces como "miméticos de anticuerpos"), anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, fusiones de anticuerpos (a los que se hace referencia algunas veces como "conjugados de anticuerpos") y fragmentos de cada uno, respectivamente. Las estructuras que aun dependen [sic]

En una modalidad, el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo. Los fragmentos de anticuerpo específicos incluyen, a modo no taxativo, (i) el fragmento Fab que consiste en dominios VL, VH, CL y CH1, (ii) el fragmento Fd que consiste en dominios VH y CH1, (iii) el fragmento Fv que consiste en dominios VL y VH de un único anticuerpo; (iv) el fragmento dAb (Ward *et ál.*, 1989, Nature 341:544-546, incorporado en su totalidad mediante esta referencia) que consta de

una única variable, (v) regiones CDR aisladas, (vi) fragmentos F(ab')₂, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab enlazados (vii) moléculas Fv de cadena sencilla (scFv), donde un dominio VH y un dominio VL están enlazados por un enlace peptídico que permite que los dos dominios se asocien para formar un sitio de unión al antígeno (Bird *et ál.*, 1988, Science 242:423-426, Huston *et ál.*, 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. EUA 85:5879-5883, incorporado en su totalidad mediante esta referencia), (viii) Fv de cadena sencilla biespecífico (WO 03/11161, incorporado en la presente mediante esta referencia) y (ix) "diacuerpos" o "triacuerpos", fragmentos multivalentes o multiespecíficos contruidos mediante fusión genética (Tomlinson *et ál.*, 2000, Methods Enzymol. 326:461-479; WO94/13804; Holliger *et ál.*, 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. EUA 90:6444-6448, todos incorporados en su totalidad mediante esta referencia).

Anticuerpos quiméricos y humanizados

15

En algunas modalidades, el anticuerpo puede ser una mezcla de diferentes especies, por ej., un anticuerpo quimérico y/o un anticuerpo humanizado. Es decir, en la presente invención, los conjuntos de CDR se pueden usar con regiones flanqueantes y constantes diferentes a las descritas específicamente por la secuencia en la presente.

20

En general, tanto "anticuerpos quiméricos" como "anticuerpos humanizados" se refieren a los anticuerpos que combinan regiones de más de una especie. Por ejemplo, "anticuerpo quiméricos" comprenden tradicionalmente una o más regiones variables de un ratón (o rata, en algunos casos) y una o más regiones constantes de un humano. "Anticuerpos humanizados" generalmente se refieren a anticuerpos no humanos a los que se les han intercambiado las

25

regiones flanqueantes de dominio variable para las secuencias encontradas en anticuerpos humanos. Generalmente, en un anticuerpo humanizado, todo el anticuerpo, excepto las CDR, está codificado por un polinucleótido de origen humano o es idéntico a tal anticuerpo excepto dentro de su CDR. Las CDR, alguna o todas las cuales están codificadas por ácidos nucleicos que se originan en un organismo no humano se injertan en el marco de lámina beta de la región variable de un anticuerpo humano para crear un anticuerpo cuya especificidad se determina mediante las CDR injertadas. La creación de tales anticuerpos se describe en, por ej., WO 92/11018, Jones, 1986, Nature 321:522-525, Verhoeyen *et ál.*, 1988, Science 239:1534-1536, todos incorporados en la presente mediante esta referencia. La "retromutación" de residuos flanqueantes aceptores seleccionados a los residuos donantes correspondientes es generalmente necesaria para recuperar la afinidad que se pierde en la construcción injertada inicial (US 5530101; US 5585089; US 5693761; US 5693762; US 6180370; US 5859205; US 5821337; US 6054297; US 6407213, todos incorporados en su totalidad mediante esta referencia). El anticuerpo humanizado óptimamente también comprenderá al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina, típicamente la de una inmunoglobulina humana y por lo tanto típicamente comprenderá una región Fc humana. Los anticuerpo humanizados también se pueden generar usando ratones con un sistema inmune genéticamente modificado. Roque *et ál.*, 2004, Biotechnol. Prog. 20:639-654, incorporados en su totalidad mediante esta referencia. En la técnica se conoce una variedad de técnicas y métodos para humanizar y reorganizar anticuerpos no humanos (véase Tsurushita & Vasquez, 2004, Humanization of Monoclonal Antibodies, Molecular Biology of B Cells, 533-545, Elsevier Science (EUA) y las referencias citadas ahí, todos incorporados en su totalidad mediante esta referencia). Los métodos de humanización incluyen, a modo no taxativo, los métodos descritos en Jones *et ál.*,

1986, Nature 321:522-525; Riechmann et ál.,1988; Nature 332:323-329; Verhoeyen et ál., 1988, Science, 239:1534-1536; Queen et ál., 1989, Proc Natl Acad Sci, EUA 86:10029-33; He et ál., 1998, J. Immunol. 160: 1029-1035; Carter et ál., 1992, Proc Natl Acad Sci EUA 89:4285-9, Presta et ál., 1997, Cancer Res. 57(20):4593-9; Gorman et ál., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. EUA 88:4181-4185; O'Connor et ál., 1998, Protein Eng 11:321-8, todos incorporados en su totalidad mediante esta referencia. La humanización u otros métodos para reducir la inmunogenicidad de regiones variables de anticuerpo no humano puede incluir métodos de revestimiento, como se describe por ejemplo en Roguska et ál., 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. EUA 91:969-973, incorporados en su totalidad mediante esta referencia. En una modalidad, el anticuerpo principal ha sido madurado por afinidad como se conoce en la técnica. Los métodos basados en estructura se pueden emplear para la humanización y maduración por afinidad, por ejemplo como se describe en USSN 11/004,590. Los métodos basados en selección se pueden emplear para humanizar y/o madurar por afinidad las regiones variables de anticuerpo incluyendo, a modo no taxativo, métodos descritos en Wu et ál., 1999, J. Mol. Biol. 294:151-162; Baca et ál., 1997, J. Biol. Chem. 272(16):10678-10684; Rosok et ál., 1996, J. Biol. Chem. 271(37): 22611-22618; Rader et ál., 1998, Proc. Natl. Acad. Sci. EUA 95: 8910-8915; Krauss et ál., 2003, Protein Engineering 16(10):753-759, todos incorporados en su totalidad mediante esta referencia. Otros métodos de humanización pueden implicar el injerto de solo parte de las CDR incluyendo, a modo no taxativo métodos descritos en USSN 09/810,510; Tan et ál., 2002, J. Immunol. 169:1119-1125; De Pascalis et ál., 2002, J. Immunol. 169:3076-3084, todos incorporados en su totalidad mediante esta referencia.

En una modalidad, los anticuerpos de la invención pueden ser anticuerpos multiespecíficos y particularmente anticuerpos biespecíficos, también denominados algunas veces "diacuerpos". Estos son anticuerpos que se unen a dos (o más) antígenos diferentes o diferentes epítomos en el mismo antígeno. Se pueden fabricar diacuerpos en una variedad de formas conocidas en la técnica (Holliger y Winter, 1993, Current Opinion Biotechnol. 4:446-449, incorporados en su totalidad mediante esta referencia), por ej., preparados químicamente o a partir de hibridomas híbridos.

En una modalidad, el anticuerpo es un minicuerpo. Los minicuerpos son proteínas tipo anticuerpo minimizadas que comprenden una scFv unida a un dominio CH3. Hu *et ál.*, 1996, Cancer Res. 56:3055-3061, incorporados en su totalidad mediante esta referencia. En algunos casos, la scFv se puede unir a la región Fc y puede incluir parte de la región bisagra o toda la región.

Los anticuerpos de la presente invención son generalmente aislados o recombinantes. "Aislados", cuando se usa para describir los diversos polipéptidos descritos en la presente, significa un polipéptido que ha sido identificado y separado y/o recuperado desde una célula o cultivo celular del cual se expresó. Generalmente, un polipéptido aislado se preparará por al menos un paso de purificación. Un "anticuerpo aislado" 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 a la CD38 está sustancialmente libre de anticuerpos que unen específicamente antígenos diferentes a la CD38.

Un anticuerpo aislado que se une específicamente a un epítipo, isoforma o variante de la CD38 humana o CD38 de cinomolgo puede, sin embargo, tener reactividad cruzada con otros antígenos relacionados, por ejemplo de otras especies tal como homólogos de la especie de CD38. Además, un anticuerpo
5 aislado puede estar sustancialmente libre de otro material celular y/o productos químicos.

Los anticuerpos monoclonales aislados que tiene diferentes especificidades se pueden combinar en una composición bien definida. Por lo
10 tanto, por ejemplo, el Ab79 y Ab19 se pueden combinar en una única formulación, si se desea.

Los anticuerpos anti-CD38 de la presente invención se unen específicamente a ligandos de CD38 (por ej., las proteínas de CD38 humana y de
15 cinomolgo de la SEQ ID NO: 1 y 2). "Unión específica" o "se une específicamente" o es "específico para" un antígeno particular o un epítipo significa que la unión es perceptiblemente diferente de una interacción no específica. La unión específica se puede medir, por ejemplo, mediante la determinación de la unión de una molécula en comparación con la unión de una molécula de control, que
20 generalmente es una molécula de estructura similar que no tiene actividad de unión. Por ejemplo, la unión específica se puede determinar mediante competición con una molécula de control que es similar a la diana.

La unión específica por un antígeno particular o un epítipo se puede
25 manifestar, por ejemplo, por un anticuerpo que tiene una KD por un antígeno o epítipo de al menos alrededor de 10^{-4} M, al menos alrededor de 10^{-5} M, al menos alrededor de 10^{-6} M, al menos alrededor de 10^{-7} M, al menos alrededor de 10^{-8} M,

al menos alrededor de 10^{-9} M, alternativamente al menos alrededor de 10^{-10} M, al menos alrededor de 10^{-11} M, al menos alrededor de 10^{-12} M, o más, donde la KD se refiere a la constante de disociación de una interacción anticuerpo-antígeno particular. Típicamente, un anticuerpo que se une específicamente a un antígeno
5 tendrá una KD que es 20-, 50-, 100-, 500-, 1000-, 5,000-, 10,000- o más veces mayor para una molécula de control con respecto al antígeno o epítipo.

Además, se puede manifestar la unión específica por un antígeno particular o un epítipo, por ejemplo, mediante un anticuerpo que tiene una KA o
10 Ka para un antígeno o epítipo de al menos 20-, 50-, 100-, 500-, 1000-, 5,000-, 10,000- o más veces mayor para el epítipo con relación a un control, donde KA o Ka se refiere a una constante de asociación de una interacción anticuerpo-antígeno particular.

15 Modificaciones de anticuerpos

La presente invención también proporciona anticuerpos variantes. Es decir, existe una cantidad de modificaciones que se pueden hacer a los anticuerpos de la invención incluyendo, a modo no taxativo, modificaciones de
20 aminoácidos en las CDR (maduración por afinidad), modificaciones de aminoácidos en la región Fc, variantes de glicosilación, modificaciones covalentes de otros tipos, etc.

"Variante" en la presente significa una secuencia de polipéptido que difiere
25 de la de un polipéptido original debido a al menos una modificación de aminoácidos. Las modificaciones de aminoácidos pueden incluir sustituciones, inserciones y eliminaciones, la última se prefiere en muchos casos.

En general, las variantes pueden incluir cualquier cantidad de modificaciones, siempre que la función de la proteína siga estando presente, como se describe en la presente. Es decir, en el caso de variantes de aminoácidos generadas con las CDR de Ab79 o Ab19, por ejemplo, el anticuerpo debería seguir uniéndose específicamente a la CD38 humana y de cinomolgo. De forma similar, si las variantes de aminoácidos se generan con la región Fc, por ejemplo, los anticuerpos variantes deberían mantener las funciones de unión al receptor necesarias para la aplicación o indicación particular del anticuerpo.

10

Sin embargo, en general, se utilizan desde 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 sustituciones de aminoácidos ya que con frecuencia el objetivo es alterar la función con una cantidad mínima de modificaciones. En algunos casos, hay de 1 a 5 modificaciones, donde de 1-2, 1-3 y 1-4 también son útiles en muchas modalidades.

15

Cabe destacar que la cantidad de modificaciones de aminoácidos pueden estar dentro de los dominios funcionales: por ejemplo, puede ser deseable tener de 1-5 modificaciones en la región Fc de proteínas tipo salvaje o genéticamente modificadas, así como de 1 a 5 modificaciones en la región Fv, por ejemplo. Una secuencia de polipéptido variante preferentemente poseerá al menos alrededor de 80%, 85%, 90%, 95% o hasta 98 o 99% de identidad a las secuencias principales (por ej., las regiones variables, las regiones constantes y/o las secuencias de cadena pesada y ligera para Ab79 y/o Ab19). Cabe destacar que dependiendo del tamaño de la secuencia, el porcentaje de identidad dependerá de la cantidad de aminoácidos.

20

25

"Sustitución de aminoácidos" o "sustitución" en la presente significa el
reemplazo de un aminoácido en una posición particular en una secuencia de
polipéptido principal con otro aminoácido. Por ejemplo, la sustitución S100A se
refiere a un polipéptido variante donde la serina en la posición 100 se reemplaza
5 con alanina. "Inserción de aminoácidos" o "inserción" en la presente significa la
adición de un aminoácido en una posición particular en una secuencia de
polipéptido principal. "Eliminación de aminoácidos" o "eliminación" en la presente
significa la remoción de un aminoácido en una posición particular en una
secuencia de polipéptido principal.

10 "Polipéptido principal", "proteína principal", "polipéptido precursor" o
"proteína precursora", como se usan en la presente, significan un polipéptido no
modificado que se modifica posteriormente para generar una variante. En general,
los polipéptidos principales en la presente son Ab79 y Ab19. El polipéptido
principal se puede referir al polipéptido en sí mismo, las composiciones que
15 comprenden el polipéptido principal o la secuencia de aminoácidos que lo
codifican. Por consiguiente, "polipéptido Fc principal", como se usa en la presente,
significa un polipéptido Fc que se modifica para generar una variante y "anticuerpo
principal", como se usa en la presente, significa un anticuerpo que se modifica
para generar un anticuerpo variante.

20

"Tipo salvaje" o "WT" o "natural" en la presente significa una secuencia de
aminoácidos o una secuencia de nucleótidos que se encuentran en la naturaleza,
incluyendo variaciones alélicas. Una proteína WT, polipéptido, anticuerpo,
inmunoglobulina, IgG, etc. tiene una secuencia de aminoácidos o una secuencia
25 de nucleótidos que no ha sido modificada intencionalmente.

"Región Fc variante" en la presente significa una secuencia Fc que difiere de la de una secuencia Fc de tipo salvaje debido a al menos una modificación de aminoácidos. Variante Fc se puede referir al polipéptido Fc en sí mismo, composiciones que comprenden el polipéptido de la variante Fc o la secuencia de aminoácidos.

En algunas modalidades, una o más modificaciones de aminoácidos se realizan en una o más de las CDR del anticuerpo (ya sea Ab79 o Ab19). En general, solo 1 o 2 o 3 aminoácidos se sustituyen en cualquier CDR simple y generalmente no más de desde 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 cambios se hacen dentro de un conjunto de CDR. Sin embargo, cabe destacar que cualquier combinación de no sustituciones, 1, 2 o 3 sustituciones en cualquier CDR se pueden combinar de forma independiente y opcional con cualquier otra sustitución.

En algunos casos, las modificaciones de aminoácidos en las CDR se denominan "maduración por afinidad". Un anticuerpo "madurado por afinidad" es uno que tiene una o más alteraciones en una o más CDR que da como resultado una mejora en la afinidad del anticuerpo por el antígeno, comparado con un anticuerpo principal que no posea esa alteración o alteraciones. En algunos casos, pese a que en raras ocasiones, puede ser deseable disminuir la afinidad de un anticuerpo por su antígeno, pero generalmente esto no se prefiere.

La maduración por afinidad se puede realizar para aumentar la afinidad de unión del anticuerpo por el antígeno en al menos alrededor de 10% a 50-100-150% o más o de 1 a 5 veces en comparación con el anticuerpo "principal". Los anticuerpos madurados por afinidad preferidos tendrán afinidades nanomolares o incluso picomolares por el antígeno diana. Los anticuerpos madurados por

afinidad se producen por procedimientos conocidos. Véase, por ejemplo, Marks et ál., 1992, *Biotechnology* 10:779-783 que describe la maduración por afinidad mediante transposición de dominio de cadena pesada variable (VH) y dominio de cadena ligera (VL) variable. La mutagénesis aleatoria de CDR y/o residuos
5 flanqueantes se describe en: Barbas, et ál. 1994, *Proc. Nat. Acad. Sci, EUA* 91:3809-3813; Shier et ál., 1995, *Gene* 169:147-155; Yelton et ál., 1995, *J. Immunol.* 155:1994-2004; Jackson et ál., 1995, *J. Immunol.* 154(7):3310-9 y Hawkins et ál, 1992, *J. Mol. Biol.* 226:889-896, por ejemplo.

10 De manera alternativa, se pueden hacer modificaciones de aminoácidos en una o más de las CDR de los anticuerpos de la invención que son "silenciosas", por ej., que no alteran significativamente la afinidad del anticuerpo por el antígeno. Estas se pueden hacer por una cantidad de razones incluyendo optimizar la expresión (como se puede hacer para los ácidos nucleicos que codifican los
15 anticuerpos de la invención).

Por lo tanto, se incluyen en la definición de las CDR y anticuerpos de la invención las CDR variantes y anticuerpos; es decir, los anticuerpos de la invención pueden incluir modificaciones de aminoácidos en una o más de las CDR
20 de Ab79 y Ab19. Además, como se destaca a continuación, las modificaciones de aminoácidos también se pueden hacer de forma independiente y opcional en cualquier región fuera de las CDR, incluyendo regiones flanqueantes y constantes.

En algunas modalidades, se describen anticuerpos variantes de Ab79 y
25 Ab19 que son específicos para la CD38 humana (SEQ ID NO:1) y la CD38 de cinomolgo (SEQ ID NO:2). Este anticuerpo está compuesto por seis CDR, donde cada CDR de este anticuerpo puede diferir de la SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4,

SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7 y SEQ ID NO:8 por 0, 1 o 2 sustituciones de aminoácidos. En otras modalidades, el anticuerpo anti-CD38 variante está compuesto por seis CDR, donde cada CDR de este anticuerpo pueden diferir de la SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:17 y SEQ ID NO:18 por 0, 1 o 2 sustituciones de aminoácidos.

En algunas modalidades, los anticuerpos anti-CD38 de la invención están compuestos por un dominio Fc variante. Como se sabe en la técnica, la región Fc de un anticuerpo interactúa con una cantidad de receptores Fc y ligandos, otorgando una serie de importantes capacidades funcionales importantes denominadas funciones efectoras. Estos receptores Fc incluyen, a modo no taxativo, (en humanos) FcγRI (CD64) incluyendo las isoformas FcγRIa, FcγRIb y FcγRIc; FcγRII (CD32), incluyendo las isoformas FcγRIIa (incluyendo los alotipos H131 y R131), FcγRIIb (incluyendo FcγRIIb-1 y FcγRIIb-2) y FcγRIIc; y FcγRIII (CD16), incluyendo las isoformas FcγRIIIa (incluyendo los alotipos V158 y F158, correlacionado con la citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo (ADCC)) y FcγRIIIb (incluyendo los alotipos FcγRIIIb-NA1 y FcγRIIIb-NA2), FcRn (el receptor neonatal), C1q (proteína de complemento implicada en la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC)) y FcRn (el receptor neonatal implicado en la semivida en suero). Las modificaciones adecuadas se pueden hacer en una o más posiciones como se destaca generalmente, por ejemplo, en la solicitud de patente estadounidense 11/841,654 y referencias ahí citadas, US 2004/013210, US 2005/0054832, US 2006/0024298, US 2006/0121032, US 2006/0235208, US 2007/0148170, USSN 12/341,769, patente estadounidense No. 6,737,056, patente estadounidense No. 7,670,600, patente estadounidense No. 6,086,875, todos incorporados expresamente en su totalidad mediante esta referencia y en

particular para las sustituciones de aminoácidos específicas que aumentan la unión a los receptores Fc.

Además de las modificaciones destacadas anteriormente, se pueden
5 realizar otras modificaciones. Por ejemplo, las moléculas se pueden estabilizar mediante la inclusión de puentes disulfuro que enlazan los dominios VH y VL (Reiter, Y. et ál, (1996) Nature Biotech. 14:1239-1245, incorporados en su totalidad mediante esta referencia). Además, existe una variedad de modificaciones covalentes de anticuerpos que se pueden realizar como se destaca
10 a continuación.

Las modificaciones covalentes de anticuerpos se incluyen dentro del alcance de esta invención y generalmente, pero no siempre, se hacen post-traduccionalmente. Por ejemplo, se introducen varios tipos de modificaciones
15 covalentes del anticuerpo a la molécula mediante la reacción de residuos de aminoácidos específicos del anticuerpo con un agente de derivación orgánica que es capaz de reaccionar con cadenas laterales seleccionadas o con los residuos del extremo N- o C-terminales.

20 Los residuos de cisteinilo más comúnmente se hacen reaccionar con α -haloacetatos (y aminos correspondientes) tales como ácido cloroacético o cloroacetamida, para dar derivados de carboximetilo o carboxiamidometilo. Los residuos de cisteinilo también se pueden derivar mediante la reacción con bromotrifluoroacetona, ácido α -bromo- β -(5-imidazoil)propiónico, fosfato de
25 cloroacetilo, N-alquilmaleimidas, disulfuro 3-nitro-2-piridilo, metil 2-piridil disulfuro, p-cloromercuribenzoato, 2-cloromercuri-4-nitrofenol o cloro-7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol y similares.

Los residuos de histidilo se derivan por reacción con dietilpirocarbonato a pH 5.5-7.0 debido a que este agente es relativamente específico para la cadena lateral de histitilo. El bromuro de para-bromofenacilo también es útil; la reacción se realiza preferentemente en cacodilato de sodio 0 M a pH 6.0

Los residuos de lisinilo y del extremo aminoterminal se hacen reaccionar con succínico u otros anhídridos de ácido carboxílico. La derivación con estos agentes tiene el efecto de revertir la carga de los residuos de lisinilo. Otros reactivos adecuados para derivar residuos que contienen alfa-amino incluyen imidoésteres como picolinimidato de metilo, fosfato de piridoxal, piridoxal, cloroborohidruro, ácido trinitrobencenosulfónico, O-metilisourea, 2,4-pentanodiona y reacción catalizada por transaminasa con glioxilato.

Los residuos de arginilo se modifican mediante reacción con uno o varios reactivos convencionales, entre ellos fenilglioxal, 2,3-butanodiona, 1,2-ciclohexanodiona y ninhidrina. La derivación de residuos de arginilo requiere que la reacción se realice en condiciones alcalinas debido a la alta pKa del grupo funcional de guanidina. Además, estos reactivos pueden reaccionar con los grupos de lisina así como el grupo epsilon-amino de arginina.

La modificación específica de los residuos de tirosilo se puede realizar, con interés particular en la introducción de etiquetas espectrales en los residuos de tirosilo mediante reacción con compuestos de diazonio aromático o tetranitrometano. Más comúnmente se usan N-acetilimidizol y tetranitrometano para formar especies de O-acetil tirosilo y derivados de 3-nitro, respectivamente. Los residuos de tirosilo se yodan usando ^{125}I o ^{131}I para preparar proteínas

etiquetadas para usarse en radioinmunoensayos, donde el método de cloramina T descrito anteriormente es adecuado.

Los grupos laterales de carboxilo (aspartilo o glutamilo) se modifican selectivamente mediante reacción con carbodiimidas ($R'-N=C=N-R'$), donde R y R' son grupos alquilo opcionalmente diferentes, tales como 1-ciclohexil-3-(2-morfolinil-4-etil) carbodiimida o 1-etil-3-(4-azonia-4,4-dimetilpentil)carbodiimida. Además, los residuos de aspartilo y glutamina se convierten en residuos de asparaginilo y glutaminilo mediante reacción con iones de amonio.

10

La derivación con agentes bifuncionales es útil para reticular anticuerpos a una superficie o matriz de soporte insoluble en agua para usarse en una variedad de métodos, además de los métodos descritos a continuación. Los agentes de reticulación comúnmente utilizados incluyen, por ej., 1,1-bis(diazoacetil)-2-feniletano, glutaraldehído, ésteres de N-hidroxisuccinimida, por ejemplo, ésteres con ácido 4-azidosalicílico, imidoésteres homobifuncionales, incluyendo ésteres de disuccinimidilo como 3,3'-ditiobis(succinimidilpropionato) y maleimidas bifuncionales como bis-N-maleimido-1,8-octano. Los agentes de derivación como metil-3-[(p-azidofenil)ditio]propioimidato proporcionan intermedios fotoactivables que pueden formar retículos en presencia de luz. De manera alternativa, las matrices reactivas insolubles en agua tales como carbohidratos activados por bromuro de gen de cinomolgo y los sustratos reactivos descritos en patente estadounidense No. 3,969,287; 3,691,016; 4,195,128; 4,247,642; 4,229,537 y 4,330,440, todas incorporadas en su totalidad mediante esta referencia, se emplean para la inmovilización de proteínas.

25

Los residuos de glutamilo y asparaginilo se desaminan frecuentemente a los residuos de glutamilo y aspartilo, respectivamente. De manera alternativa, estos residuos se desaminan en condiciones levemente ácidas. Cualquier forma de estos residuos se encuentra dentro del alcance de la presente invención.

5

Otras modificaciones incluyen hidroxilación de prolina y lisina, fosforilación de grupos hidroxilo de residuos de serilo o treonilo, metilación de los grupos α -amino de las cadenas laterales de lisina, arginina e histidina (T. E. Creighton, Proteins: Structure and Molecular Properties, W. H. Freeman & Co., San Francisco, pp. 79-86 [1983], incorporadas en su totalidad mediante esta referencia) acetilación de la amina del extremo N-terminal y amidación de cualquier grupo carboxilo del extremo C-terminal.

Además, como lo comprenderá los expertos en la técnica, las etiquetas (que incluyen fluorescentes, enzimáticas, magnéticas, radioactivas, etc. se pueden agregar a los anticuerpos (así como las otras composiciones de la invención).

Glicosilación

Otro tipo de modificación covalente son las alteraciones en la glicosilación. En otra modalidad, los anticuerpos descritos en la presente pueden modificarse para incluir una o más glicoformas genéticamente modificadas. "Glicoforma genéticamente modificada", como se usa en la presente, se refiere a una composición de carbohidrato que se une covalentemente al anticuerpo, donde dicha composición de carbohidrato difiere químicamente de la de un anticuerpo principal. Las glicoformas genéticamente modificadas pueden ser útiles con varios fines, incluyendo pero sin limitación a mejora o reducción de función efectora. Una

forma preferida de glicoforma genéticamente modificada es la afucosilación que se ha mostrado que se correlaciona con un aumento en la función de ADCC, supuestamente mediante una unión más firme al receptor FcγRIIIa. En este contexto, "afucosilación" significa que la mayoría del anticuerpo producido en las
5 células hospedadoras está sustancialmente desprovisto de fucosa, por ej., 90-95-98% de los anticuerpos generados no tienen fucosa apreciable como un componente de la resto de carbohidrato del anticuerpo (generalmente unida a N297 en la región Fc). Definido de forma funcional, los anticuerpos afucosilados generalmente presentan una afinidad de al menos 50% o más al receptor
10 FcγRIIIa.

Las glicoformas genéticamente modificadas se pueden generar mediante una variedad de métodos conocidos en la técnica (Umaña *et ál.*, 1999, Nat Biotechnol 17:176-180; Davies *et ál.*, 2001, Biotechnol Bioeng 74:288-294; Shields
15 *et ál.*, 2002, J Biol Chem 277:26733-26740; Shinkawa *et ál.*, 2003, J Biol Chem 278:3466-3473; US 6,602,684; USSN 10/277,370; USSN 10/113,929; PCT WO 00/61739A1; PCT WO 01/29246A1; PCT WO 02/31140A1; PCT WO 02/30954A1, todos incorporados en su totalidad mediante esta referencia; (tecnología Potelligent® [Biowa, Inc., Princeton, NJ]; tecnología de modificación genética de
20 glicosilación GlycoMAb® [Glycart Biotechnology AG, Zurich, Suiza]). Muchas de estas técnicas se basan en el control del nivel de oligosacáridos fucosilados y/o bisecados que están covalentemente unidos a la región Fc, por ejemplo mediante la expresión de una IgG en diversos organismos o líneas celulares, genéticamente modificados o de otra forma (por ejemplo, células CHO Lec-13 o células YB2/0 de
25 hibridoma de ratón, mediante la regulación de enzimas implicadas en la vía de glicosilación (por ejemplo FUT8 [α1,6-fucosiltransferasa] y/o β1-4-N-acetilglucosaminiltransferasa III [GnTIII]), o mediante la modificación de uno o más

carbohidratos luego de que se ha expresado la IgG. Por ejemplo, el "anticuerpo genéticamente modificado con azúcar" o "tecnología SEA" de Seattle Genetics funciona mediante la adición de sacáridos modificados que inhiben la fucosilación durante la producción; véase por ejemplo 20090317869, incorporado en la presente en su totalidad mediante esta referencia. Glicoforma genéticamente modificada se refiere típicamente a los diferentes carbohidratos u oligosacáridos; por lo tanto, un anticuerpo puede incluir una glicoforma genéticamente modificada.

De manera alternativa, la glicoforma genéticamente modificada se puede referir a la variante de IgG que comprende los diferentes carbohidratos u oligosacáridos. Como se sabe en la técnica, los patrones de glicosilación pueden depender tanto de la secuencia de la proteína (por ej., la presencia o ausencia de residuos particulares de aminoácidos de glicosilación, discutidos a continuación) o el organismo o la célula hospedadora donde se produce la proteína. A continuación se discuten sistemas de expresión particulares.

La glicosilación de polipéptidos está típicamente unida a N o unida a O. Unida a N se refiere a la unión del resto de carbohidrato a la cadena lateral de un residuo de asparagina. Las secuencias de tripéptidos asparagina-X-serina y asparagina-X-treonina, donde X es cualquier aminoácido menos prolina, son las secuencias de reconocimiento para la unión enzimática del resto de carbohidrato a la cadena lateral de asparagina. Por lo tanto, la presencia de estas secuencias de tripéptidos en un polipéptido crea un posible sitio de glicosilación. La glicosilación unida a O se refiere a la unión de uno de los azúcares N-acetilgalactosamina, galactosa o xilosa a un ácido hidroxiamino, más comúnmente serina o treonina, pese a que también se puede utilizar 5-hidroxiprolina o 5-hidroxilisina.

La adición de sitios de glicosilación al anticuerpo se logra convenientemente alterando la secuencia de aminoácidos de forma tal que contenga una o más de las secuencias de tripéptidos descritas anteriormente (para los sitios de glicosilación unidos a N). La alteración también se puede
5 realizar mediante la adición de, o sustitución por, uno o más residuos de serina o treonina a la secuencia de inicio (para los sitios de glicosilación unidos a O). Para aclarar, la secuencia de aminoácidos del anticuerpo se altera preferentemente mediante cambios a nivel del ADN, particularmente mediante la mutación del ADN que codifica el polipéptido diana en bases preseleccionadas de forma tal que se
10 generen codones que se traducirán en aminoácidos deseados.

Otro medio para aumentar la cantidad de restos de carbohidratos en el anticuerpo es mediante acoplamiento químico o enzimático de glicósidos a la proteína. Estos procedimientos son ventajosos en el sentido que no requieren la
15 producción de la proteína en una célula hospedadora que tiene capacidades de glicosilación para la glicosilación unida a N- o a O-. Dependiendo del modo de acoplamiento usado, una o más azúcares se pueden unir a (a) arginina e histidina, (b) grupos carboxilo libres, (c) grupos sulfhidrilo libres tales como los de cisteína, (d) grupos hidroxilo libres tales como los de serina, treonina o hidroxiprolina, (e)
20 residuos aromáticos tales como los de fenilalanina, tirosina o triptófano o (f) el grupo amida de glutamina. Estos métodos se describen en WO87/05330 y en Aplin y Wriston, 1981, CRC Crit. Rev. Biochem., pp. 259-306, ambos incorporados en su totalidad mediante esta referencia.

25 La remoción de restos de carbohidrato presente en el anticuerpo de inicio (por ej., post-traduccionalmente) se puede lograr química o enzimáticamente. La desglicosilación química requiere la exposición de la proteína al compuesto de

ácido trifluorometanosulfónico o un compuesto equivalente. Este tratamiento da como resultado la escisión de la mayoría o todos los azúcares con la excepción del azúcar de unión (N-acetilglicosamina o N-acetilgalactosamina) mientras el polipéptido queda intacto. La desglicosilación química es descrita por Hakimuddin *et ál.*, 1987, Arch. Biochem. Biophys. 259:52 y por Edge *et ál.*, 1981, Anal. Biochem. 118:131, ambos incorporados en su totalidad mediante esta referencia. La escisión enzimática de las porciones de carbohidrato en polipéptidos se puede lograr mediante el uso de una variedad de endo- y exo-glicosidasas según lo describen Thotakura *et ál.*, 1987, Meth. Enzymol. 138:350, incorporados en su totalidad mediante esta referencia. La glicosilación en posibles sitios de glicosilación se pueden prevenir mediante el uso del compuesto tunicamicina según lo describen Duskin *et ál.*, 1982, J. Biol. Chem. 257:3105, incorporados en su totalidad mediante esta referencia. La tunicamicina bloquea la formación de los enlaces proteína-N-glicósido.

15

Otro tipo de modificación covalente del anticuerpo comprende el enlace del anticuerpo a diversos polímeros no proteinaceos incluyendo, a modo no taxativo, diversos polioles tales como polietilenglicol, polipropilenglicol o polioxialquilenos, en la manera que se establece en, por ejemplo, 2005-2006 PEG catálogo de Nektar Therapeutics (disponible en el sitio web de Nektar) patentes estadounidenses 4,640,835; 4,496,689; 4,301,144; 4,670,417; 4,791,192 o 4,179,337, todos incorporados en su totalidad mediante esta referencia. Además, tal como se sabe en la técnica, las sustituciones de aminoácidos pueden realizarse en diversas posiciones dentro del anticuerpo para facilitar la adición de polímeros tales como PEG. Véase, por ejemplo, publicación estadounidense No. 2005/0114037A1, incorporada en su totalidad mediante esta referencia.

Modalidades específicas de CDR y región variable

La presente invención proporciona una cantidad de anticuerpos, cada uno con un conjunto específico de CDR (incluyendo, como se destaca anteriormente, algunas sustituciones de aminoácidos). Como se destaca anteriormente, los anticuerpos se pueden definir por conjuntos de 6 CDR, regiones variables o cadenas pesadas y ligeras de longitud completa. Además, como se destaca anteriormente, también se pueden hacer sustituciones de aminoácidos. En general, en el contexto de cambios dentro de las CDR, debido a la longitud relativamente más corta de las CDR, las modificaciones de aminoácidos se describen generalmente en términos de una cantidad de modificaciones de aminoácidos que se pueden hacer. Si bien esto también se puede aplicar a la discusión de la cantidad de modificaciones de aminoácidos que se pueden introducir en secuencias variables, constantes o de longitud completa, además de la cantidad de cambios, también es adecuado definir estos cambios en términos de "porcentaje de identidad". Por lo tanto, como se describe en la presente, los anticuerpos incluidos dentro de la invención son 80, 85, 90, 95, 98 o 99% idénticos a las SEQ ID NO enumeradas en la presente.

En el contexto del anticuerpo Ab79, el conjunto de CDR es como obra a continuación: las tres CDR de la cadena pesada abarcan HCDR1 SEQ ID NO:3 (HCDR1), SEQ ID NO:4 (HCDR2) y SEQ ID NO:5 (HCDR3) y las tres CDR de la cadena ligera abarcan la SEQ ID NO:6 (LCDR1), SEQ ID NO:7 (LCDR2), y SEQ ID NO:8 (LCDR3).

En el contexto de Ab19, el conjunto de CDR es como obra a continuación:
HCDR1 (SEQ ID NO:13), HCDR2 (SEQ ID NO:14) y HCDR3 (SEQ ID NO:15) y
LCDR1 (SEQ ID NO:16), LCDR2 (SEQ ID NO:17) y LCDR3 (SEQ ID NO:18).

5 Específicamente excluidos de la presente invención están los anticuerpos
de la SEQ ID NO: 24 y 25 (las cadenas pesada y ligera de referencia 1) y la SEQ
ID NO: 26 y 27 (las cadenas pesada y ligera de referencia 2). Cabe destacar que
estos anticuerpos no presentan reactividad cruzada con la CD38 de cinomolgo,
discutida a continuación.

10

Los anticuerpos de la invención presentan reactividad cruzada con la
CD38 humana y de cinomolgo y por lo tanto son anticuerpo con reactividad
cruzada con una especie. Un "anticuerpo con reactividad cruzada con una
especie" es un anticuerpo que tiene una afinidad de unión por un antígeno de una
15 primera especie de mamífero que es casi igual a la afinidad de unión por un
homólogo de ese antígeno de una segunda especie de mamífero. La reactividad
cruzada con una especie se puede expresar, por ejemplo, como una proporción de
la KD de un anticuerpo por un antígeno de la primera especie de mamífero sobre
la KD del mismo anticuerpo por el homólogo de ese antígeno de una segunda
20 especie de mamífero donde la proporción es 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 2, 5, 10, 15
hasta 20. De forma alternativa o adicional, un anticuerpo es "de reactividad
cruzada con una especie" cuando muestra eficacia terapéutica o de diagnóstico
cuando se administra a una segunda especie. Por lo tanto, en el presente caso,
los anticuerpos de la invención presentan reactividad cruzada con la CD38 de
25 cinomolgo, muestran una eficacia preclínica cuando se los administran a primates
cinomolgo y por lo tanto se consideran de reactividad cruzada.

En algunas modalidades, se proporcionan anticuerpos que compiten con los anticuerpos de la invención (por ejemplo, con Ab79 y/o Ab19) para unirse a la CD38 humana y/o la CD38 de cinomolgo, pero no son BM1 ni BM2. La competencia por unirse a la CD38 o una porción de CD38 por dos o más anticuerpos anti-CD38 se puede determinar mediante cualquier técnica adecuada conocida en la técnica.

Competencia en el contexto de la presente invención se refiere a cualquier reducción detectablemente significativa en la propensión de un anticuerpo de la invención (por ej., Ab79 o Ab19) a unir su socio de unión particular, por ej., CD38, en presencia del compuesto de prueba. Típicamente, competencia significa una reducción de al menos alrededor de 10-100% en la unión de un anticuerpo de la invención a CD38 en presencia del competidor, según se mide por técnicas estándar tales como ensayos ELISA o Biacore®. Por lo tanto, por ejemplo, es posible establecer criterios para competitividad donde se detecta al menos alrededor de 10% de inhibición relativa o se detecta al menos alrededor de 20% de inhibición relativa antes de considerar a un anticuerpo como suficientemente competitivo. En los casos donde los epítomos que pertenecen a los anticuerpos que compiten se ubican estrechamente unidos en un antígeno, la competición se puede marcar por más de alrededor de 40% de inhibición relativa de unión a CD38 (por ej., al menos alrededor de 45% de inhibición, tal como al menos alrededor de 50% de inhibición, por ejemplo al menos alrededor de 55% de inhibición, tal como al menos alrededor de 60% de inhibición, por ejemplo al menos alrededor de 65% de inhibición, tal como al menos alrededor de 70% de inhibición, por ejemplo al menos alrededor de 75% de inhibición, tal como al menos alrededor de 80% de inhibición, por ejemplo al menos alrededor de 85% de inhibición, tal como al

menos alrededor de 90% de inhibición, por ejemplo al menos alrededor de 95% de inhibición o un nivel mayor de inhibición relativa).

5 En algunos casos, uno o más de los componentes de los ensayos de unión competitiva se etiquetan, como se discute a continuación, en el contexto de aplicaciones de diagnóstico.

10 También puede suceder que la competencia pueda existir entre anticuerpos anti-CD38 con respecto a más de uno de un epítipo de CD38 y/o una porción de CD38, por ej., en un contexto donde las propiedades de unión al anticuerpo de una región particular de la CD38 se retengan en fragmentos de la misma, tal como en el caso de un epítipo lineal bien presentado ubicado en diversos fragmentos analizados o un epítipo conformacional que se presenta en fragmentos de CD38 suficientemente grandes así como en la CD38.

15

El análisis de la competencia típicamente implica una evaluación de la unión inhibidora relativa usando un anticuerpo de la invención, CD38 (ya sea humano o cinomolgo o ambos) y la molécula de prueba. Las moléculas de prueba pueden incluir cualquier molécula, incluyendo otros anticuerpos, pequeñas moléculas, péptidos, etc. Los compuestos se mezclan en cantidades suficientes para hacer una comparación que proporcione información sobre la selectividad y/o especificidad de las moléculas en cuestión con respecto a las otras moléculas presentes.

25 Las cantidades de compuesto de prueba, CD38 y anticuerpos de la invención, pueden ser variadas. Por ejemplo, para las evaluaciones con ELISA alrededor de 5-50 μg (por ej., alrededor de 10-50 μg , alrededor de 20-50 μg ,

alrededor de 5-20 µg, alrededor de 10-20 µg, etc.) del anticuerpo anti-CD38 y/o dianas de CD38 son necesarias para evaluar si la competencia existe. Las condiciones también deberían ser adecuadas para la unión. Típicamente, las condiciones fisiológicas o casi fisiológicas (por ej., temperaturas de alrededor de 5 20-40°C, pH de alrededor de 7-8, etc.) son adecuadas para la unión anti-CD38:CD38.

A menudo la competencia es marcada por una inhibición relativa significativamente mayor que alrededor de 5% según se determina por análisis 10 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 ej., en los casos en que el análisis de competencia se usa para seleccionar o analizar nuevos anticuerpos diseñados con la función deseada de bloquear la unión de otra unión de péptido o molécula a CD38 (por ej., 15 los compañeros de unión naturales de CD38 tal como CD31, también llamado antígeno CD31, EndoCAM, GPIIA, PECAM-1, molécula de adhesión celular endotelial/de plaquetas de anticuerpos anti-CD38 naturales).

En algunas modalidades, el anticuerpo anti-CD38 de la presente invención 20 se une específicamente a uno o más residuos o regiones en la CD38 pero a la vez no tiene reactividad cruzada con otras proteínas con homología a CD38, tal como BST-1 (antígeno de célula estromal de médula ósea 1) y Mo5, también denominado CD157.

25 Típicamente, una falta de reactividad cruzada significa menos de alrededor de 5% de inhibición competitiva relativa entre las moléculas cuando se

evalúan por análisis ELISA y/o FACS usando cantidades suficientes de las moléculas en condiciones de ensayo adecuadas.

Inhibición de actividad de CD38

5

Los anticuerpos descritos pueden ser útiles en el bloqueo de una interacción ligando-receptor o en la inhibición de la interacción de componente de receptor. Los anticuerpos anti-CD38 de la invención pueden ser "bloqueantes" o "neutralizantes". Un "anticuerpo neutralizante" hace referencia a un anticuerpo
10 cuya unión a la CD38 da como resultado en la inhibición de la actividad biológica de la CD38, por ejemplo su capacidad de interactuar con ligandos, actividad enzimática, capacidad de señalización y, en particular, su capacidad de causar linfocitos activados. La inhibición de la actividad biológica de la CD38 se puede evaluar mediante uno o más de varios ensayos in vitro o in vivo estándar
15 conocidos en la técnica (véase ejemplos a continuación).

"Inhibe la unión" o "bloquea la unión" (por ejemplo cuando se hace referencia a la inhibición/bloqueo de la unión de un compañero de unión de la CD38 a la CD38) abarca la inhibición/bloqueo parcial o completo. La
20 inhibición/bloqueo de la unión de un compañero de unión de la CD38 a la CD38 puede reducir o alterar el tipo o nivel normal de señalización celular que ocurre cuando un compañero de unión de la CD38 se une a la CD38 sin inhibición o bloqueo. La inhibición y bloqueo también pretenden incluir cualquier disminución medible en la afinidad de unión de un compañero de unión de la CD38 a la CD38
25 cuando se pone en contacto con un anticuerpo anti-CD38, en comparación con el ligando que no está en contacto con un anticuerpo anti-CD38, por ejemplo un

bloqueo de la unión de un compañero de unión de la CD38 a la CD38 en al menos alrededor de 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 99% o 100%.

Los anticuerpos anti-CD38 descritos también pueden inhibir el crecimiento celular. "Inhibe el crecimiento" 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 una inhibición de crecimiento de un cultivo celular en al menos alrededor de 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 99%, o 100%.

En algunas modalidades, los anticuerpos anti-CD38 son capaces de agotar los linfocitos activados y las células plasmáticas. "Agotamiento" en este contexto significa una disminución medible en los niveles en suero (por ejemplo como se analizan en monos cian) de linfocitos activados y/o células plasmáticas en comparación con animales no tratados. En general, se observan los agotamientos de al menos alrededor de 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 99% o 100%. Como se muestra a continuación en los ejemplos, además, una ventaja particular que muestran los anticuerpos de la presente invención es la capacidad de recuperación de estas células luego de la dosificación; es decir, como se sabe para algunos tratamientos (por ejemplo con anticuerpos anti-CD20, por ejemplo), agotamiento celular puede durar por períodos extensos de tiempo, causando efectos colaterales no deseados. Como se muestra en la presente, se pueden recuperar los efectos en los linfocitos activados y/o células plasmáticas.

Métodos para producir los anticuerpos de la invención

La presente invención proporciona además métodos para producir los anticuerpos anti-CD38 descritos. Estos métodos abarcan el cultivo de una célula hospedadora que contiene uno o más ácidos nucleicos aislados que codifican los anticuerpos de la invención. Como lo comprenderán los expertos en la técnica, esto se puede hacer de varias formas, dependiendo de la naturaleza del anticuerpo. En algunas modalidades, en el caso en el que los anticuerpos de la invención son anticuerpos tradicionales de longitud completa, por ejemplo, una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera en condiciones tales que se produzca un anticuerpo y que se pueda aislar.

En general, se proporcionan ácidos nucleicos que codifican los anticuerpos de la invención. Tales polinucleótidos codifican tanto las regiones variables como las constantes de cada una de las cadenas pesada y ligera, pese a que la presente invención también contempla otras combinaciones de acuerdo con las composiciones descritas en la presente. La presente invención también contempla fragmentos de oligonucleótidos derivados de las secuencias de polinucleótidos y ácidos nucleicos descritas complementarias a estos polinucleótidos.

20

Los polinucleótidos pueden estar en la forma de ARN o ADN. Los polinucleótidos en forma de ADN, ADNc, ADN genómico, análogos de ácido nucleico y ADN sintético están dentro del alcance de la presente invención. El ADN puede ser de doble cadena o de cadena simple y, en caso de ser de cadena simple, puede ser la cadena (sentido) de codificación o la cadena (antisentido) de no codificación. La secuencia de codificación que codifica el polipéptido puede ser idéntica a la secuencia de codificación proporcionada en la presente o puede ser

25

una secuencia de codificación diferente; dicha secuencia, como resultado de la redundancia o degeneración del código genético, codifica los mismos polipéptidos que el ADN proporcionado en la presente.

5 En algunas modalidades, el o los ácidos nucleicos que codifican los anticuerpos de la invención se incorporan a vectores de expresión, que pueden ser extracromosales o se pueden diseñar para integrarse en el genoma de la célula hospedadora en la cual se introdujo. Los vectores de expresión pueden contener cualquier cantidad de secuencias reguladoras apropiadas (incluyendo, a
10 modo no taxativo, secuencias de control transcripcionales y tranlacionales, promotores, sitios de unión al ribosoma, potenciadores, orígenes de replicación, etc.) u otros componentes (genes de selección, etc.), todos los cuales están enlazados de manera operativa como se conoce en la técnica. En algunos casos se usan dos ácidos nucleicos y cada uno se pone en un vector de expresión
15 diferente (por ej., cadena pesada en un primer vector de expresión, cadena ligera en un segundo vector de expresión) o, alternativamente, pueden ponerse en el mismo vector de expresión. Los expertos en la técnica comprenderán que el diseño del o los vectores de expresión, incluyendo la selección de secuencias reguladoras pueden depender de factores tales como la elección de la célula
20 hospedadora, el nivel de expresión de proteína deseado, etc.

 En general, los ácidos nucleicos y/o expresión se puede introducir en una célula hospedadora adecuada para crear una célula hospedadora recombinante usando cualquier método apropiado a la célula hospedadora seleccionada (por ej.,
25 transformación, transfección, electroporación, infección), de forma tal que una o más moléculas de ácido nucleico se enlazan de forma operativa a uno o más elementos de control de expresión (por ej., en un vector, en una construcción

creada por procesos en la célula, integradas en el genoma de la célula hospedadora). La célula hospedadora recombinante resultante se puede mantener en condiciones adecuadas para la expresión (por ej., en presencia de un inductor, en un animal no humano adecuado, en un medio de cultivo adecuado complementado con sales, factores de crecimiento, antibióticos, complementos nutricionales apropiados, etc.) donde se produce el o los polipéptidos. En algunos casos, las cadenas pesadas se producen en una célula y la cadena ligera en otra.

Las líneas celulares de mamífero disponibles como hospedadores para la expresión son conocidos en la técnica e incluyen muchas líneas celulares inmortalizadas disponibles de la colección americana de cultivos tipo (ATCC), Manassas, VA, incluyendo, a modo no taxativo, células de ovario de hámster chino (CHO), células HEK 293, células NSO, células HeLa, células de riñón de hámster bebé (BHK), células de riñón de mono (COS), células de carcinoma hepatocelular humano (por ej., Hep G2) y una cantidad de otras líneas celulares. Las células que no son de mamífero incluyendo, a modo no taxativo, bacterianas, de levadura, insecto y vegetales también se pueden usar para expresar anticuerpos recombinantes. En algunas modalidades, los anticuerpos se pueden producir en animales transgénicos tales como vacas o pollos.

Los métodos generales para la biología molecular, expresión, purificación y detección de anticuerpo se describen, por ejemplo, en Antibody Engineering, editado por Kontermann & Dubel, Springer, Heidelberg, 2001 y 2010 Hayhurst & Georgiou, 2001, Curr Opin Chem Biol 5:683-689; Maynard & Georgiou, 2000, Annu Rev Biomed Eng 2:339-76 y Morrison, S. (1985) Science 229:1202.

Aplicaciones e indicaciones

Una vez realizados, los anticuerpos de la invención son útiles en una variedad de aplicaciones, incluyendo diagnósticos de enfermedades relacionadas con CD38 y tratamiento de los mismos.

5 Condiciones relacionadas con la CD38

En un aspecto, la invención proporciona métodos de diagnóstico y tratamiento de una afección asociada con inflamación y enfermedades inmunes, particularmente enfermedades asociadas con linfocitos activados. Como se usa en
10 la presente, la CD38 se expresa en células hematopoyéticas inmaduras, se regula por disminución en células maduras y se vuelve a expresar a altos niveles en células plasmáticas y linfocitos activados. Por ejemplo, la alta expresión de CD38 se observa en células B activadas, células plasmáticas, células T CD4+ activadas, células T CD8+ activadas, células NK, células NKT, células dendríticas maduras
15 (DC) y monocitos activados.

Los anticuerpos anti-CD38 terapéuticos de la presente invención se unen a las células positivas de CD38, da como resultado el agotamiento de estas células, tales como linfocitos activados, mediante múltiples mecanismos de acción,
20 incluyendo vías de CDC y ADCC.

Por lo tanto, cualquier enfermedad autoinmune que presente una expresión aumentada de CD38 o cantidades aumentadas de células que expresan CD38 como componente de la enfermedad se puede tratar usando los anticuerpos
25 de la invención. Estas incluyen, a modo no taxativo, rechazo de alotransplante de células de islote, alopecia areata, espondilitis anquilosante, síndrome antifosfolípido, enfermedad de Addison autoinmune, autoanticuerpos

citoplasmáticos antineutrófilos (ANCA), enfermedades autoinmunes de la glándula suprarrenal, anemia hemolítica autoinmune, hepatitis autoinmune, miocarditis autoinmune, neutropenia autoinmune, ovaritis y orquitis autoinmune, trombocitopenia autoinmune, urticaria autoinmune, enfermedad de Behcet, 5 penfigoide bulloso, cardiomiopatía, síndrome de Castleman, celiaquía-dermatitis, síndrome de fatiga crónica y disfunción inmune, polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica, síndrome de Churg-Strauss, penfigoide cicatricial, síndrome de CREST, enfermedad de aglutininas frías, enfermedad de Crohn, dermatomiositis, lupus discoide, crioglobulinemia mixta esencial, deficiencia del 10 factor VIII, fibromialgia-fibromiositis, glomerulonefritis, enfermedad de Grave, Guillain-Barre, síndrome de Goodpasture, enfermedad de injerto contra huésped (GVHD), tiroiditis de Hashimoto, hemofilia A, fibrosis pulmonar idiopática, púrpura trombocitopenia idiopática (ITP), neuropatía IgA, polineuropatías IgM, trombocitopenia mediada por mecanismos inmunitarios, artritis juvenil, enfermedad 15 de Kawasaki, liquen plano, lupus eritematoso, enfermedad de Meniere, enfermedad de tejido conectivo mezclado, esclerosis múltiple, diabetes mellitus tipo 1, miastenia grave, pénfigo vulgar, anemia perniciosa, poliarteritis nodosa, policondritis, síndrome poliglandular, polimialgia reumática, polimiositis y dermatomiositis, agammaglobulinemia primaria, cirrosis biliar primaria, psoriasis, 20 artritis soriática, fenómeno de Reynauld, síndrome de Reiter, artritis reumatoide, sarcoidosis, escleroderma, síndrome de Sjorgen, rechazo de transplante de órgano sólido, síndrome de la persona rígida, lupus eritematoso sistémico, arteritis takayasu, arteritis temporal/arteritis de células gigantes, trombocitopenia púrpura trombótica, colitis ulcerativa, uveítis, vasculitis tales como dermatitis herpetiforme 25 vasculitis, vitiligo y granulomatosis de Wegner.

De uso particular en algunas modalidades se encuentra el uso de los presentes anticuerpos para su uso en el diagnóstico y/o tratamiento de una cantidad de enfermedades, incluyendo, a modo no taxativo, enfermedades autoinmunes, incluyendo, a modo no taxativo, lupus eritematoso sistémico (SLE),
5 artritis reumatoide (RA), enfermedad inflamatoria intestinal (IBD), colitis ulcerosa y enfermedad de injerto contra huésped.

Por lo tanto, por ejemplo, se pueden seleccionar los pacientes con un alto contenido de células plasmáticas, tal como pacientes con SLE que presentan un
10 alto contenido de células plasmáticas, así como pacientes con RA que se sabe que no responden a las terapias basadas en CD20.

En un aspecto, la invención proporciona métodos para tratar una afección asociada con la proliferación de células que expresan CD38, que comprende
15 administrarle a un paciente una cantidad farmacéuticamente eficaz de un anticuerpo descrito. En determinadas modalidades, la afección es cáncer y en modalidades particulares, el cáncer es cáncer hematológico. En otras modalidades particulares, la afección es mieloma múltiple, leucemia linfoblástica crónica, leucemia linfocítica crónica, leucemia de células plasmáticas, leucemia mieloide
20 aguda, leucemia mieloide crónica, linfoma de células B o linfoma de Burkitt.

Se sabe en la técnica que determinadas afecciones están asociadas con células que expresan CD38 y que determinadas afecciones se asocian con la sobreexpresión, expresión de alta densidad o expresión regulada por aumento de
25 la CD38 en la superficie de las células. Si una población celular expresa CD38 o no, se puede determinar mediante métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, determinación de citometría de flujo del porcentaje de células en una población

dada que se etiquetan por un anticuerpo que une específicamente la CD38 o ensayos inmunohistoquímicas, como se describen generalmente a continuación para las aplicaciones diagnósticas. Por ejemplo, una población de células donde la expresión de la CD38 se detecta en alrededor de 10-30% de las células se puede considerar como que tiene una positividad débil para la CD38 y una población de células donde la expresión de la CD38 se detecta en más de alrededor de 30% de las células se puede considerar como positividad definitiva para CD38 (como obra en Jackson *et ál.* (1988), *Clin. Exp. Immunol.* 72: 351-356), pese a que se pueden usar otros criterios para determinar si una población de células expresa CD38. La densidad de expresión en las superficies de las células se puede determinar usando métodos conocidos en la técnica tales como, por ejemplo, medición por citometría de flujo de la intensidad de fluorescencia media de células que han sido etiquetado de forma fluorescente usando anticuerpos que se unen específicamente a la CD38.

15

En algunas modalidades, las composiciones y métodos de la invención se aplican a un cáncer tal como un "cáncer hematológico", un término que se refiere a los neoplasmas malignos de tejidos que forman sangre y abarcan leucemia, linfoma y mieloma múltiple. Los ejemplos no taxativos de las afecciones asociadas con la expresión de CD38 incluyen, a modo no taxativo, mieloma múltiple (Jackson *et al.* (1988), *Clin. Exp. Immunol.* 72: 351-356), leucemia linfocítica crónica de células B (B-CLL) Dürig *et ál.* (2002), *Leukemia* 16: 30-5; Morabito *et ál.* (2001), *Leukemia Research* 25: 927-32; Marinov *et ál.* (1993), *Neoplasma* 40(6): 355-8 y Jelinek *et ál.* (2001), *Br. J. Haematol.* 115: 854-61), leucemia linfoblástica aguda (Keyhani *et ál.* (1999), *Leukemia Research* 24: 153-9 y Marinov *et ál.* (1993), *Neoplasma* 40(6): 355-8), leucemia mieloide crónica (Marinov *et ál.* (1993), *Neoplasma* 40(6): 355-8), leucemia mieloide aguda (Keyhani *et ál.* (1999),

Leukemia Research 24: 153-9), leucemia linfocítica crónica (CLL), leucemia mielógena crónica o leucemia mieloide crónica (CML), leucemia mielógena aguda o leucemia mieloide aguda (AML), leucemia linfocítica aguda (ALL), leucemia de células pilosas (HCL), síndromes mielodisplásicos (MDS) o leucemia mielógena crónica (CML-BP) en blástica y todos los subtipos de estas leucemias que se definen por técnicas morfológicas, histoquímicas e inmunológicas que son conocidas por los expertos en la técnica.

"Neoplasma" o "afección neoplásica" se refiere a una afección asociada con la proliferación de células caracterizadas por una pérdida de controles normales que da como resultado uno o más síntomas incluyendo crecimiento no regulado, falta de diferenciación, invasión de tejido local y metástasis.

En algunas modalidades de la invención, el cáncer hematológico se selecciona del grupo de leucemia linfocítica crónica (CLL), leucemia mielógena crónica (CML), leucemia mielógena aguda (AML) y leucemia linfocítica aguda (ALL).

Además, se sabe en la técnica que la expresión de CD38 es un indicador pronóstico para pacientes con afecciones tales como, por ejemplo, leucemia linfocítica crónica de células B (Dürig *et al* (2002), *Leukemia* 16: 30-5 y Morabito *et ál.* (2001), *Leukemia Research* 25: 927-32) y leucemia mielógena aguda (Keyhani *et ál.* (1999), *Leukemia Research* 24: 153-9).

CLL es la leucemia más común de los adultos en el mundo occidental. La CLL implica la expansión clonal de linfocitos que parecen maduros que implica nódulos linfáticos y otros tejidos linfoides con infiltración progresiva de médula

ósea y presencia en la sangre periférica. La forma de célula B (B-CLL) representa casi todos los casos.

B-CLL

5

La B-CLL es una enfermedad incurable caracterizada por un aumento progresivo de células de linaje B monoclonales anérgicas que se acumulan en la médula ósea y en la sangre periférica en forma prolongada durante muchos años. La expresión de la CD38 se considera como un factor de pronóstico pobre e independiente para la B-CLL. Hamblin et ál., Blood 99:1023-9 (2002).

10

La terapia estándar de hoy en día para la B-CLL es paliativa y se realiza principalmente con el agente citostático clorambucil o fludarabina. Cuando se produce una recaída, generalmente se comienza una terapia de combinación usando fludarabina, ciclofosfamida en combinación con rituximab (anticuerpo monoclonal contra CD20) o canpath (anticuerpo monoclonal contra CD52). Por lo tanto, existe una necesidad médica crítica insatisfecha para el tratamiento de la B-CLL. En algunas modalidades, se proporcionan métodos para tratar B-CLL usando los anticuerpos anti-CD38 descritos (y, como se destaca a continuación, esto se puede realizar usando terapias de combinación incluyendo de forma opcional e independiente cualquiera de los fármacos anteriores).

15

20

La B-CLL se caracteriza por dos subtipos, indolente y agresivo. Estos fenotipos clínicos se correlacionan con la presencia o ausencia de mutaciones somáticas en el gen de región variable de cadena pesada de inmunoglobulina (IgVH). Como se usa en la presente, B-CLL indolente se refiere a un trastorno en un sujeto que tiene un gen de IgVH mutado y/o que presenta uno o más fenotipos

25

clínicos asociados con la B-CLL indolente. Como se usa en la presente, la frase B-CLL agresiva se refiere a un trastorno en un sujeto que tiene IgVH no mutado y/o que presenta uno o más fenotipos clínicos asociados con la B-CLL agresiva.

5 ***Mieloma múltiple***

El mieloma múltiple es un trastorno maligno del linaje de células B caracterizado por la proliferación neoplásica de células plasmáticas en la médula ósea. Los regímenes de tratamiento actuales exhiben tasas de respuesta moderadas. Sin embargo, solo se observan cambios marginales en las supervivencia general y la supervivencia media es de aproximadamente 3 años. Por lo tanto, existe una necesidad médica crítica insatisfecha para el tratamiento de mieloma múltiple. En algunas modalidades, se proporcionan los métodos para tratar el mieloma múltiple utilizando los anticuerpos divulgados.

15

La CD38 se expresa altamente en células plasmáticas que son células B diferenciadas de forma terminal.

La proliferación de las células de mieloma causa una variedad de efectos, incluyendo lesiones líticas (orificios) en el hueso, disminución del número de glóbulos rojos, producción de proteínas anormales (con daño relacionado al riñón, nervios y otros órganos), reducción en la función del sistema inmune y niveles elevados de calcio en la sangre (hipercalcemia).

25

Las opciones de tratamiento actuales incluyen quimioterapia, preferentemente asociada, cuando es posible, con trasplante de células madre autólogas (ASCT).

Gammapatía monoclonal de importancia indeterminada y mieloma múltiple indolente

5 En algunas modalidades, se proporcionan los métodos para tratar la gammapatía monoclonal utilizando los anticuerpos divulgados. En otras modalidades, se proporcionan los métodos para tratar el mieloma múltiple indolente utilizando los anticuerpos divulgados.

10 La gammapatía monoclonal de importancia indeterminada (MGUS) y el mieloma múltiple indolente (SMM) son trastornos asintomáticos, premalignos caracterizados por la proliferación de células plasmáticas monoclonales en la médula ósea y por la ausencia de daño al órgano objetivo.

15 El mieloma múltiple indolente (SMM) es un trastorno proliferativo asintomático de células plasmáticas con un alto riesgo de evolución a mieloma múltiple sintomático o activo (N. Engl. J. Med. 356(25): 2582-2590 (2007)).

20 En 2003 se adoptó un criterio de consenso internacional definiendo el SMM el cual requiere que el paciente tenga un nivel de proteína M de >30 g/L y/o células plasmáticas clonales en médula ósea >10% (Br. J. Haematol. 121: 749-57 (2003)). El paciente no debe tener ningún deterioro en órganos o tejido relacionado, incluyendo lesiones o síntomas en los huesos (Br. J. Haematol. 121: 749-57 (2003)).

25 Estudios recientes han identificado dos subconjuntos de SMM: i) pacientes con enfermedad evolutiva y ii) pacientes con enfermedad no evolutiva (Br. J.

Haematol. 121: 631-636 (2003)). El criterio de consenso internacional que define la MGUS requiere que el paciente tenga un nivel de proteína M de <30 g/L, células plasmáticas en médula ósea <10% y la ausencia de deterioro en órganos o tejido relacionado, incluyendo lesiones o síntomas en los huesos (Br. J. Haematol. 121: 749-57 (2003)).

El SMM es similar a la gammapatía monoclonal de importancia indeterminada (MGUS) ya que no hay daño al órgano objetivo (N. Engl. J. Med. 356(25): 2582-2590 (2007)). Sin embargo, clínicamente, es mucho más probable que el SMM evolucione a mieloma múltiple activo o amiloidosis a los 20 años (78% de probabilidad para el SMM contra 21% para la MGUS) (N. Engl. J. Med. 356(25): 2582-2590 (2007)).

Composiciones de anticuerpos para administración in vivo

Las formulaciones de los anticuerpos usadas de acuerdo con la presente invención se preparan para ser almacenadas mezclando un anticuerpo con el grado deseado de impureza con portadores, excipientes o estabilizadores opcionales farmacéuticamente aceptables (Remington's Pharmaceutical Sciences 16ta edición, Osol, A. Ed. [1980]), en forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. Los portadores, excipientes o estabilizantes aceptables no son tóxicos para los receptores en las dosificaciones y concentraciones empleadas e incluyen amortiguadores tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; los antioxidantes incluyen ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbencil amonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio; fenol, alcohol de butilo o bencilo; alquilparabenos, tales como metil o propil-parabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (menos

de alrededor de 10 residuos); proteínas, tales como albúmina de suero, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrofílicos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos que incluyen glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; azúcares tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones formadores de sales tales como sodio; complejos metálicos (por ej., complejos de proteína Zn) y/o tensioactivos no iónicos tales como TWEEN™, PLURONICS™ o polietilenglicol (PEG).

10 La formulación en la presente también puede contener más de un compuesto activo según sea necesario para la indicación particular que se está tratando, preferentemente aquellos con actividades complementarias que no se afectan negativamente entre sí. Por ejemplo, puede desearse proporcionar anticuerpos con otras especificidades. De manera alternativa, o adicionalmente, la
15 composición puede comprender un agente citotóxico, citocina, agente inhibidor del crecimiento y/o antagonista de molécula pequeña. Tales moléculas están adecuadamente presentes en combinación con cantidades que son eficaces a los fines deseados.

Los ingredientes activos también pueden estar atrapados en
20 microcápsulas preparadas, por ejemplo, por técnicas de coacervación o por polimerización interfacial, por ejemplo, microcápsulas de hidroximetilcelulosa o gelatina y microcápsulas de poli-(metilmetacilato), respectivamente; en sistemas coloidales de liberación de fármaco (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nano-partículas y nanocápsulas) o en
25 macroemulsiones. Tales técnicas se describen en Remington's Pharmaceutical Sciences, 16ª edición, Oslo, A., Ed. (1980).

Las formulaciones a ser usadas para la administración in vivo deberían ser estériles o casi estériles. Esto se logra fácilmente por filtración a través de membranas de filtración estériles.

5 Se pueden preparar preparaciones de liberación sostenida. Los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrofóbicos sólidos que contienen el anticuerpo, cuyas matrices se encuentran en forma de artículos moldeados, por ej., películas o microcápsulas. Ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres,
10 hidrogeles (por ejemplo, poli(2-hidroxietil-metacrilato) o poli(vinilalcohol), poliláctidos (patente estadounidense N° 3,773,919), copolímeros de ácido L-glutámico y gamma etil-L-glutamato, acetato de etilen-vinilo no degradable, copolímeros degradables de ácido láctico-ácido glicólico tales como LUPRON DEPOT™ (microesferas inyectables compuestas de copolímero de ácido láctico-
15 ácido glicólico y acetato de leuprolida) y ácido poli-D-(-)-3-hidroxibutírico. Mientras que los polímeros tales como acetato de etilen-vinilo y ácido láctico-ácido glicólico permiten la liberación de moléculas durante más de 100 días, determinados hidrogeles liberan proteínas por períodos de tiempo más cortos.

20 Cuando los anticuerpos encapsulados permanecen en el cuerpo por un tiempo prolongado, se pueden desnaturalizar o agregar como resultado de la exposición a la humedad a 37°C, lo que da como resultado una pérdida de actividad biológica y posibles cambios en la inmunogenicidad. Las estrategias racionales se pueden diseñar para la estabilización dependiendo del mecanismo
25 implicado. Por ejemplo, si se descubre que el mecanismo de agregación es la formación de un enlace S-S intermolecular a través del intercambio tio-disulfuro, la estabilización se puede lograr modificando los residuos de sulfhidrilo,

liofilización a partir de soluciones ácidas, control del contenido de humedad, uso de aditivos apropiados y desarrollo de composiciones de matriz de polímero específicas.

5

Modalidades de administración

Los anticuerpos y agentes quimioterapéuticos de la invención se administran a un sujeto conforme a procedimientos conocidos, tales como administración intravenosa, por ejemplo, como un bolo o por infusión continua durante un período de tiempo, por vías intramuscular, intraperitoneal, intracerebroespinal, subcutánea, intra-articular, intrasinovial, intratecal, oral, tópica o por inhalación. Se prefiere la administración intravenosa o subcutánea del anticuerpo.

15

Modalidades de tratamiento

En los métodos de la invención, la terapia se usa para proporcionar una respuesta terapéutica positiva con respecto a la enfermedad o afección. Por "respuesta terapéutica positiva" se hace referencia a una mejora de la enfermedad o afección y/o una mejora en los síntomas asociados a la enfermedad o afección. Por ejemplo, una respuesta terapéutica positiva se referiría a una o más de las siguientes mejoras de la enfermedad: (1) una reducción del número de células neoplásicas; (2) un aumento en la muerte de las células neoplásicas; (3) inhibición de la supervivencia de las células neoplásicas; (5) inhibición (es decir, ralentizar en alguna medida, preferentemente detener) el crecimiento del tumor; (6) una tasa

de supervivencia del paciente aumentada; y (7) algún alivio de uno o más síntomas asociados con la enfermedad o afección.

Las respuestas terapéuticas positivas en cualquier enfermedad o afección
5 dadas pueden determinarse mediante el criterio de respuesta estandarizado
específico de esa enfermedad o afección. La respuesta al tumor se puede evaluar
para determinar cambios en la morfología del tumor (es decir, masa, tamaño del
tumor generales y similares) usando técnicas de análisis tales como análisis de
imagenología por resonancia magnética (MRI), imagenología radiográfica x,
10 análisis de tomografía computarizada (CT), imagenología de análisis óseo,
endoscopía y muestreo de biopsia de tumor incluyendo aspiración de médula ósea
(BMA) y conteo de células tumorales en la circulación.

Además de estas respuestas terapéuticas positivas, el sujeto sometido a
15 terapia puede experimentar el efecto beneficioso de una mejora de los síntomas
asociados con la enfermedad.

Por lo tanto, para los tumores de células B, el sujeto puede experimentar
una disminución en los denominados síntomas B, es decir, sudoración nocturna,
20 fiebre, pérdida de peso y/o urticaria. Para las afecciones premalignas, la terapia
con un agente terapéutico anti-CD38 puede bloquear y/o prolongar el tiempo antes
del desarrollo de una afección maligna relacionada, por ejemplo, el desarrollo de
mieloma múltiple en sujetos que sufren de gammopatía monoclonal de importancia
indeterminada (MGUS).

25

Una mejora en la enfermedad puede caracterizarse como una respuesta
completa. Por "respuesta completa" se quiere decir una ausencia de enfermedad

clínicamente detectable con la normalización de médula ósea, fluido cerebroespinal (CSF) y todo estudio radiográfico anormal anterior, o proteína monoclonal anormal en el caso del mieloma.

5 Dicha respuesta puede persistir por al menos 4 a 8 semanas, o algunas veces 6 a 8 semanas, luego del tratamiento, de acuerdo con los métodos de la invención. Alternativamente, una mejora en la enfermedad puede categorizarse como una respuesta parcial. Por "respuesta parcial" se quiere decir una disminución de al menos aproximadamente 50% de todas las masas tumorales
10 medibles (es decir, el número de células malignas en el sujeto, o el volumen medido de las masas tumorales o la cantidad de proteína monoclonal anormal) en ausencia de nuevas lesiones, lo que puede persistir por de 4 a 8 semanas, o de 6 a 8 semanas.

15 El tratamiento de acuerdo con la presente invención incluye una "cantidad terapéuticamente eficaz" de los medicamentos usados. Una "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad eficaz, con dosificaciones y durante períodos de tiempo necesarios para alcanzar un resultado terapéutico deseado.

20

 Una cantidad terapéuticamente eficaz puede variar de acuerdo con factores tales como el estado de la enfermedad, edad, sexo y peso del individuo y la habilidad que tienen los medicamentos de provocar una respuesta deseada en el individuo. Una cantidad terapéuticamente eficaz también es una cantidad donde
25 cualquier efecto tóxico o perjudicial del anticuerpo o porción del anticuerpo se ve superado por los efectos terapéuticamente benéficos.

Una "cantidad terapéuticamente eficaz" para la terapia tumoral también puede medirse por su habilidad de estabilizar el progreso de la enfermedad. La habilidad de un compuesto de inhibir cáncer puede evaluarse en un sistema de modelo animal que predice la eficacia en tumores humanos.

5

Alternativamente, esta propiedad de una composición puede evaluarse examinando la habilidad del compuesto de inhibir el crecimiento celular o inducir apoptosis mediante ensayos in vitro conocidos por el médico experto. Una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto terapéutico puede disminuir el tamaño del tumor o mejorar los síntomas en un sujeto de otra manera. Un experto en la técnica podrá determinar dichas cantidades basándose en factores como el tamaño del sujeto, la gravedad de los síntomas del sujeto y la composición o vía de administración particulares seleccionadas.

15

Los regímenes de dosificación se ajustan para proporcionar la respuesta óptima deseada (por ejemplo, una respuesta terapéutica). Por ejemplo, se puede administrar un solo bolo, se pueden administrar varias dosis divididas en el tiempo o la dosis se puede reducir o aumentar proporcionalmente como se indica por la exigencia de la situación terapéutica. Las composiciones parenterales se pueden formular en una forma de dosificación unitaria para facilitar la administración y lograr la uniformidad de la dosificación. Las formas de dosificación unitaria como se utilizan en la presente se refieren a unidades físicamente separadas adecuadas como dosificaciones unitarias para los sujetos a ser tratados, donde cada unidad contiene una cantidad predeterminada de compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el portador farmacéutico necesario.

20

25

La especificación de las formas de dosificación unitaria de la presente invención se dictan por y dependen directamente de (a) la características únicas del compuesto activo y los efectos terapéuticos particulares a ser logrados y (b) las limitaciones inherentes en la técnica de componer dicho compuesto activo para el tratamiento de la sensibilidad en individuos.

Las dosificaciones eficientes y los regímenes de dosificación para los anticuerpos anti-CD38 usados en la presente invención dependen de la enfermedad o afección a tratarse y pueden ser determinados por el experto en la técnica.

Un intervalo de ejemplo, no limitante para una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo anti-CD38 usado en la presente invención es de alrededor de 0.1-100 mg/kg, tal como alrededor de 0.1-50 mg/kg, por ejemplo alrededor de 0.1-20 mg/kg, tal como alrededor de 0.1-10 mg/kg, por ejemplo alrededor de 0.5, alrededor de tal como 0.3, alrededor de 1 o alrededor de 3 mg/kg. En otra modalidad, el anticuerpo se administra en una dosis de 1 mg/kg o más, tal como una dosis de 1 a 20 mg/kg, por ejemplo, una dosis de 5 a 20 mg/kg, por ejemplo una dosis de 8 mg/kg.

Un profesional médico experto en la técnica puede determinar fácilmente y recetar una cantidad eficaz de una composición farmacéutica necesaria. Por ejemplo, un médico o veterinario puede comenzar las dosis de los medicamentos empleados en la composición farmacéutica en niveles inferiores a los requeridos para alcanzar el efecto terapéutico deseado y aumentar gradualmente la dosificación hasta alcanzar el efecto deseado.

En una modalidad, el anticuerpo anti-CD38 se administra mediante infusión en una dosis semanal de 10 a 500 mg/kg tal como 200 a 400 mg/kg. Dicha 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
5 período de 2 a 24 horas, tal como de 2 a 12 horas.

En una modalidad, el anticuerpo anti-CD38 se administra mediante infusión continua lenta durante un largo período, tal como más de 24 horas, si se requiere reducir los efectos secundarios incluyendo toxicidad.

10

En una modalidad el anticuerpo anti-CD38 se administra en una dosificación semanal de 250 mg a 2000 mg, tal como por ejemplo 300 mg, 500 mg, 700 mg, 1000 mg, 1500 mg o 2000 mg, por hasta 8 veces, tal como de 4 a 6 veces. La administración puede realizarse por infusión continua durante un
15 período de 2 a 24 horas, tal como de 2 a 12 horas. Dicho régimen puede repetirse una o más veces como sea necesario, por ejemplo, luego de 6 o 12 meses. La dosificación puede determinarse o ajustarse midiendo la cantidad de compuesto de la presente invención en la sangre luego de la administración, mediante, por ejemplo, extraer una muestra biológica y usar anticuerpos antiidiotípicos que
20 tienen como diana la región de unión al antígeno del anticuerpo anti-CD38.

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

25

En una modalidad, el anticuerpo anti-CD38 se administra mediante terapia de mantenimiento, tal como, por ejemplo, una vez a la semana por un período de 6 meses o más.

En una modalidad, el anticuerpo anti-CD38 se administra mediante un régimen que incluye una infusión de un anticuerpo anti-CD38 seguida por una infusión de un anticuerpo anti-CD38 conjugado con un radioisótopo. El régimen
5 puede repetirse, por ejemplo, de 7 a 9 días después.

Como ejemplos no taxativos, se puede proporcionar tratamiento de acuerdo con la presente invención como una dosificación diaria de un anticuerpo en una cantidad de alrededor de 0.1-100 mg/kg, tal como 0.5, 0.9, 1.0, 1.1, 1.5, 2,
10 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90 o 100 mg/kg, por día, en al menos uno de los días 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 o 40 o
alternativamente, al menos una de las semanas 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12,
15 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 luego del inicio del tratamiento, o cualquier combinación de los mismos, utilizando dosis individuales o divididas de cada 24, 12, 8, 6, 4 o 2 horas, o cualquier combinación de las mismas.

En algunas modalidades la molécula del anticuerpo anti-CD38 del mismo
20 se usa en combinación con uno o más agentes terapéuticos adicionales, por ejemplo, un agente quimioterapéutico. Ejemplos no taxativos de agentes quimioterapéuticos que dañan el ADN incluyen inhibidores de la topoisomerasa I (por ejemplo, irinotecano, topotecano, camptotecina y análogos o metabolitos de los mismos y doxorubicina); inhibidores de la topoisomerasa II (por ejemplo,
25 etoposida, teniposida, y daunorrubicina); agentes alquilantes (por ejemplo, melfalán, clorambucilo, busulfán, tiotepa, ifosfamida, carmustina, lomustina, semustina, estreptozocina, decarbazina, metotrexato, mitomicina C y

ciclofosfamida); intercaladores de ADN (por ejemplo, cisplatino, oxaliplatino y carboplatino); intercaladores de ADN y generadores de radicales libres tales como bleomicina; y miméticos de neucleósidos (por ejemplo, 5-fluorouracilo, capecitabina, gemcitabina, fludarabina, citarabina, mercaptopurina, tioguanina, pentostatina, y
5 hidroxiaurea).

Agentes quimioterapéuticos que alteran la replicación de las células incluyen: paclitaxel, docetaxel y análogos relacionados; vincristina, vinblastina y análogos relacionados; talidomida, lenalidomida y análogos relacionados (por
10 ejemplo, CC-5013 y CC-4047); inhibidores de la proteína tirosina cinasa (por ejemplo, mesilato de imatinib y gefitinib); inhibidores de la proteasoma (por ejemplo, bortezomib); inhibidores de NF- κ B, incluyendo inhibidores de la cinasa I κ B; anticuerpos que se unen a proteína sobreexpresadas en cánceres y que por lo tanto regulan por disminución la replicación celular (por ejemplo, trastuzumab,
15 rituximab, cetuximab, y bevacizumab); y otros inhibidores de proteínas o enzimas que se sabe se regulan por aumento, están sobreexpresadas o activadas en cánceres, la inhibición de las cuales regula por disminución la replicación celular.

En algunas modalidades, los anticuerpos de la invención pueden usarse
20 antes, al mismo tiempo o después del tratamiento con Velcade® (bortezomib).

25 ***Usos para el diagnóstico***

Los anticuerpos anti-CD38 proporcionados también pueden usarse en la imagenología *in vitro* o *in vivo* de tumores o estados de enfermedad autoinmune asociados con la CD38. En algunas modalidades, los anticuerpos descritos en la presente se usan tanto para diagnóstico como para tratamiento, o solo para diagnóstico. Cuando los anticuerpos anti-CD38 se usan tanto para diagnóstico como para tratamiento, algunas modalidades dependen de dos anticuerpos anti-CD38 diferentes para dos epítomos diferentes, tal que el anticuerpo de diagnóstico no compita para unirse con el anticuerpo terapéutico, aunque en algunos casos el mismo anticuerpo puede utilizarse para ambos. Por ejemplo, en algunos casos, el anticuerpo Ab19 se usa como diagnóstico (generalmente etiquetado como se describe a continuación) mientras que Ab79 se usa terapéuticamente, o viceversa. Por lo tanto, se incluyen en la invención composiciones que comprenden un anticuerpo de diagnóstico y un anticuerpo terapéutico y en algunas modalidades el anticuerpo de diagnóstico se etiqueta como se describe en la presente. Adicionalmente, la composición de anticuerpos terapéuticos y de diagnóstico también puede co-administrarse con otros fármacos como se resume en la presente.

En muchas modalidades, se etiqueta un anticuerpo de diagnóstico. Por "etiquetado" en la presente se quiere decir que los anticuerpos divulgados en la presente tienen uno o más elementos, isótopos o compuestos químicos ligados para permitir la detección en un procedimiento de análisis o diagnóstico. En general, las etiquetas están comprendidas en varias clases: a) etiquetas inmunes, las cuales pueden ser un epítomo incorporado como un compañero de fusión que es reconocido por un anticuerpo, b) etiquetas isotópicas, las cuales pueden ser isótopos pesados o radioactivos, c) etiquetas de moléculas pequeñas, las cuales pueden incluir tintes fluorescentes o colorimétricos, o moléculas tales como biotina

que permiten otros métodos de etiquetado y d) etiquetas tales como partículas (incluyendo burbujas para etiquetado por ultrasonido) o etiquetas paramagnéticas que permiten imagenología corporal. Las etiquetas pueden incorporarse a los anticuerpos en cualquier posición y pueden incorporarse in vitro o in vivo durante la expresión de la proteína, como se conoce en la técnica.

El diagnóstico se puede hacer in vivo, mediante la administración de un anticuerpo de diagnóstico que permite imagenología corporal total como se describe a continuación, o in vitro, en muestras extraídas de un paciente. En este contexto "muestra" incluye cualquier cantidad de cosas, incluyendo, a modo no taxativo, fluidos corporales (incluyendo, a modo no taxativo, sangre, orina, suero, linfa, saliva, secreciones anales y vaginales, sudor y semen), así como también muestras de tejidos tal como resultados de biopsias de tejidos relevantes.

En algunas modalidades, se realiza imagenología *in vivo*, incluyendo, a modo no taxativo, ultrasonido, análisis de CT, rayos X, análisis de MRI y PET, así como técnicas ópticas, tales como las que utilizan etiquetas ópticas para tumores cerca de la superficie del cuerpo.

La imagenología *in vivo* de enfermedades asociadas con la CD38 puede realizarse mediante cualquier técnica adecuada. Por ejemplo, el etiquetado con ⁹⁹Tc o etiquetado con otro isótopo emisor de rayos β puede usarse para etiquetar anticuerpos anti-CD38. Las variaciones de esta técnica pueden incluir el uso de imagenología por resonancia magnética (MRI) para mejorar la imagenología mediante técnicas de cámara gamma. Métodos y principios de inmunoescintografía similares se describen, 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 ál., (eds.), pp. 624-652 (Mack Publishing Co., 1990) y Brown, "Clinical Use of Monoclonal Antibodies," en Biotechnology And Pharmacy 227-49, Pezzuto et ál., (eds.) (Chapman & Hall 5 1993).

En una modalidad, la presente invención proporciona un método de imagenología *in vivo* donde se conjuga un anticuerpo anti-CD38 a un agente promotor de la detección, el anticuerpo conjugado se administra a un hospedador, tal como mediante inyección a la corriente sanguínea y se analiza la presencia y 10 ubicación del anticuerpo etiquetado en el hospedador. A través de esta técnica y cualquier otro método de diagnóstico que se proporciona en la presente, la presente invención proporciona un método para analizar la presencia de células relacionadas con enfermedad en un paciente humano o una muestra biológica extraída de un paciente humano.

15

Para imagenología de diagnóstico, se pueden unir radioisótopos a un anticuerpo anti-CD38 ya sea directa o indirectamente utilizando un grupo funcional intermediario. Grupos funcionales intermediarios útiles incluyen quelantes tales como ácido etilendiaminotetraacético y ácido dietilentriaminopentaacético (véase, 20 por ejemplo, la patente estadounidense N° 5,057,313). En dichos ensayos de diagnósticos que involucran anticuerpos anti-CD38 conjugados con radioisótopos, la dosificación de anticuerpo anti-CD38 conjugado al paciente, típicamente se mantiene al nivel más bajo posible a través de la elección de isótopo para la mejor combinación de semivida mínima, retención mínima en el cuerpo y cantidad 25 mínima de isótopo, lo cual permitirá la detección y la medición precisa.

Además de radioisótopos y agentes radiopacos, se pueden llevar a cabo métodos de diagnóstico utilizando anticuerpos anti-CD38 que se conjugan con

tintes (tales como el complejo biotina-estreptavidina), agentes de contraste, compuestos o moléculas fluorescentes y agentes potenciadores (por ejemplo, iones paramagnéticos) para imagenología por resonancia magnética (MRI) (véase, por ejemplo, la patente estadounidense No. 6,331,175, la cual describe técnicas de MRI y la preparación de anticuerpo conjugado con un agente potenciador de MRI). Dichos agentes de diagnóstico/detección pueden seleccionarse de agentes para uso en imagenología por resonancia magnética y compuestos fluorescentes.

Para poder cargar un anticuerpo anti-CD38 con metales radioactivos o iones paramagnéticos, puede ser necesario hacerlo reaccionar con un reactivo que tenga una cola larga a la cual se ligue una multiplicidad de grupos quelantes para unir los iones. Dicha cola puede ser un polímero tal como polilisina, polisacárido u otra cadena derivada derivable que tenga grupos colgantes a los cuales se les pueden unir grupos quelantes tales como, por ejemplo, porfirinas, poliaminas, éteres corona, bistiosemicarbazonas, polioximas y grupos similares que se conoce son útiles para este fin.

Los quelatos pueden acoplarse a anticuerpos anti-CD38 usando química estándar. Un quelato se liga normalmente a un anticuerpo anti-CD38 mediante un grupo que permite la formación de un enlace a la molécula con pérdida mínima de inmunorreactividad y agregación y/o reticulación interna mínimas.

Ejemplos de combinaciones metal-quelato potencialmente útiles incluyen 2-bencil-DTPA y sus análogos de monometilo y ciclohexilo, usados con isótopos de diagnóstico en el intervalo general de energía de 60 a 4,000 keV, tales como ^{125}I , ^{123}I , ^{124}I , ^{62}Cu , ^{64}Cu , ^{18}F , ^{111}In , ^{67}Ga , ^{99}Tc , ^{94}Tc , ^{11}C , ^{13}N , ^5O y ^{76}Br , para radioimagenología.

Las etiquetas incluyen un radionucleido, un agente de contraste radiológico, un ion paramagnético, un metal, una etiqueta fluorescente, una etiqueta quimioluminiscente, un agente de contraste de ultrasonido y un agente fotoactivo. Dichos agentes de diagnóstico son bien conocidos y puede utilizarse cualquiera de tales agentes de diagnóstico conocidos. Ejemplos no taxativos de agentes de diagnóstico pueden incluir un radionucleido tal como ^{110}In , ^{111}In , ^{177}Lu , ^{18}F , ^{52}Fe , ^{62}Cu , ^{64}Cu , ^{67}Cu , ^{67}Ga , ^{68}Ga , ^{86}Y , ^{90}Y , ^{89}Zr , ^{94}mTc , ^{94}Tc , ^{99}mTc , ^{120}I , ^{123}I , ^{124}I , ^{125}I , ^{131}I , $^{154-158}\text{Gd}$, ^{32}P , ^{11}C , ^{13}N , ^{15}O , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{51}Mn , ^{52}mMn , ^{55}Co , ^{72}As , ^{75}Br , ^{76}Br , ^{82}mRb , ^{83}Sr , u otros emisores γ -, β - o de positrones.

Iones paramagnéticos útiles pueden incluir cromo (III), manganeso (II), hierro (III), hierro (II), cobalto (II), níquel (II), cobre (II), neodimio (III), samario (III), iterbio (III), gadolinio (III), vanadio (II), terbio (III), disprosio (III), holmio (III) o erbio (III). Agentes de contraste de metal pueden incluir lantano (III), oro (III), plomo (II) o bismuto (III).

Los agentes de contraste de ultrasonido pueden comprender liposomas tales como liposomas llenos de gas. Los agentes de diagnóstico radiopacos pueden seleccionarse de compuestos, compuestos de bario, compuesto de galio y compuesto de talio.

Cuando estos quelatos y quelatos similares forman complejos con metales no radiactivos tales como manganeso, hierro y gadolinio, pueden ser útiles para los métodos de diagnóstico de MRI en relación con los anticuerpos anti-CD38. Quelatos macrocíclicos tales como NOTA, DOTA y TETA son útiles con una variedad de metales y radiometales, más particularmente con radionucleidos de galio, itrio y cobre, respectivamente. Dichos complejos de metal-quelato pueden

hacerse muy estables adaptando el tamaño del anillo al metal de interés. Otros quelatos tipo anillo tales como poliéteres macrocíclicos, los cuales son de interés para nucleidos de unión estable, tales como ^{223}Ra , también pueden ser adecuados en método de diagnóstico.

5 Por lo tanto, la presente invención proporciona conjugados de anticuerpo anti-CD38 de diagnóstico, donde el conjugado de anticuerpo anti-CD38 se conjuga con un agente de contraste (tal como para imagenología por resonancia magnética, tomografía computarizada o agente potenciador de contraste para ultrasonido) o un radionucleido que puede ser, por ejemplo un isótopo emisor de γ -
10 , β -, α -, electrón Auger o positrones.

Los anticuerpos anti-CD38 también pueden ser útiles, por ejemplo, para detectar la expresión de un antígeno de interés en células, tejido o suero específicos. Para aplicaciones de diagnóstico, el anticuerpo típicamente estará
15 etiquetado con un resto detectable para ensayos in vitro. Como comprenderán los expertos en la técnica, existe una gran variedad de etiquetas adecuadas para su uso en pruebas in vitro. Tintes adecuados para usar en este aspecto de la invención incluyen, a modo no taxativo, complejos de lantanida fluorescentes, incluyendo aquellos de Europio y Terbio, fluoresceína, rodamina,
20 tetrametilrodamina, eosina, eritrosina, cumarina, metil-cumarinas, puntos cuánticos (también llamados "nanocristales"; véase estadounidense N° de serie 09/315,584, incorporada a la presente mediante esta referencia), pireno, verde de malaquita, estilbeno, amarillo lucifer, azul cascada. TM., rojo Texas, tintes Cy (Cy3, Cy5, etc.), tintes Alexa (incluyendo Alexa, ficoeritrin, bodipy, y otros descritos en la 6ta
25 Edición de Molecular Probes Handbook de Richard P. Haugland, incorporada expresamente a la presente mediante esta referencia.

Los tejidos teñidos pueden evaluarse luego para contar la radioactividad como un indicador de la cantidad de péptidos asociados a la CD38 que hay en el tumor. Las imágenes obtenidas por el uso de dichas técnicas pueden utilizarse para evaluar la biodistribución de la CD38 en un paciente, mamífero o tejido, por ejemplo en el contexto de usar la CD38 como un biomarcador para detectar la presencia de células cancerígenas invasivas.

Artículos de fabricación

En otras modalidades, se proporciona un artículo de fabricación que contiene materiales útiles para el tratamiento de los trastornos descritos anteriormente. El artículo de fabricación comprende un contenedor y una etiqueta. Contenedores adecuados incluyen, por ejemplo, botellas, frascos, jeringas y tubos de ensayo. Los contenedores se podrán formar a partir de una variedad de materiales tales como vidrio o plástico. El contenedor puede retener una composición la cual es eficaz para tratar la afección y puede tener un puerto de acceso estéril (por ejemplo, el contenedor puede ser una bolsa o frasco de solución intravenosa que tenga un tapón que pueda perforarse mediante una aguja de inyección hipodérmica). El agente activo en la composición es el anticuerpo. La etiqueta que se encuentra en o se asocia al contenedor indica que la composición se usa para tratar la afección preferida. El artículo de fabricación puede comprender además un segundo contenedor que comprende un amortiguador farmacéuticamente aceptable, tal como solución salina tamponada con fosfato, solución de Ringer y solución de dextrosa. Puede incluir además otros materiales deseables desde el punto de vista comercial y del usuario, incluyendo otros amortiguadores, diluyentes, filtros, agujas, jeringas y prospectos con instrucciones de uso.

EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos se ofrecen para ilustrar la invención, pero no para
5 limitarla.

EJEMPLO 1: Construcción de vectores de expresión que comprenden
polinucleótidos que codifican la CD38 humana, de mono cinomolgo y de ratón.

10 Para construir el vector que expresa la CD38 humana (huCD38) se aisló
un polinucleótido que codifica la huCD38 de ADNc humano obtenido de Origene
Technologies Trueclone®. La huCD38 aislada se clonó en un vector de expresión
estable (XOMA, Inc.) que contiene el gen de resistencia a la neomicina (neo^R), que
permitió la selección de transfectantes resistentes a la G418 (Geneticina). El gen
15 huCD38 presente en los transfectantes seleccionados se secuenció para
identificar cualquier error en la secuencia. Los errores en la secuencia que se
desviaron del acceso Genbank NM_001775 se corrigieron mediante mutagénesis
dirigida al sitio por PCR. El vector final de ADN se confirmó mediante secuencia en
5'.

20

Para construir un vector que exprese la CD38 de mono cinomolgo
(cyCD38) se aisló un polinucleótido que codifica la cyCD38 del ADN obtenido de
Biochain Institute's, ADNc de mono (cinomolgo), tejido normal del bazo. La
cyCD38 aislada se clonó en un vector de expresión estable (XOMA, Inc.) que
25 contiene el gen neo^R, que permitió la selección de transfectantes resistentes a la
G418 (Geneticina). El gen cyCD38 presente en los transfectantes seleccionados
se secuenció para identificar cualquier error en la secuencia. Los errores en la

secuencia que se desviaron del acceso Genbank AY555148 se corrigieron mediante mutagénesis dirigida al sitio por PCR. El vector final de ADN se confirmó mediante secuencia.

5 Para construir el vector que expresa la CD38 de ratón (moCD38) se aisló un polinucleótido que codifica la moCD38 de ADN obtenido de la compilación de Origene's TrueORF. La moCD38 aislada se clonó en un vector de expresión estable (XOMA, Inc.) que contiene el gen neo^R, que permitió la selección de transfectantes resistentes a la G418 (Geneticina). El gen moCD38 presente en los
10 transfectantes seleccionados se secuenció para identificar cualquier error en la secuencia. Los errores en la secuencia que se desviaron del acceso Genbank NM_007646 se corrigieron mediante mutagénesis dirigida al sitio por PCR. El vector final de ADN se confirmó mediante secuenciamiento.

15 **Ejemplo 2:** Desarrollo de células de ovario de hámster chino (CHO) que expresan la CD38.

 Para el desarrollo de células CHO que expresan la huCD38, muCD38 y cyCD38, se transfectaron las células CHO con ADN linealizado. Después de una
20 semana de selección, las células se clasificaron mediante citometría de flujo y las células que expresaban más la huCD38, muCD38 o cyCD38 (el 15% más alto) se colocaron en placas de 96 pocillos para generar colonias simples. Las células restantes también se colocaron en placas por selección para generar colonias de respaldo. Aproximadamente 12 a 14 días después de la colocación en placas, las
25 colonias simples se identificaron y se transfirieron a placas de 96 pocillos de profundidad. Los clones se analizaron mediante análisis FACS después del segundo pasaje. Los clones con mayor producción se pasaron y expandieron en

matraces de agitación. Los dos mejores clones se congelaron y/o cultivaron para análisis AVA de micoplasma y aumento.

5 Para construir un indicador de luciferasa para modelos de xenoinjerto
diseminados se uso un vector comercial que contenía el marcador seleccionable
del promotor CMV/gen de luciferasa/neomicina (Promega, Madison, WI) para
generar una línea de transfectante estable en células de linfoma de Daudi Burkitt.

EJEMPLO 3: Bibliotecas de expresión por fagos y análisis de agentes que
10 se unen a la CD38.

Se llevó a cabo la selección de un anticuerpo con diana específica de una
biblioteca de expresión por fagos, de acuerdo con los métodos descritos por Marks
et ál. (2004, Methods Mol. Biol. 248:161-76). En resumen, la biblioteca de
15 expresión por fagos se incubó con 100 pmoles de CD38 biotinilada a temperatura
ambiente por 1 hora y luego el complejo que se formó se capturó utilizando 100 µL
de suspensión de perlas de Estreptavidina (DYNABEADS® M-280 Estreptavidina,
Invitrogen). Los fagos no específicos se quitaron lavando las perlas con
amortiguador de lavado (5% de leche en PBS). Los fagos unidos se eluyeron con
20 0,5 ml de trietilamina 100 nM (TEA) e inmediatamente se neutralizaron mediante la
adición de un volumen igual de TRIS-Cl 1M, pH 7.4. El conjunto de fagos eluidos
se uso para infectar células de E coli TG1 creciendo en fase logarítmica y se
rescataron fagémidos como se describe en Marks et ál., Id. Se repitió la selección
en un total de tres ciclos.

25

De manera alternativa, las bibliotecas de expresión por fagos se cribaron
contra CD38 inmovilizada (R&D systems) para identificar un panel de fragmentos

de anticuerpo con la habilidad de unirse a la CD38. El cribado se llevó a cabo usando protocolos estándar (véase, por ejemplo, *Methods in Molecular Biology*, tomo 178: *Antibody Phage Display: Methods and Protocols* editados por: P.M. O'Brien y R. Aitken, Humana Press; "Panning of Antibody Phage-Display Libraries," Coomber, D.W.J., pp. 133-145, y "Selection of Antibodies Against Biotinylated Antigens," Chames et ál., pp. 147-157). En resumen, se recubrieron tres pocillos de una placa NUNC® MAXISORP con 50 µL de CD38 recombinante (R&D Systems) a una concentración de 10 µg/ml en PBS. Luego de incubar durante la noche a 4°C, se bloquearon sitios de bloqueo libre con 5% de leche en PBS durante una hora a temperatura ambiente. Luego se agregaron aproximadamente 200 µL de biblioteca de fagos en 5% de leche/PBS a los pocillos bloqueados y se incubaron a temperatura ambiente durante aproximadamente una a dos horas. Los pocillos se lavaron y se eluyó el fago unido utilizando métodos estándar (véase, por ejemplo, Sam brook y Russell, *Molecule Cloning: A Laboratory Manual*, 3^{ra} edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001). El fago eluído se amplificó mediante la infección de células hospedadoras de E. coli TG1 en una fase de crecimiento logarítmica. Las células TG1 infectadas se recuperaron mediante centrifugación a 2,500 RPM durante cinco minutos, se colocaron en placas agar de 15 cm con 2yT-ampicilina-2% de glucosa y se incubaron a 30 °C durante la noche. Luego se repitió el proceso de cribado usando el fago amplificado. El ciclo de cribado, elución y amplificación se repitió por tres ciclos.

Después de completar el cribado, las colonias simples de las células TG1 colocadas en placas se usaron para inocular medio en placas de 96 pocillos. Se cultivaron microcultivos hasta un OD600 de 0.6, momento en el cual se indujo la expresión de scFv soluble mediante la adición de IPTG 1 mM e incubación durante

la noche en un agitador a 30°C. Se sedimentaron las bacterias mediante centrifugación y se uso extracto periplásmico para analizar la unión de scFv a CD38 inmovilizada usando un ensayo ELISA estándar y un ensayo de unión FACS.

5

Para el análisis de unión FACS se usaron células CHO que expresaban de manera estable la CD38 para analizar scFvs en un extracto periplásmico (PPE) para determinar su capacidad de unir CD38 natural unida a membrana. Los transfectantes principales y de CHO (líneas celulares que expresan CD38 humana o CD38 cino o CD38 de ratón) se volvieron a suspender separadamente a 2×10^6 células/ml en PBS (Life Technologies), 0.5% de BSA (SigmaAldrich) y 0, 1 % de NaN3 (Sigma-Aldrich) (amortiguador FACS). Las células CHO principales que no expresan CD38 se usaron como control negativo. Se colocaron alícuotas de veinticinco μL de las células en placas de 96 pocillos con base en forma de V (Costar Cat N° 3897) y se agregaron 25 μL de extracto periplásmico que contenía fragmento de anticuerpo de scFv etiquetado con myc a las células, luego la mezcla se incubó a 4 °C durante 30 minutos. Luego las células se lavaron dos veces, después de lo cual el sedimento se volvió a suspender en 25 μL de ratón anti c-myc (amortiguador 1/1000 in FACS) (Roche) y se incubaron nuevamente a 4 °C durante 30 minutos. Luego las células se lavaron dos veces y se volvieron a suspender en 25 μL de dilución 1/200 anti-ratón IgG-PE en amortiguador FACS (Jackson labs) y se incubaron nuevamente a 4 °C durante 30 minutos. Luego las células se lavaron dos veces para quitar el exceso de anticuerpo no unido y se volvieron a suspender en 70 μL de amortiguador FACS y se analizaron en un BD FACScan®. Los datos adquiridos se evaluaron usando software FlowJo (TreeStar, Inc.). Las muestras positivas se identificaron comparando la intensidad de

fluorescencia media de la célula CHO transfectada con CD38 en relación con la intensidad de fluorescencia media de la línea celular principal de CHO (CD38⁻).

Los clones de anticuerpo que se unen a la CD38 humana se secuenciaron para identificar clones únicos. Luego los clones scFV únicos se clasificaron según
5 las constantes de disociación determinadas por el análisis Biacore®. Se inmovilizaron de 200RU a 500RU de CD38 humana recombinante (R&D Systems' cat N° 2404-AC o equivalente) mediante química de acoplamiento de amina estándar (Biacore®) a un chip CM5 o equivalente. También se preparó un punto de referencia el cual se activó y luego se bloqueó sin inmovilizar la proteína. Esto
10 se llevó a cabo diluyendo el antígeno a 1-3 µg/ml en amortiguador de acetato, pH 5.0 e inyectándolo sobre la superficie activada hasta que se inmovilizó el nivel requerido (3 a 5 minutos). Luego se bloqueó la superficie con etanolamina. Los extractos periplásmicos se diluyeron uno a uno con el amortiguador del ensayo HEPES 10 mM, NaCl 150 mM, EDTA 3 mM (ácido etilendiaminotetraacético) y
15 0.05% de polisorbato 20 a pH 7.4 con 2 mg/mL de BSA (albúmina de suero bovino). El extracto periplásmico diluido se inyectó sobre las superficies de resonancia de plasmones superficiales (SPR) a 30 minutos durante 300 segundos con 900 segundos adicionales de tiempo de disociación monitoreado. La regeneración se realizó con una única inyección de 8 segundos de HCl 100 mM.
20 Los datos de los puntos de referencia se restaron de los datos de la superficie activa, luego las curvas de disociación se ajustaron usando el modelo de disociación 1:1 en el software Biacore® T100.

Los clones de scFV con mayor puntuación se convirtieron en anticuerpos IgG1. Se repitió el análisis de unión FACS en los clones reformateados con IgG1
25 usando células CHO principales y células CHO que expresan CD38 humana, de murino y de cinomolgo para asegurar que se conserven las propiedades de unión y para evaluar la reactividad cruzada de las especies. La caracterización por

FACS de los clones reformados con IgG se realizó como se describió anteriormente, pero los pasos que consistían de la adición de anticuerpo anti-c-myc e IgG-PE anti-ratón se remplazaron con un único paso en el cual la unión de IgG humana de longitud completa se detectó mediante la adición de IgG anti-humana conjugada con ficoeritrina (Jackson Labs).

EJEMPLO 4: Ensayos *in vitro* basados en células de clones reformateados por IgG

Se reformatearon alrededor de 150 clones como anticuerpos de IgG1 humano y cinco (Ab19, Ab43, Ab72, Ab79 y Ab110) se evaluaron completamente usando un panel de ensayos, como se describe a continuación. Se comparó el desempeño de los clones reformateados con IgG tanto en ensayos *in vitro* como *in vivo* con dos anticuerpos, BMTK4-1 (también llamado referencia-1, BM-1, o BMTK-1) (SEQ ID NO: 24 y 25; regiones variables de cadena pesada y ligera) y BMTK4-2 (también llamado referencia-2, BM-2, o BMTK-2) (SEQ ID NO: 26 y 27; regiones variables de cadena pesada y ligera), las secuencias de aminoácidos de las cuales se derivaron de las secuencias de los anticuerpos anti-CD38 conocidos daratumumab (también llamado HuMax-CD38, divulgado en la publicación internacional N° WO 06/099875) y SAR650984 (divulgado en la publicación internacional N° WO 08/047242), respectivamente. Palivizumab (SYNAGIS®) (MedImmune), un anticuerpo aprobado clínicamente que reconoce el virus sincitial respiratorio sirvió como control negativo de la unión a CD38.

EJEMPLO 5: Detección de unión a Ab79 mediante inmunofluorescencia.

Se aplicó el tinte Alexa Fluor®-488 etiquetado como Ab79 a secciones congeladas de tejido colorrectal, próstata y linfa humanos normales. El tinte Alexa Fluor®-488 etiquetado como Palivizumab (Synagis®) sirvió como un control de tinción negativo. Las imágenes de inmunofluorescencia resultantes se muestran en la Figura 4. El patrón de tinción observado para Ab79 fue idéntico al visto con un anticuerpo anti-CD38 policlonal disponible comercialmente en tejido colorrectal, próstata y nodo linfático humanos normales (no se muestran los datos).

El tinte Alexa Fluor®-488 etiquetado como Ab79 también se aplicó a especímenes de médula ósea normales y con mieloma múltiple (no se muestran los datos). Mientras que el Ab79 unido a ~ 10% de las células de la médula ósea normal, >90% de las células de médula ósea con mieloma múltiple mostraron unión a Ab79 en 4 de 4 muestras analizadas.

También se examinó la capacidad de la Ab79 de unirse a una cantidad de líneas celulares (MOLP-8, DAUDI, RPMI y MCF7). Todas las células de MOLP-8 (mieloma múltiple humano), DAUDI (linfoblasto derivado de un paciente con linfoma de Burkitt) y RPMI (línea celular establecida a partir de un paciente con leucemia mielógena crónica) mostraron unión mediante Ab79. La línea de cáncer de mama, MCF7, resultó en gran medida negativa para la unión a Ab79 (no se muestran los datos).

Los anticuerpos conjugados con Alexa Fluor® 488 se tiñeron en secciones congeladas de criostato de 8 µm, las cuales se fijaron en una mezcla de etanol/acetona durante 5 minutos, seguido de incubación con los anticuerpos durante 1 hora a temperatura ambiente en una cámara con control de humedad.

Luego se lavaron las secciones, se agregó una solución montante que contenía DAPI (Vector Laboratories, cat N° 1500) y se aplicó un cubreobjetos.

EJEMPLO 6: Evaluación de expresión de Ab79 en mieloma múltiple (MM)

5 y leucemia linfocítica crónica (CLL).

Se analizó la unión de Ab79 a las muestras de médula ósea de pacientes con mieloma múltiple mediante citometría de flujo ya sea luego de enriquecimiento para células CD138⁺ o mediante la regulación en células CD138⁺CD45^{-/lo} (Figura 7A). Se descubrió que Ab79 se expresa en >95% de las células de cuatro de seis
10 muestras de mieloma múltiple. El patrón de unión de Ab79 resultó en gran medida similar al del anticuerpo anti-CD38 usado en laboratorios clínicos. Adicionalmente, células unidas por Ab79 de pacientes con leucemia linfocítica crónica (Figura 7B).

Para medir la unión de Ab79 a MM y CLL mediante FACS, se procesaron
15 las muestras de los pacientes dentro de un período de 24 horas. Se aislaron monocitos de sangre periférica con Ficoll-Paque™ (GE Healthcare) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se realizó el análisis de expresión usando los siguientes paneles de anticuerpos con clones entre paréntesis. Panel MM: Ab79-Alexa Fluor®-488, CD45-PerCP(2D1), CD138-APC (MI15). Panel CLL: Ab79-Alexa Fluor®-488; CD5-PE (UCHT2), CD45-PerCP(2D1), CD19-APC (SJ25C1).
20 Se agregaron 5 µL de anticuerpo etiquetado como PE, PerCP o APC o 10 µL de anticuerpo etiquetado como Alexa Fluor®-488 o isótopo de control a cada pocillo o tubo que contenía 100 µL de 0.2x10⁶ de PBMC o células enriquecidas con CD138 de aspirado de médula ósea. Las muestras se incubaron durante 30 minutos a
25 temperatura ambiente, después de lo cual se lisaron los glóbulos rojos usando BD Pharmlyse de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Todas las muestras se

lavarón tres veces en amortiguador FACS. Las muestras se fijaron en 1% de paraformaldehído y se analizaron en un BD FACSCanto™ II o BD FACSCaliber™.

EJEMPLO 7: Ensayos CDC inducidos por anti-CD38

5

Se analizaron clones de reacción cruzada de cinomolgo para determinar la capacidad de inducir citotoxicidad dependiente del complemento (CDC). Se colocaron células MOLP-8 a una densidad de 10,000 células por pocillo en una placa de cultivo tisular negra de fondo plano de 96 pocillos en 50 µL de medio completo (RPMI complementado con 10% de suero bovino fetal). Se agregaron 50 µL de 2x anticuerpo anti-CD38, anticuerpo IgG de control, o medio solo a cada pocillo y se dejó incubar a temperatura ambiente durante 10 minutos. Se agregaron cantidades variables (2-15 µL) de complemento de conejo purificado (cat N° CL 3441 Cedarlane Laboratories, Canadá) dependiendo de la línea celular, a cada pocillo excepto a los pocillos de control. Después de una hora de incubación a 37°C, las placas se llevaron a temperatura ambiente, se agregaron 100 µL de reactivo titulador de células CytoTox Glo™ (Promega G7571/G7573) por pocillo, la placa se agitó durante 5 a 7 minutos y se leyó la luminiscencia en un lector de placa luminiscente EnVision® (Perkin Elmer). Condiciones analizadas: células solas; células + complemento; células + IgG de control + complemento; células + anticuerpo + complemento. El % de CDC se calculó usando la siguiente ecuación:

$$100 - (RLU_T / RLU_C) \times 100,$$

donde RLU_T son las unidades de luminiscencia relativa de la muestra de prueba y RLU_C son las unidades de luminiscencia relativa de la muestra solo con complemento. Se llevó a cabo un análisis estadístico usando el software PRISM.

Los valores EC_{50} , como se determinaron a partir de gráficas de % CDC en comparación con concentración de anticuerpo, se muestran en la Tabla 1.

EJEMPLO 8: Ensayos ADCC inducidos por anti-CD38

5

La citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo (ADCC) se evaluó usando líneas celulares Daudi, MOLP-8 y RPMI-8226 como células diana. Las PCBM se aislaron como células efectoras mediante separación Ficoll-Plaque™ de capa leucocitaria o LRS los cuales se obtuvieron del Stanford Blood Center (Palo Alto, CA). Los especímenes se diluyeron 1:3 con 2% de FBS en PBS. Se segmentaron suavemente 15 mL de Ficoll-Plaque™ (GE Healthcare) bajo 35 mL de espécimen diluido y centrifugado a 1800 rpm (quiebre) durante 25 minutos. Se recogió la interfase turbia que contenía las PBMC, se lavó 3 veces en 2% de FBS en PBS y alícuotas congeladas de 50×10^6 células/mL por alícuota en 10% de DMSO/FBS. Las alícuotas de las PBMC congeladas se descongelaron y se cultivaron durante la noche en 10% de FBS/RPMI + 5 ng/mL de IL2 recombinante humana (R & D systems N° 202-IL) a 2×10^6 por mL, cuando fue necesario.

Para el ensayo de ADCC, todos los pasos se llevaron a cabo en medio completo. Se colocaron 5000 células diana por pocillo en una placa de 96 pocillos en 50 μ L de 3x anti-CD38, se agregó IgG de control o medio solo seguido de 50 μ L de PBMC efectoras humanas en una proporción de entre 01:25 a 01:50 células diana:efectoras (T:E). Las placas se centrifugaron brevemente durante ~ 30 segundos a 800 rpm para acercar todas las células. Después de 4 horas a 37°C, las placas se centrifugaron a 1100 rpm durante 5 minutos y se transfirieron 100 μ L de sobrenadante a una placa blanca. Se agregaron 100 μ L de reactivo CytoTox Glo™ (Promega cat N° G9292) al sobrenadante y las placas se dejaron agitando

durante 20-30 minutos a temperatura ambiente. La luminiscencia se leyó en un lector de placas luminiscente EnVision® (Perkin Elmer) y el porcentaje de lisis específica se calculó usando la siguiente ecuación:

$$(RLU_T/RLU_{E/T}) / (RLU_L/RLU_{E/T}) \times 100$$

- 5 donde RLU_T son las unidades de luminiscencia relativa de la muestra de prueba y $RLU_{E/T}$ son las unidades de luminiscencia relativa de la muestra que contiene células diana y células efectoras solas y RLU_L son las unidades de luminiscencia relativa para células lisadas con Triton X-100. Se llevó a cabo un análisis estadístico usando el software PRISM. Los valores EC_{50} , como se
- 10 determinaron a partir de gráficas de % de lisis específica en comparación con concentración de anticuerpo, se muestran en la Tabla 1.

TABLA 1 CDC, ADCC y actividad agonista para anticuerpos reformateados con IgG

Anticuerpo	CDC EC_{50} nM (MOLP-8)	ADCC EC_{50} nM (DAUDI)	ADCC EC_{50} nM (MOLP-8)	ADCC EC_{50} nM (RPMI-8226)	Apoptosis EC_{50} nM (DAUDI)
BM-1	0.48 ± 0.16	0.03 ± 0.02	0.036 ± 0.013	0.13 ± 0.03	0.057
BM-2	0.65 ± 0.18	0.04 ± 0.02	0.024 ± 0.005	0.15 ± 0.04	0.062
Ab19	0.98 ± 0.26	0.08 ± 0.03	0.038 ± 0.008	0.46 ± 0.15	0.032
Ab43	2.2	0.12 ± 0.09	0.027 ± 0.018	3.84 ± 1.34	1.56
Ab72	0.66 ± 0.49	0.14 ± 0.12	$0.193 \pm$	2.35 ± 0.99	0.35

			0.037		
Ab79	1.1 ± 0.39	0.03 ± 0.02	0.047 ± 0.012	0.46 ± 0.19	0.048
Ab110	1.99 ± 0.71	0.24 ± 0.17	0.874 ± 0.804	2.98 ± 0.91	0.40
Ab164	2.00 ± 0.83	ND	0.165 ± 0.154	1.2 ± 0.24	0.31

EJEMPLO 9: Determinación de afinidad mediante FACS

Las células MOLP-8 que expresan CD38 se suspendieron en 1% de amortiguador FBS en una concentración celular viable de aproximadamente 2 millones de células/mL. Los anticuerpos monoclonales a analizarse se diluyeron en serie (2 veces) a través de los pocillos sobre dos placas de 96 pocillos en 1x PBS. El último pocillo de cada titulación contenía solamente amortiguador. Se agregaron PBS y suspensiones celulares adicionales a cada pocillo para que el volumen final fuese 300 ~L/pocillo y cada pocillo contuviese aproximadamente 100,000 células. Los anticuerpos monoclonales se enumeran a continuación con el intervalo de concentración del punto de unión del anticuerpo monoclonal final (2X concentración molecular) utilizado para las titulaciones:

- Referencia 1, [mAb]sitio de unión= 50.8nM -49.7 pM
- Referencia 2, [mAb]sitio de unión= 49,5.8nM -48.3 pM
- Ab 43, [mAb]sitio de unión= 49,3.8nM -48.2 pM
- Ab 110, [mAb]sitio de unión= 204 nM -49.9 pM
- Ab 79, [mAb]sitio de unión=03 nM -25.3 pM
- Ab 72, [mAb]sitio de unión=103 nM -25.2 pM
- Ab 19, [mAb]sitio de unión=100nM -12.2 pM •

Las placas se colocaron en un agitador de placas durante 5 horas a 4°C, después de lo cual las placas se lavaron 3 veces a 4 °C con 1 X de PBS. Luego se agregaron 200 µl de anticuerpo policlonal específico de cabra anti-IgG Fc humana Cy5 99 nM (Jackson ImmunoResearch Laboratories, N° 109-175-008) a cada pocillo y las placas se agitaron durante 30 minutos a 4°C. Las placas se lavaron nuevamente 2x a 4 °C con 1X PBS, luego se uso un citómetro de flujo FACSCanto™ II HTS para registrar la intensidad de fluorescencia media (MFI) de 5000 eventos para cada pocillo que contenía una concentración en el sitio de unión de anticuerpo monoclonal única. Una gráfica de la intensidad de fluorescencia media como función de la concentración del sitio de unión del anticuerpo se ajustó de forma no lineal con software Scientist 3.0 utilizando la ecuación que sigue para calcular KD:

$$F = p[(KD + LT + n(M)) - \{(KD + LT + n(M))^2 - 4n(M)(LT)\}^{1/2}]/2 + B$$

donde F (intensidad de fluorescencia media), LT (concentración del sitio de unión de mAb total), p (constante de proporcionalidad que relaciona unidades de fluorescencia arbitrarias con mAb unida), M (concentración celular en molaridad; 0.553 fM basado en 100,000 células en 300 µl), n (cantidad de receptores por célula), B (señal de fondo) y KD=constante de disociación de equilibrio.

Para cada curva de titulación de anticuerpo, se obtuvo un estimado para KD ya que P, n, B y KD se flotaron libremente en el análisis no lineal. Para un derivación detallada de la ecuación que antecede, véase Drake y Klakamp (2007), "A rigorous multiple independent binding site model for determining cell-based equilibrium dissociation constants," J. Immunol. Methods 318: 157-62, que se incorpora a la presente expresamente a modo de referencia. La Tabla 3 enumera

las KD resultantes para todos los anticuerpos en orden de afinidad decreciente junto con el intervalo de confianza de 95% de cada ajuste entre paréntesis. La concentración del sitio de unión del anticuerpo (2X la concentración molecular) se usó para el ajuste de curva no lineal.

5

EJEMPLO 10: Determinación de afinidad mediante Biacore®

La afinidad de los anticuerpos IgG al ectodominio CD38 soluble (ECD) se determinó mediante análisis de resonancia de plasmones superficiales (SPR) en una Biacore™ A100 a 22°C. El anticuerpo policlonal IgG de cabra anti-humano (Caltag H10500) se inmovilizó en un chip biosensor CM5 usando acoplamiento estándar de amina en los puntos 1, 2, 4 y 5 dentro de las cuatro células de flujo del chip. Los niveles de inmovilización de cada punto varió de 5865 RU a 6899 RU. La CD38 humana se obtuvo de R&D Systems (Cat N° 2404-AC, Lote N° PEH020812A). La concentración madre de CD38 se determinó usando métodos detallados en Pace et ál. (1995) "How to measure and predict molar absorption coefficient of a protein" *Protein Science* 4(11):2411-23 y Pace y Grimsley (2004) "Spectrophotometric determination of protein concentration," en *Current Protocols in Protein Science*, Capítulo 3: Unidad 3.1, incorporándose la enseñanza de cada referencia a la presente mediante esta referencia.

Se preparó amortiguador de corrida desgasificando solución salina amortiguada con HEPEs, 0.005% de polisorbato 20 y agregando BSA filtrado a una concentración final de 100 µg/mL. Los ocho mAbs purificados se diluyeron a aproximadamente 2 µg/mL con amortiguador de corrida. Los experimentos preliminares estimaron la cantidad de cada mAb a ser capturado para mantener una capacidad de superficie ($R_{\text{máx}}$) no mayor a ~100 RU. Para cada ciclo de

captura de mAb/inyección de antígeno, se capturó un mAb en los puntos 1 y 5 dentro de cada célula de flujo sirviendo los puntos 2 y 4 yuxtapuestos como las superficies de referencia respectivas. Cada mAb diluido se capturó durante 1 minuto a una velocidad de flujo de 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ seguido de tres minutos de amortiguador de corrida fluyente para estabilizar la superficie. Se inyectó huCD38 en las cuatro células de flujo durante 120 segundos a 30 $\mu\text{L}/\text{min}$ en un intervalo de concentración de 193.7 nM -3.0 nM (2x dilución en serie) seguido de una fase de disociación de 15 minutos. Todas las muestras se prepararon en el amortiguador de corrida y se inyectaron aleatoriamente en triplicado con siete inyecciones de amortiguador intercaladas para referencia doble. Las superficies se regeneraron con dos pulsos de 20 segundos de 10 mM de glicina, pH 1.7.

Todos los datos del sensograma se procesaron con software Scrubber 2.0c y se ajustaron globalmente a un modelo de interacción 1: 1 en Scrubber 2.0c. Las constantes de unión resultantes se muestran en la Tabla 2.

TABLA 2

Anticuerpo	FACS KD (nM) MOLP-8	FACS KD (pM) RPMI-8226	Biacore Ka (M-1s-1)	Biacore Kd (s-1)	Biacore KD (nM)
BM-1	1.1 (0.9).	802	4.49×10^4	2.46×10^{-3}	54.8
BM-2	1.6 (0.6).	428	4.24×10^5	2.27×10^{-3}	5.4
Ab19	0.4 (0.3).	-	1.54×10^5	8.10×10^{-4}	5.3
Ab79	1.2 (1.1).	508	1.22×10^5	6.75×10^{-4}	5.5
Ab72	0.6 (0.4).	-	1.44×10^4	1.82×10^{-3}	126
Ab110	1.0 (0.1).	-	1.22×10^5	1.71×10^{-1}	1400
Ab43	1.1 (0.3).	-	2.72×10^5	1.46×10^{-1}	537

Ab164	1.4 (0.7).	-	1.99×10^5	7.15×10^{-2}	359
-------	------------	---	--------------------	-----------------------	-----

EJEMPLO 11: Ensayos de internalización de inmunofluorescencia.

Se utilizaron técnicas de inmunofluorescencia para evaluar la internalización de anticuerpos anti-CD38 en células MOLP-8. Se recogieron células MOLP-8 y se tiñeron 5×10^6 de células durante 10 minutos a 4°C en RPMI-1640 con 1 µg de cada anticuerpo anti-CD38 conjugado directamente con Alexa Fluor® 488. Las células se lavaron en PBS que contenía 1 % de BSA y se incubaron 1×10^6 de células durante 3 o 6 horas a 4°C o 37°C. Se inactivó la tinción de superficie durante 30 minutos a 4°C usando 2 µg de anticuerpo de conejo anti-Alexa Fluor®-488 (Invitrogen). Las células se lavaron y se fijaron en PBS con 1% de PFA, se transfirieron a una placa de 96 pocillos Microtest (BD Biosciences) y se evaluaron mediante citometría de flujo usando un citómetro de flujo FACSCanto™ II (BD Biosciences) o se visualizaron usando un ImageXpress® Micro (Molecular Devices) con una magnificación 20x.

EJEMPLO 12: *Binning* de epítomos mediante Biacore®

Se uso instrumentación Biacore® A100 para unir los dos anticuerpos de referencia así como Ab 19 y Ab 79. Primero se inmovilizaron los anticuerpos a densidades altas y bajas en un chip CM5 usando química de acoplamiento NHS/EDC. Para cada ciclo del experimento de *binning* del epítomo, la CD38 se inyectó primero sobre estas superficies. De forma análoga a un ensayo tipo sándwich en un formato ELISA, luego se inyectó un anticuerpo único (tomado del grupo de anticuerpos inmovilizados) sobre las superficies que contenían CD38/complejos de anticuerpos. Las superficies se regeneraron usando pulsos de

ácido fosfórico al final de cada ciclo. Los datos se recogieron a 22°C usando HBS-P (10 HEPES 10 mM pH 7.4, NaCl 150 mM, 0.005%) P-20) complementado con BSA. Los sensogramas resultantes se procesaron usando el módulo de mapeo de epítomos en el paquete de software de evaluación Biacore® A100 así como la

5 versión de prueba de Scrubber para grupos de datos A100. Se usaron datos replicados para generar una matriz binaria 4 x 4 para los 4 mAbs que preceden de dos experimentos separados, como se muestra en la Tabla 3.

TABLA 3

	Ab79	BM1	Ab19	BM2
Ab79	0	0	1	1
BM1	0	0	1	0
Ab19	1	1	0	0
BM2	1	0	0	0

10

EJEMPLO 13: Análisis *in vivo* en oncología

La eficacia *in vivo* de Ab19 y Ab79 se analizó en un modelo de Daudi-luciferasa diseminado de linfoma humano. Ratones hembra de 6-8 semanas de

15 edad CB.17 SCID de Taconic Laboratories fueron inyectados de manera intravenosa con 1×10^6 de células tumorales Daudi-Luc. Al 7mo día del estudio los ratones se trataron intraperitonealmente con: palivizumab, Ab 79, Ab19, referencia 1 y referencia 2. Se llevó a cabo visualización bioluminiscente semanalmente a

20 partir del día 21 usando el sistema IVIS Xenogen (Caliper Life Sciences) para monitorear la carga tumoral. Para la visualización, los animales fueron inyectados intraperitonealmente con sustrato de luciferasa (150 mg/kg) 10 minutos antes de la

imagenología, luego los animales fueron anestesiados con isoflurano y visualizados. Los resultados se muestran en las Figuras 8 y 9.

EJEMPLO 14: Correlación de enfermedad inflamatoria/inmunológica

5

Se demostró que la CD38 se regula dramáticamente por aumento en células PBMC luego de la activación. En PMBC en reposo de donantes normales, menos del 20% de las células en reposo expresan la CD38, donde la cantidad de receptores se calcula como aproximadamente 10,000-20,000 por célula. Las
10 PMBC activadas, nuevamente de donantes normales, exhibieron un 60-75% de las células que expresaban CD38, con la cantidad de receptores presentando 110,000 a 160,000 por célula.

Además, como se muestra en la Figura 5, la CD38 presentó expresión
15 aumentada en PMBC de pacientes con SLE.

Las muestras se analizaron inmunohistológicamente para determinar la sobreexpresión de CD38. Se analizaron 19 muestras de pacientes con SLE, dando como resultado la observación de un aumento en la expresión de CD38 en
20 células B y T de memoria y pDC. Se analizaron 3 pacientes con RA, exhibiendo la infiltración de células plasmáticas CD38 en tejido sinovial en los tres pacientes, así como un aumento en la tinción de los tejidos sinoviales con Ab79. Se analizaron 7 pacientes con enfermedad de Crohn y 6 pacientes con colitis ulcerosa y exhibieron la infiltración de células plasmáticas que expresan CD38 en el músculo liso del
25 colon (analizado en dos muestras celulares primarias de pacientes). Cabe destacar que se analizó el mismo número de pacientes normales que no exhibieron estos resultados.

EJEMPLO 15: Agotamiento usando anticuerpos anti-CD38

5 Dosificar monos cinomolgos con Ab79 muestra una disminución significativa en linfocitos, células B y T y células NK. El anticuerpo se dosificó a través de una infusión intravenosa de 30 minutos a las dosificaciones que se muestran en la Figura 6 con los datos recogidos a las 24 horas. Datos similares se sembraron en los días 4, 7, 11 y 18.

10 Sin embargo, los datos de pK/pD muestran la recuperación de los animales luego de la dosificación. Como se muestra en la Figura 7, el conteo de linfocitos fue similar a los conteos de control después de un período de días luego de una única dosis de infusión intravenosa de 30 minutos, incluso después de la dosis más alta, indicando que no hay problemas con las células madre linfoides.

15

EJEMPLO 16: Modelos de enfermedad autoinmune

Se usan tres modelos diferentes.

Un modelo de ratón HuScid sirvió como un modelo seudo injerto contra
20 hospedador así como un modelo para respuesta anti-tétanos, agotamiento de IgG y supervivencia general. Se inyectaron ratones CB17/HuSCID con ASGM1 para agotar células NK y luego se inyectaron con PBMC humanas un día después. Se permitió que el injerto continuara durante 7-10 días con suero recogido de aleatorización de Ig humana. Un día después, se inyectaron los ratones con Ab79
25 a 10 mg/kg seguido por TTd con una segunda dosis 4 días después, una tercer dosis 3 días después de eso, con conteo de suero recogido de Ig humana y detección anti-tétano 3 días después de eso (total de 10 días después de la

primera dosis). La Figura 8 muestra los resultados de un único donante ratón, los cuales indican reducciones significativas de todos los isotipos Ig luego del tratamiento. La Figura 9 muestra los resultados de los niveles promedio de Ig para cada grupo de destinatarios; cada punto de datos representa el valor promedio por grupo (n=5 a n=10). La Figura 10 muestra la reducción significativa de la respuesta anti-tétanos luego del tratamiento con AB79. Finalmente, la Figura 11 muestra la supervivencia significativa general usando el tratamiento con Ab79.

Experimentos con ratón sustituto

10

Como Ab79 no presenta reactividad cruzada con la CD38 de roedor, se desarrolló un anticuerpo sustituto. Como asunto preliminar, usando un anticuerpo comercial para la CD38 humana y un anticuerpo comercial para la CD38 humana, se muestran diferencias significativas en los niveles de expresión de CD38 entre los tipos de células entre las humanas y las de ratón (véase la Figura 12), mostrando que la biología de la enfermedad es diferente. Por lo tanto, usar anticuerpos que presentan reactividad cruzada con la CD38 de mono en modelos de monos puede proporcionar resultados significativamente mejores.

20

Se desarrollo un anticuerpo sustituto que muestra agotamiento similar al de la células C38+ cultivado de bazo, sangre y médula ósea (no se muestran los datos) así como de sangre periférica (véase la Figura 13). Además, la cinética del agotamiento se muestra en la Figura 14 con bazo, sangre y médula ósea recogidos a los 1, 2 o 3 días después de una única dosis de sustituto de ratón a 10 mg/kg Se mostró un agotamiento rápido de células B en la sangre dentro de 24 horas, con un agotamiento más lento en bazo y médula ósea.

25

Modelo de SLE de ratón

- La anti-CD38 de ratón sustituto se prueba en el modelo MRL/lpr, usando las siguientes lecturas de interín (por ejemplo, cada dos semanas), de sangre:
- 5 autoanticuerpos anti-ADNdc, CBC, FACS para agotamiento de células T/B, proteína albúmina en orina e inflamación de la piel. Las lecturas terminales incluyen, a modo no taxativo, de sangre: autoanticuerpos anti-ADNdc, CBC, FACS para agotamiento de células T/B, de bazo, nódulos linfáticos y médula ósea: peso de órganos, cantidad de células inmunes, FACS para agotamiento de células T/B,
- 10 para riñón: peso de órganos, histópato (H&E y PAS), disposición de IC, células inflamatorias e inflamación de la piel (histópato).

Modelo de artritis inducida por colágeno (CIA)

- 15 Un modelo de CIA de ratones se usó utilizando el anticuerpo sustituto de ratón con 7 grupos de ratones para evaluar la eficacia pro-profiláctica, profiláctica y terapéutica. Todos los ratones fueron inmunizados con CII/CFA en el día 0, con un refuerzo de CII/CFA en el día 21, dando como resultado generalmente la progresión de la enfermedad del día 21 al día 42 (finalización del estudio). El
- 20 grupo 1 (10 ratones) fue inyectado intraperitonealmente con 10 mg/kg de anticuerpo sustituto dos veces por semana, comenzando el día 0 (pro-profiláctico). El grupo 2 (n=10) fue dosificado de manera similar pero comenzando el día 21. El grupo 3 (n=10) fue inyectado de manera similar en el comienzo de la enfermedad (día 25-28). El grupo 4 (n=10) fue dosificado en el mismo nivel pero con una hlgG1
- 25 (por ej. isótopo) el día 0. El grupo 5 (n=10) fue dosificado en el mismo nivel con hlgG1 pero comenzando el día 21. El grupo 6 (n=10) fue dosificado el día 21 con 0.5 mg/l de agua de dexametasona y el grupo 7 (n=5) no fue tratado.

Se realiza un estudio de CIA de mono cinomolgo usando n=3 para cada grupo, el grupo 1 está conformado por animales no sometidos previamente a experimentación, sólo vehículo. El grupo 2 es una única dosis de Ab79 a 3 mg/kg o 10 mg/kg, q1w (los tratamientos profilácticos empiezan en el día 7 luego de la inmunización de colágeno). El grupo 3 es Ab79 a 3 mg/kg o 10 mg/kg de q1w, para tratamiento terapéutico comenzando al inicio de la enfermedad, en el día 21 o día 28. El grupo 4 se trata con 0.1 mg/kg de q1d con dexametasona, también al inicio de la enfermedad.

10

Habiendo descrito la invención en detalle y mediante referencia a modalidades específicas de la misma, será entonces aparente que las modificaciones y variaciones son posibles sin apartarse del alcance de la invención definida en las reivindicaciones adjuntas. Más específicamente, aunque algunos aspectos de la presente invención se identifican en la presente como particularmente ventajosos, se contempla que la presente invención no se limita necesariamente a estos aspectos particulares de la invención.

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo aislado que une específicamente a la CD38 humana (SEQ ID NO: 1) y CD38 de cinomolgo (SEQ ID NO:2) que comprende:
 - 5 a) una región variable de cadena pesada que comprende:
 - i) una primera CDR que comprende la SEQ ID NO:3;
 - ii) una segunda CDR que comprende la SEQ ID NO:4;
 - iii) una tercera CDR que comprende la SEQ ID NO:5 y
 - b) una región variable de cadena ligera que comprende:
 - 10 i) una primera CDR que comprende la SEQ ID NO:6;
 - ii) una segunda CDR que comprende la SEQ ID NO:7;
 - iii) una tercera CDR que comprende la SEQ ID NO:8;
2. Un anticuerpo aislado de acuerdo con la reivindicación 1 donde dicha región
15 variable de cadena pesada comprende la SEQ ID NO:9.
3. Un anticuerpo aislado de acuerdo con la reivindicación 1 donde dicha
región variable de cadena ligera comprende la SEQ ID NO:10.
- 20 4. Un anticuerpo aislado de acuerdo con la reivindicación 1, donde dicha
región variable de cadena pesada comprende la SEQ ID NO: 9 y dicha
región variable de cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 10.
- 25 5. Un anticuerpo aislado de acuerdo con la reivindicación 1, donde la cadena
pesada comprende la SEQ ID NO: 21 y la cadena ligera comprende la SEQ
ID NO: 22.

6. Un anticuerpo aislado que une específicamente a la CD38 humana (SEQ ID NO: 1) y la CD38 de cinomolgo (SEQ ID NO:2) que comprende:
- a) una región variable de cadena pesada que comprende:
- i) una primera CDR que comprende la SEQ ID NO:13;
- 5 ii) una segunda CDR que comprende la SEQ ID NO:14;
- iii) una tercer CDR que comprende la SEQ ID NO:15 y
- b) una región variable de cadena ligera que comprende:
- i) una primera CDR que comprende la SEQ ID NO:16;
- 10 ii) una segunda CDR que comprende la SEQ ID NO:17;
- iii) una tercera CDR que comprende la SEQ ID NO:18;
7. Un anticuerpo aislado de acuerdo con la reivindicación 1 donde dicha región variable de cadena pesada comprende la SEQ ID NO:19.
- 15 8. Un anticuerpo aislado de acuerdo con la reivindicación 1 donde dicha región variable de cadena ligera comprende la SEQ ID NO:20.
9. Un anticuerpo aislado de acuerdo con la reivindicación 1, donde dicha región variable de cadena pesada comprende la SEQ ID NO: 19 y dicha
- 20 región variable de cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 20.
10. Un anticuerpo aislado de acuerdo con la reivindicación 1, donde la cadena pesada comprende la SEQ ID NO: 34 y la cadena ligera comprende la
- 25 SEQ ID NO: 35.
11. Un anticuerpo aislado de acuerdo con la reivindicación 1 o 6 que además comprende un dominio Fc.

12. Un anticuerpo aislado de acuerdo con la reivindicación 11 donde dicho dominio Fc es humano.
- 5 13. Un anticuerpo aislado de acuerdo con la reivindicación 7 donde dicho dominio Fc es humano es un dominio Fc variante.
14. Un ácido nucleico aislado que codifica la cadena pesada de la reivindicación 2 o 7.
- 10 15. Un ácido nucleico aislado que codifica la cadena ligera de 3 o 8.
16. Una célula hospedadora que comprende los ácidos nucleicos aislados de las reivindicaciones 14 o 15.
- 15 17. Un método para producir el anticuerpo de la reivindicación 16 que comprende cultivar la célula hospedadora de la reivindicación 11 en condiciones donde se produce dicho anticuerpo.
- 20 18. Un método para inhibir la actividad biológica de la proteína CD38 humana (SEQ ID NO: 1) y la CD38 de cinomolgo (SEQ ID NO:2) poniendo en contacto dicha proteína con un anticuerpo que interactúa con al menos K121, F135, Q139, D141, E239, W241, C275, K276, F284, P291 y E292 de SEQ ID NO:1 y SEQ ID NO:2.
- 25 19. Un método para tratar una enfermedad autoinmune que comprende administrar a un paciente que lo necesita un anticuerpo aislado que une

específicamente la CD38 humana (SEQ ID NO:1) y CD38 de cinomolgo (SEQ ID NO:2) que comprende:

a) una región variable de cadena pesada que comprende:

i) una primera CDR que comprende la SEQ ID NO:3;

5 ii) una segunda CDR que comprende la SEQ ID NO:4;

iii) una tercera CDR que comprende la SEQ ID NO:5 y

b) una región variable de cadena ligera que comprende:

i) una primera CDR que comprende la SEQ ID NO:6;

ii) una segunda CDR que comprende la SEQ ID NO:7;

10 iii) una tercera CDR que comprende la SEQ ID NO:8;

20. Un método de acuerdo con la reivindicación 19 donde dicha enfermedad autoinmune se selecciona del grupo que consiste en artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico, enfermedad inflamatoria intestinal, colitis
15 ulcerosa y enfermedad de injerto contra huésped.

FIGURE 1

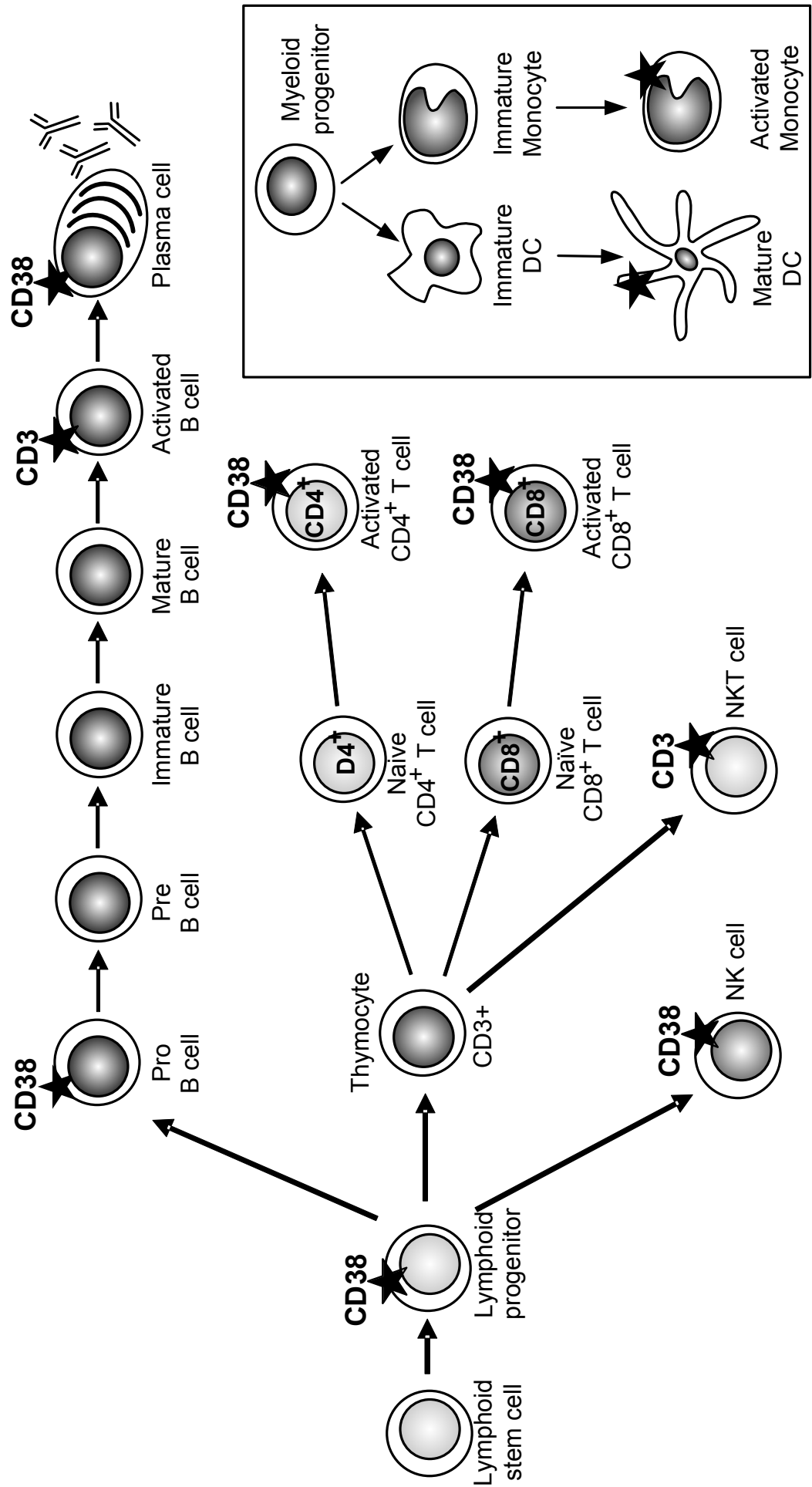


FIGURE 2A

Ab79 Heavy Chain (SEQ ID NO:21)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFDDYGMWVRQAPGKGLEWVSDIS
WNGGKTHYVDSVKGQFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGSLFH
DSSGFYFGHWGQGT LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF
PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVN
HKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTP
EVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV
LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTK
NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDS DGSFFLYSKLTVD
KSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Ab79 Light Chain (SEQ ID NO:22)

QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGDNYVSWYQQLPGTAPKLLIYRDSQ
RPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCQSYDSSLSGSVFGGGT KL
VLGQPKANPTVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADGSPVK
AGVETTKPSKQSN NKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAP
TECS

Ab19 Heavy Chain (SEQ ID NO:11)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFN NYDMTWVRQAPGKGLEWVAVI
SYDGSDKDYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVYYY
GFSGPSMDVWGQGT LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY
FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVN
HKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTP
EVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV
LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTK
NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDS DGSFFLYSKLTVD
KSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

FIGURE 2B

Ab19 Light Chain (SEQ ID NO:12)

QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSNSNIGSNTVNWYQQLPGTAPKLLIYSDSN
RPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCQSYDSSLSGSRVFGGGT KL
TVLGQPKANPTVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADGSPV
KAGVETTKPSKQSN NKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTV A
PTECS

FIGURE 3

CD38 *Homo sapiens* (Accession NP_001766.2; SEQ ID NO:1)

MANCEFSPVSGDKPCCRLSRRAQLCLGVSLVLILVVVLAVVVPRWRQQWSGPGTTKR
FPETVLARCVKYTEIHPEMRHVDCQSVWDAFKGAFISKHPCNITEEDYQPLMKLGTQT
VPCNKILLWSRIKDLAHQFTQVQRDMFTLEDTLGYLADDLTWCGEFNTSKINYQSCP
DWRKDCSNNPVSVFWKTVSRRFAEAACDVVHVMLNGSRSKIFDKNSTFGSVEVHNLQ
PEKVQTTLEAWVIHGGREDSRDLCQDPTIKELESIISKRNIFSCCKNIYRPDKFLQCVKNPE
DSSCTSEI

CD38 *Macaca fascicularis/Cynomolgus/Crab eating macaque* (Accession AAT36330.1; SEQ ID NO:2)

MANCEFSPVSGDKPCCRLSRRAQVCLGVCLLVLLILVVVVAVVLPWRWRQQWSGSGTTS
RFPETVLARCVKYTEVHPEMRHVDCQSVWDAFKGAFISKYPCNITEEDYQPLVKLGTQ
TVPCNKTLTWSRIKDLAHQFTQVQRDMFTLEDMLLGYLADDLTWCGEFNTFEINYQSC
PDWRKDCSNNPVSVFWKTVSRRFAETACGVVHVMLNGSRSKIFDKNSTFGSVEVHNL
QPEKVQALEAWVIHGGREDSRDLCQDPTIKELESIISKRNIRFFCKNIYRPDKFLQCVKN
PEDSSCLSGI

FIGURE 4

BM2		BM1		TSF19		TSF79	
E	76	N	120	G	91	K	121
H	79	K	121	E	103	F	135
E	104	F	135	E	104	Q	139
Q	107	Q	139	D	105	D	141
M	110	D	141	Q	107	M	142
K	111	D	202	M	110	E	239
L	112	V	203	K	111	W	241
G	113	H	205	T	114	S	274
T	114	Q	236	Q	115	C	275
Q	115	T	237	T	148	K	276
T	116	E	239	V	192	F	284
V	117	W	241	R	194	V	288
C	119	Q	272	R	195	K	289
T	148	F	273	F	196	N	290
L	150	S	274	E	198	P	291
T	191	C	275	A	199	E	292
V	192	K	276	H	228	D	293
R	194	F	284	N	229	S	294
R	195	P	291	Q	231		
F	196	E	292	E	233		
E	198	T	297	K	234		
A	199	S	298				
Q	231						
E	233						
K	234						

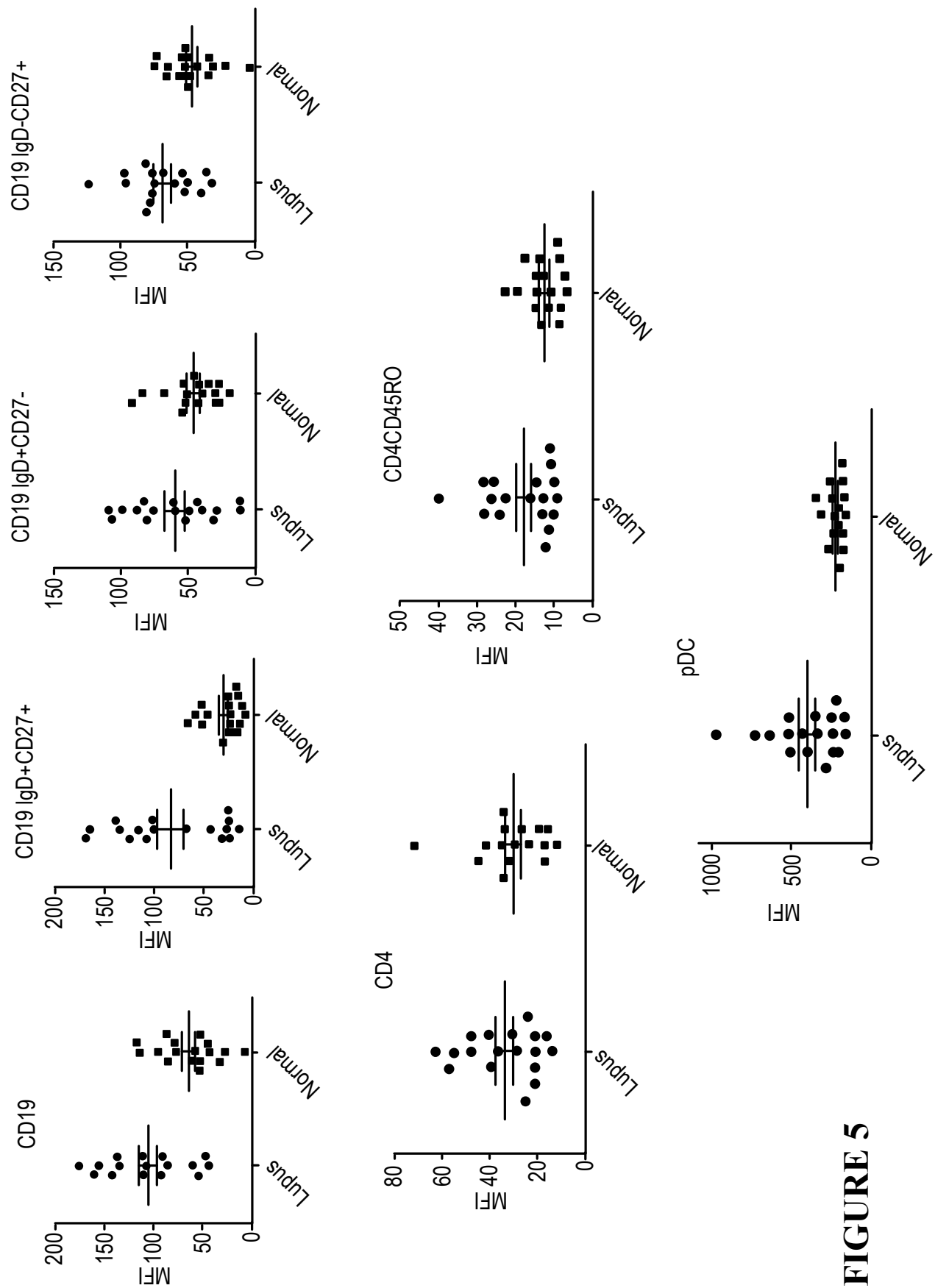


FIGURE 5

6 / 13

FIGURE 6

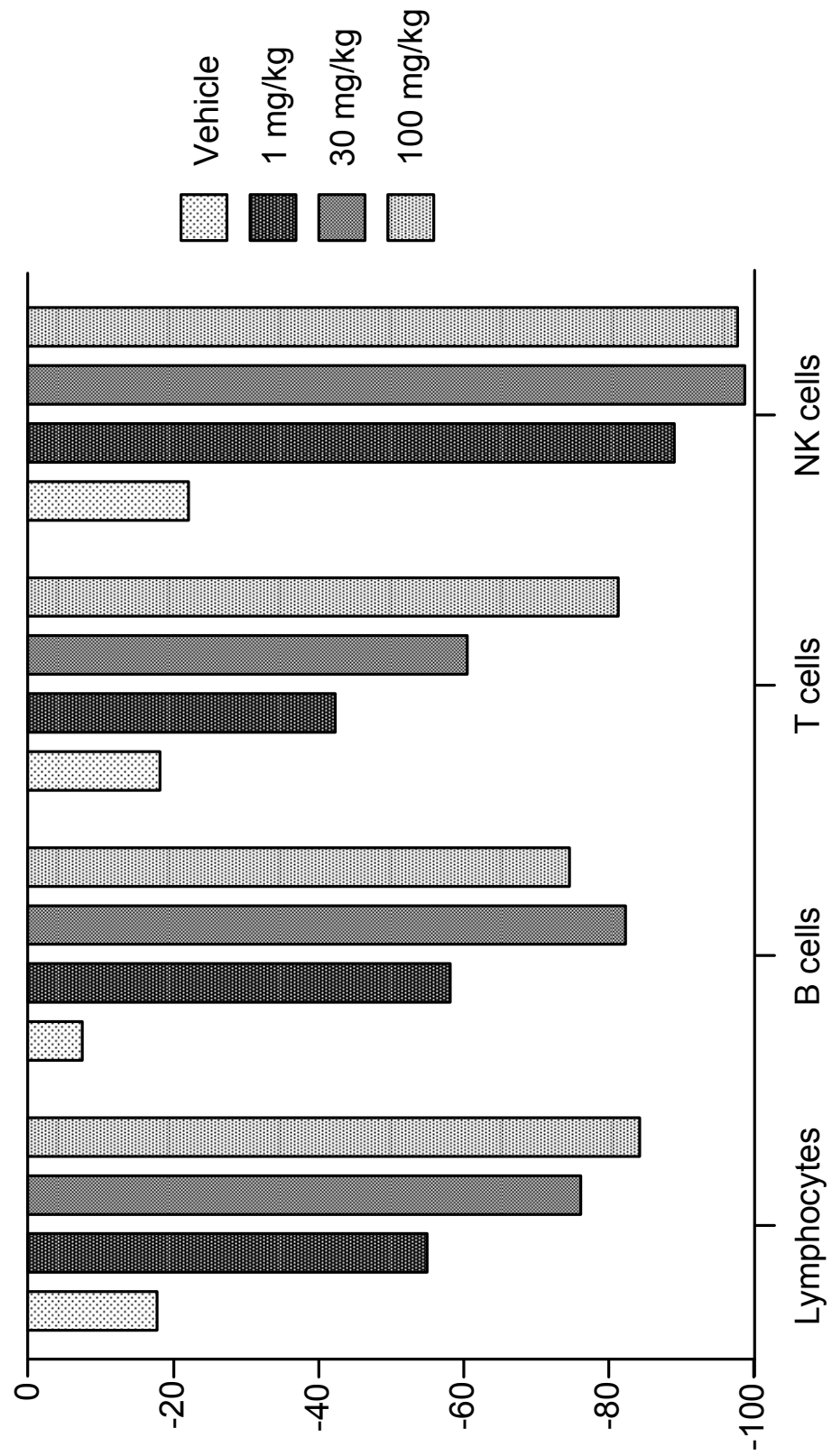


FIGURE 7

Single Dose TSF79

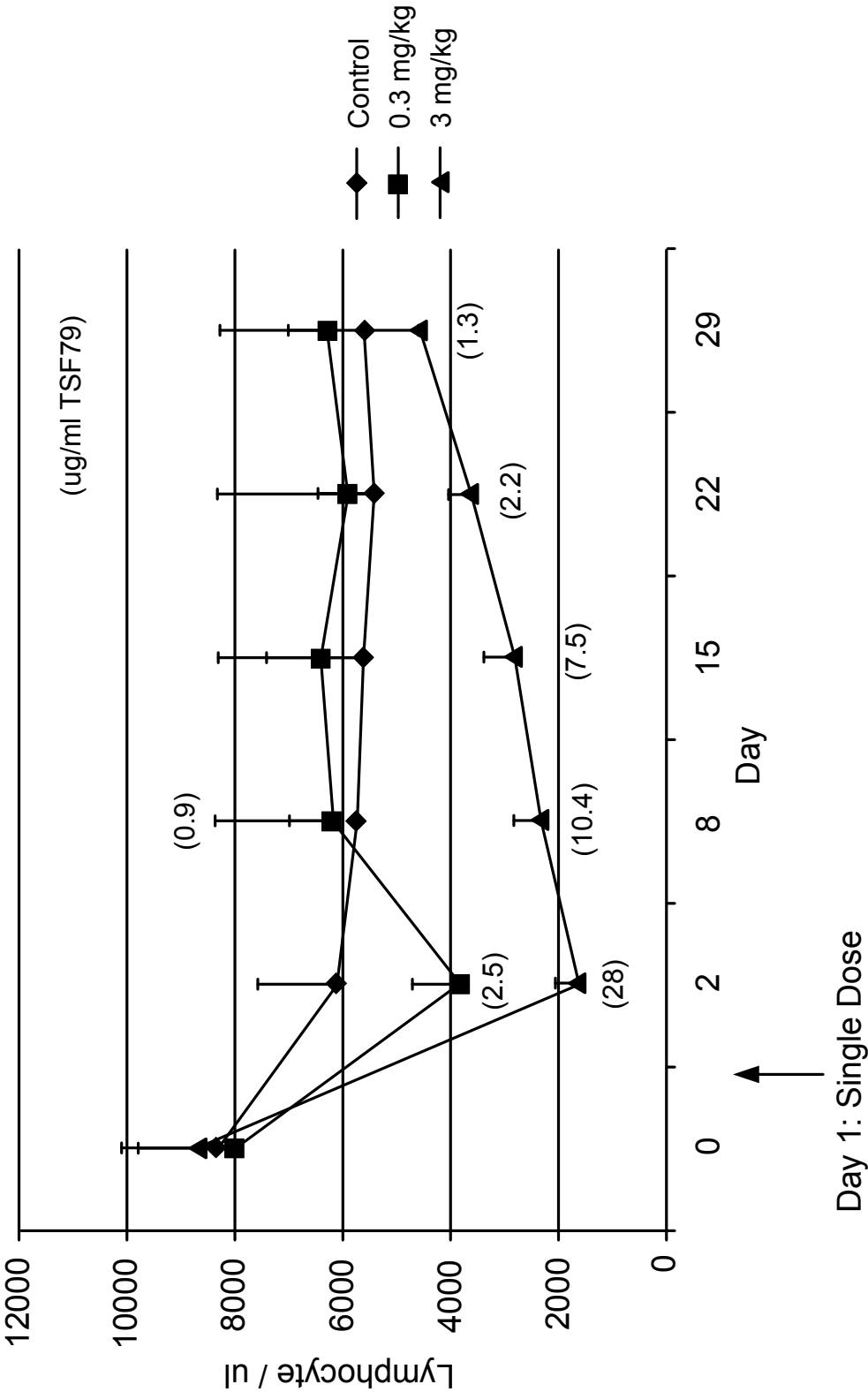


FIGURE 8

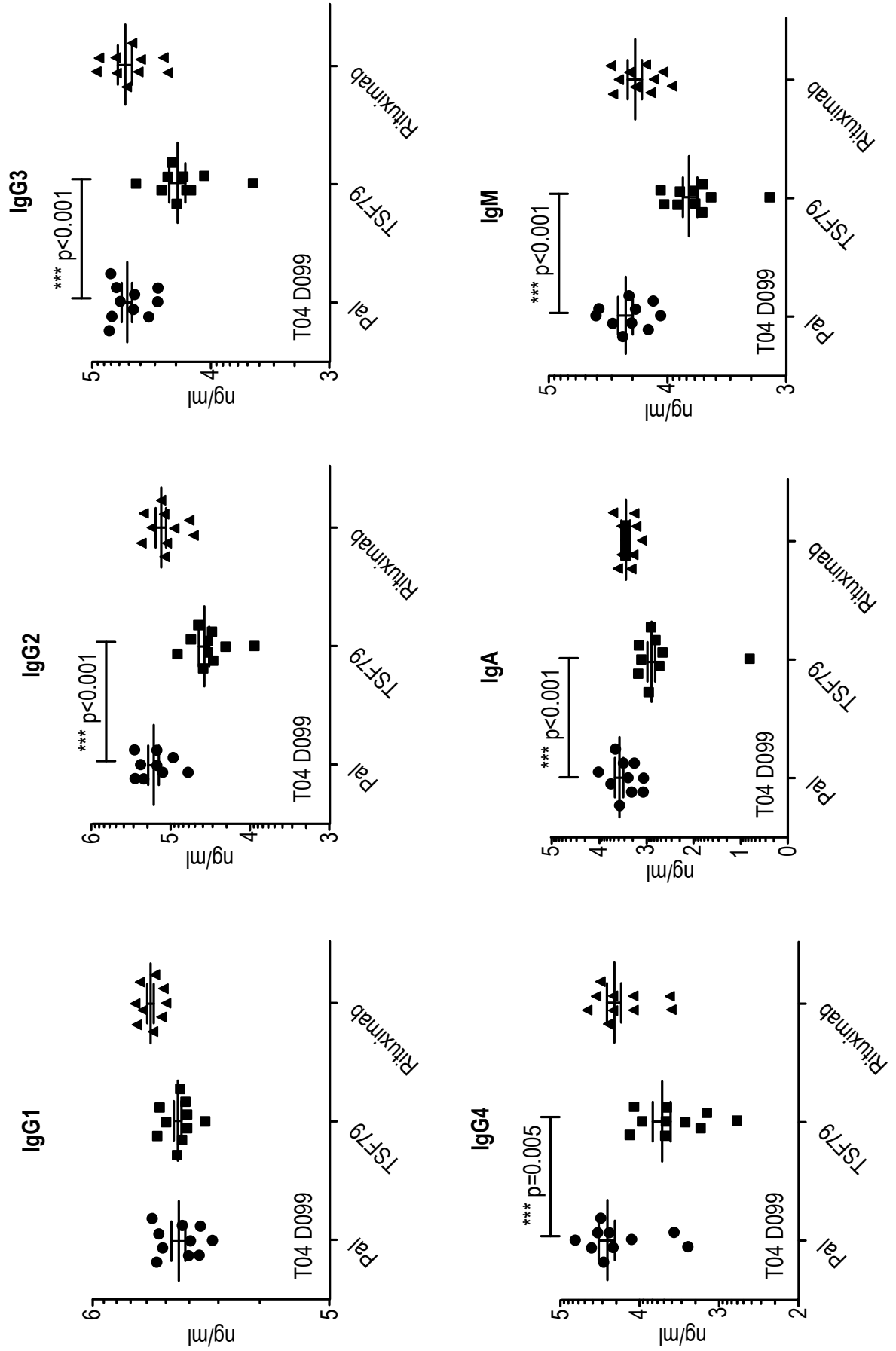


FIGURE 10

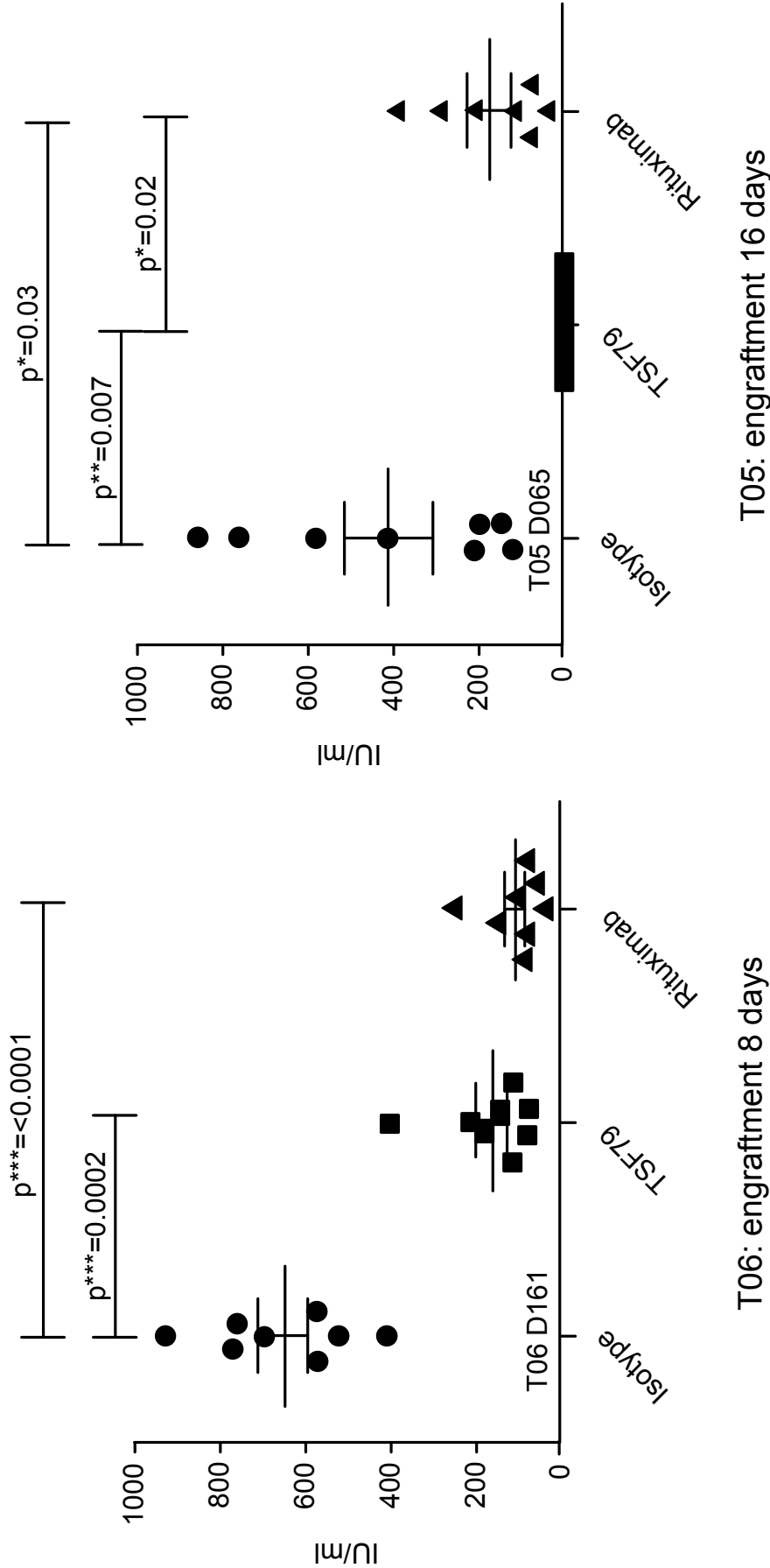
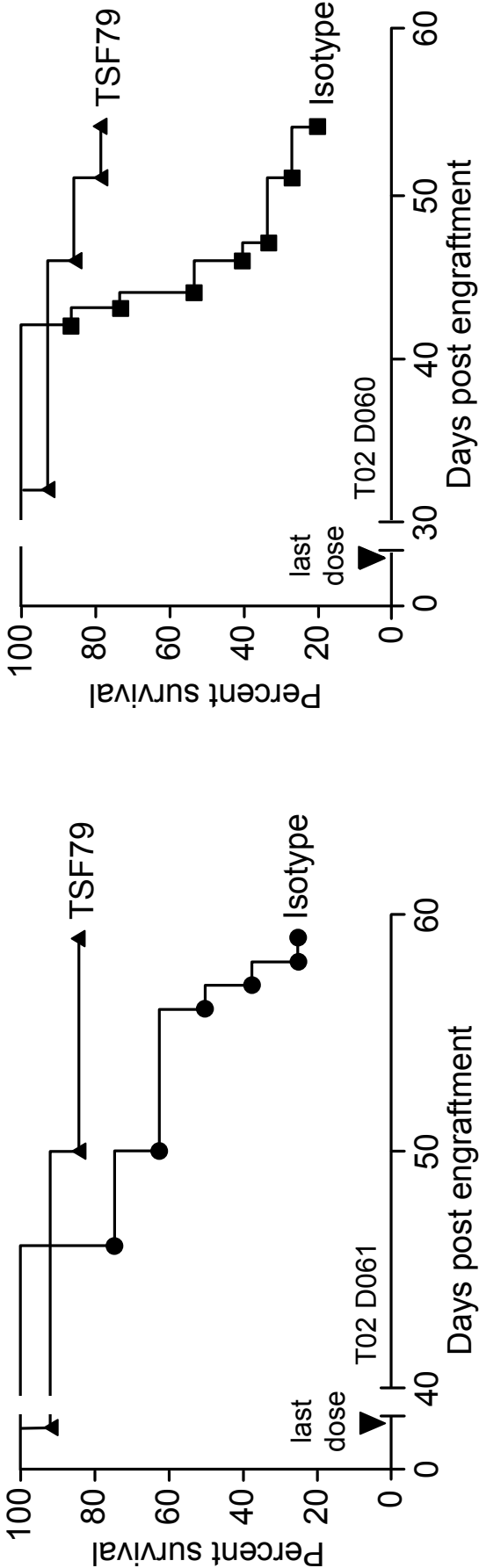


FIGURE 11

Survival



Log-rank (Mantel-Cox) Test: p=0.009

Log-rank (Mantel-Cox) Test**p=0.0018

FIGURE 12

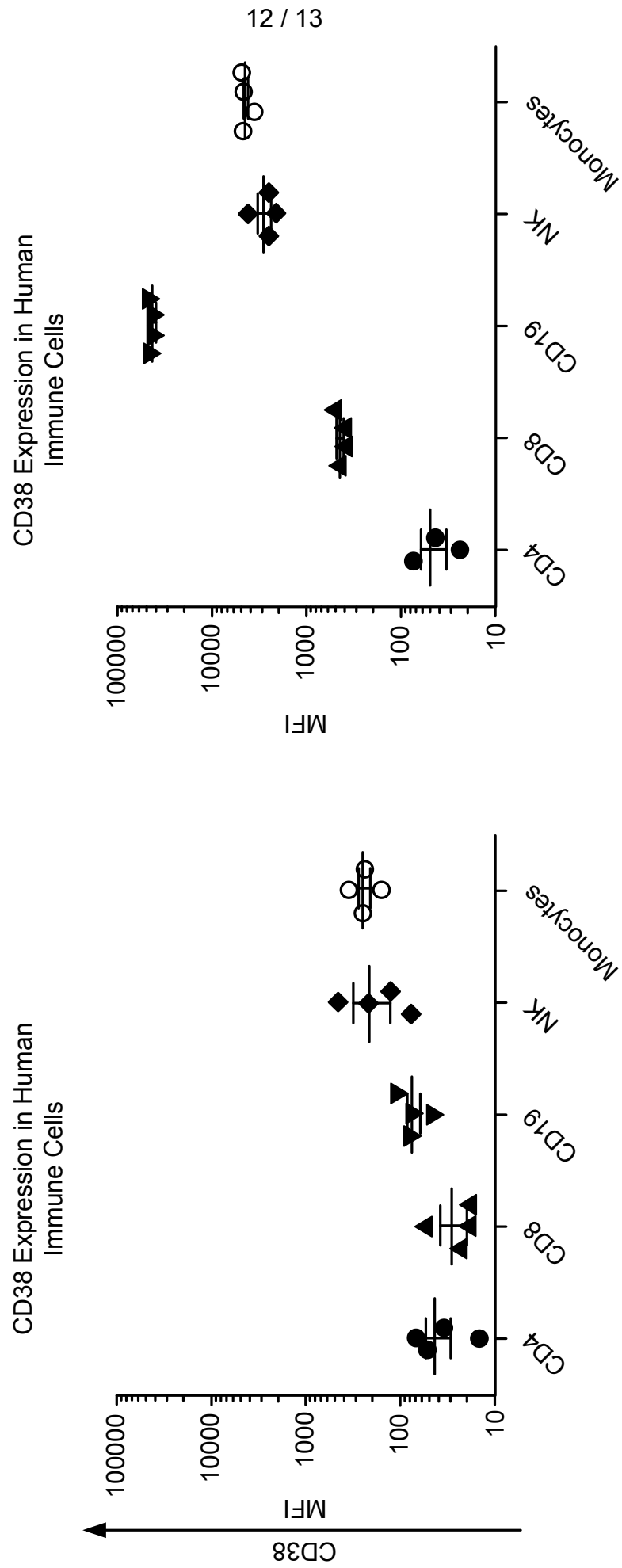
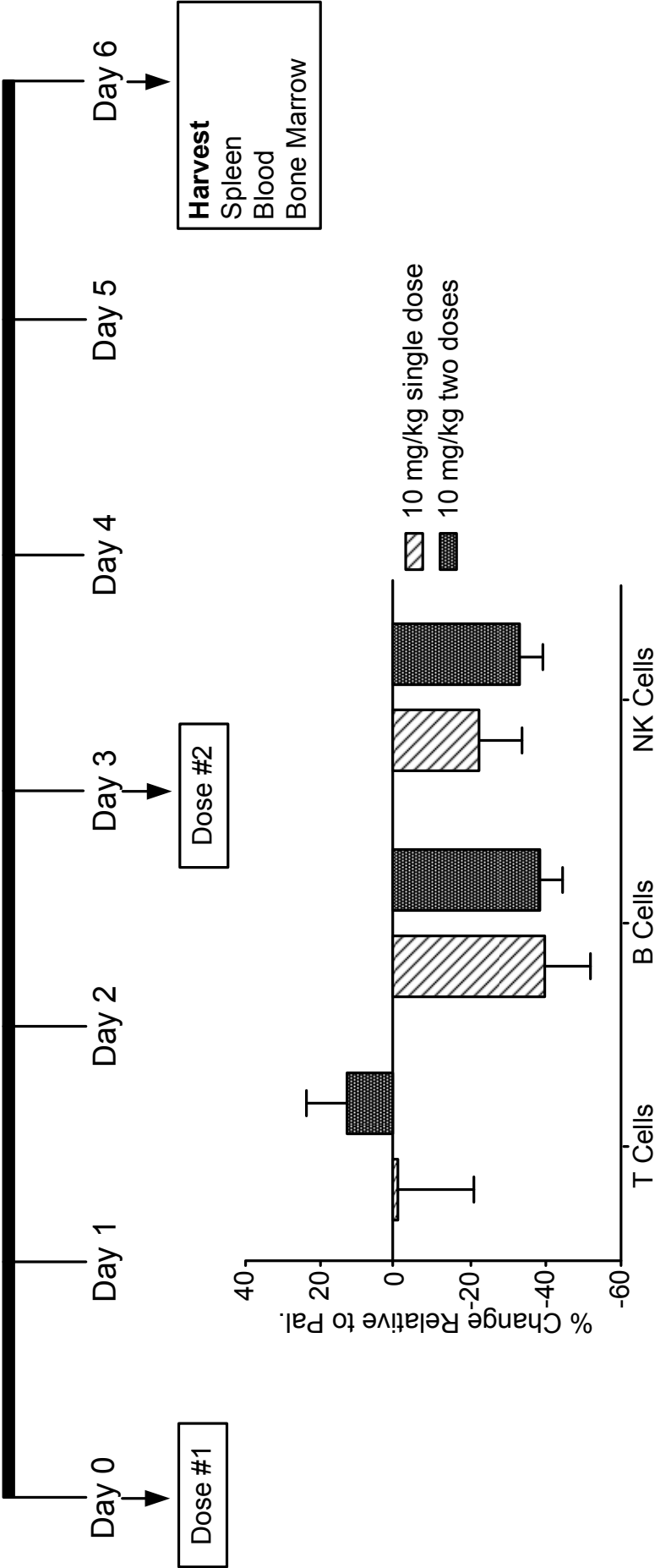
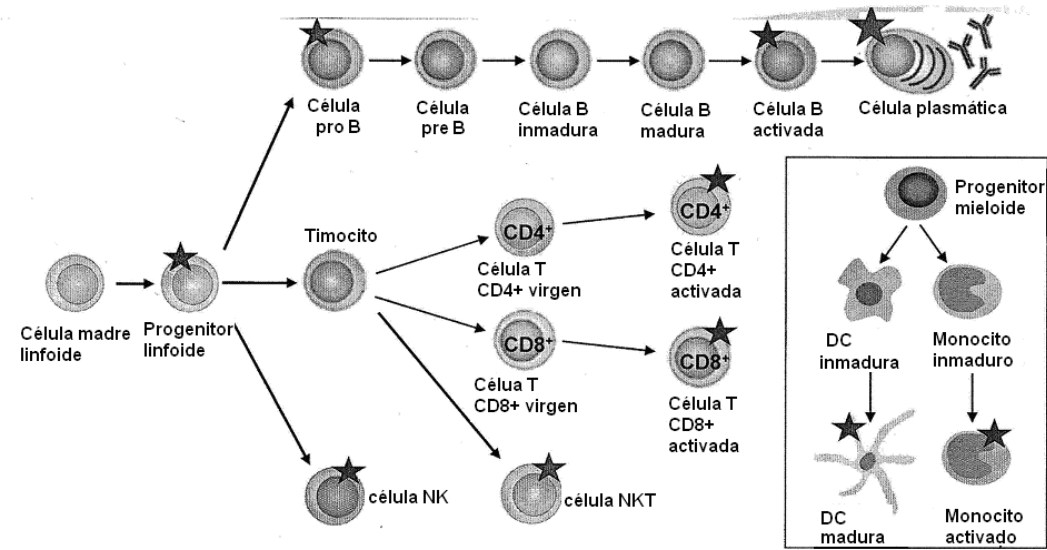


FIGURE 13





Cadena pesada de Ab79 (SEQ ID NO:21)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFDDYGMSWVRQAPGKGLEWVSDISWN
GGKTHYVDSVKGQFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGSLFHDSSGFY
FGHWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN
SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRV
EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE
VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN
KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE
SNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT
QKSLSLSPGK

Cadena ligera de Ab79 (SEQ ID NO:22)

QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGDNYVSWYQQLPGTAPKLLIYRDSQRPS
GVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCQSYDSSLGSGSVFGGGTKLTVLGQP
KANPTVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADGSPVKAGVETTKPS
KQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

Cadena pesada de Ab19 (SEQ ID NO:11)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFN NYDMTWVRQAPGKGLEWVAVISYD
GSDKDYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVYYYGFSGPS
MDVWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW
NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKR
VEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP
EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS
NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW
ESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHY
TQKSLSLSPGK

Cadena ligera de Ab19 (SEQ ID NO:12)

QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSNSNIGSNTVNWYQQLPGTAPKLLIYSDSNRPS
GVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCQSYDSSLGSRVFGGGTKLTVLGQP
KANPTVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADGSPVKAGVETTKPS
KQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

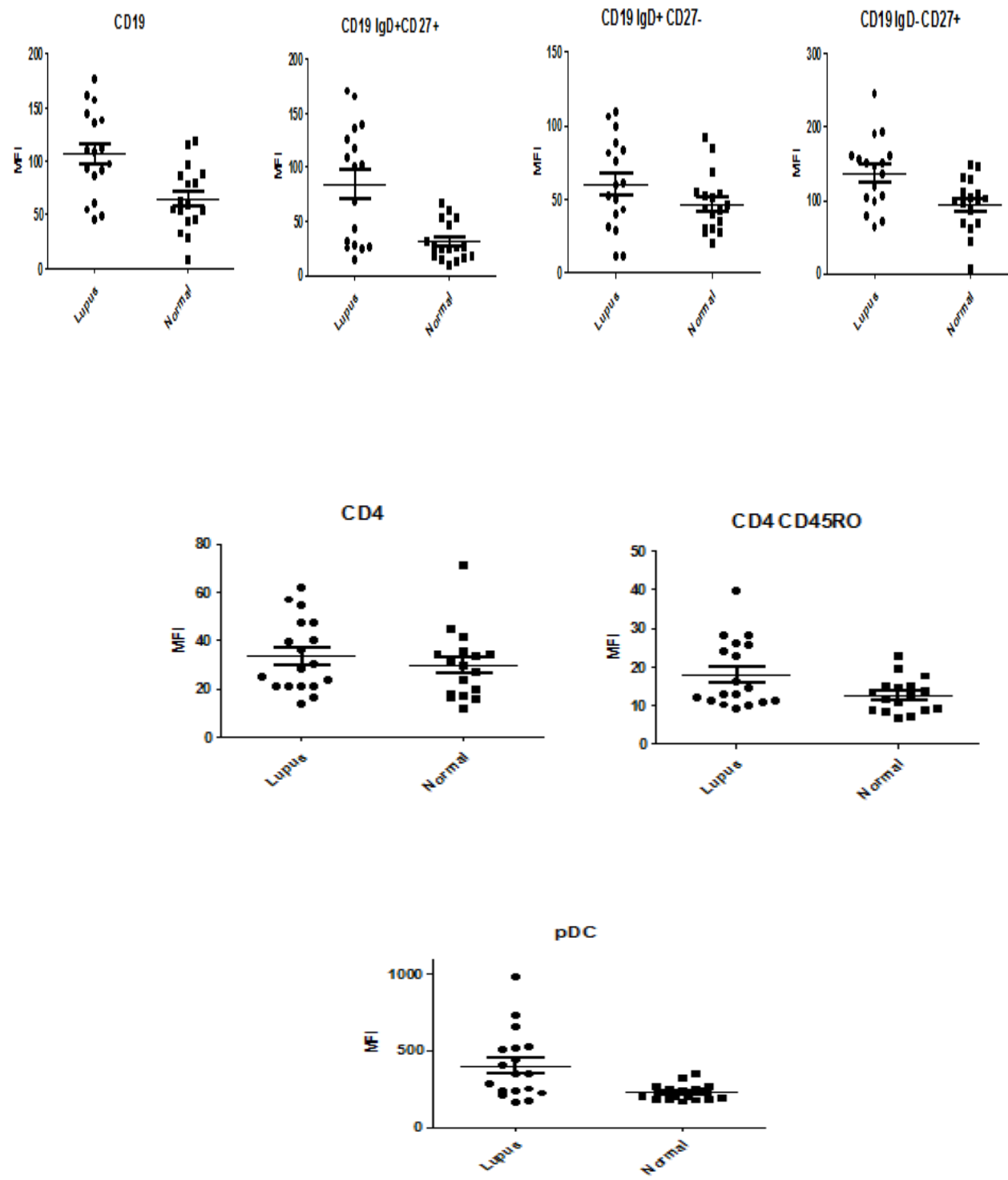
CD38 Homo sapiens (Acceso NP_001766.2; SEQ ID NO:1)

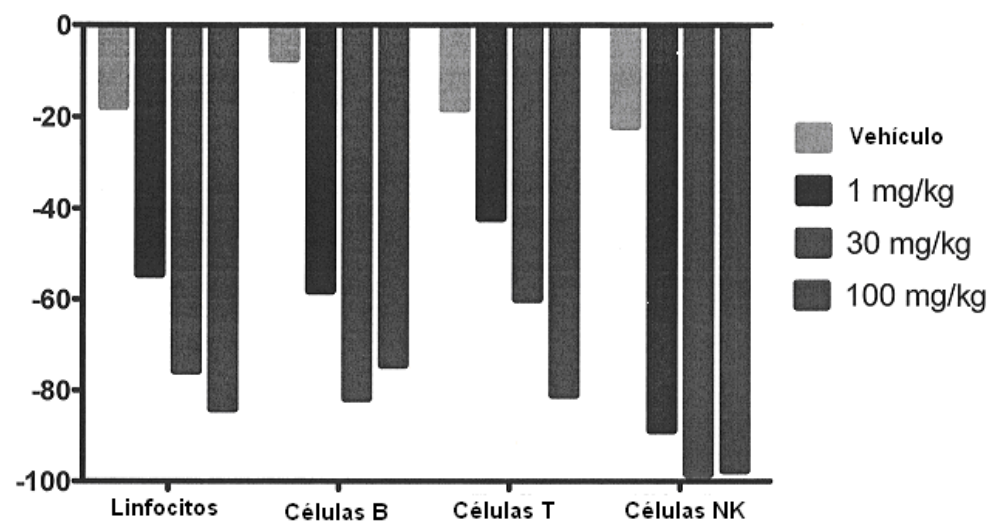
MANCEFSPVSGDKPCCRLSRRAQLCLGVSILVLILVVVLAVVVPRWRQQWSGPGT
TKRFPETVLARCVKYTEIHPEMRHVDCQSVWDAFKGAFISKHPCNITEEDYQPLMK
LGTQTVPCNKILLWSRIKDLAHQFTQVQRDMFTLEDTLLGYLADDLTWCGEFNTS
KINYQSCPDWRKDCSNNPVSFVWKTVSRRFAEAACDVVHVMLNGSRSKIFDKNST
FGSVEVHNLQPEKVQTTLEAWVIHGGREDSRDLCQDPTIKELESIIISKRNIFSCKNY
RPDKFLQCVKNPEDSSCTSEI

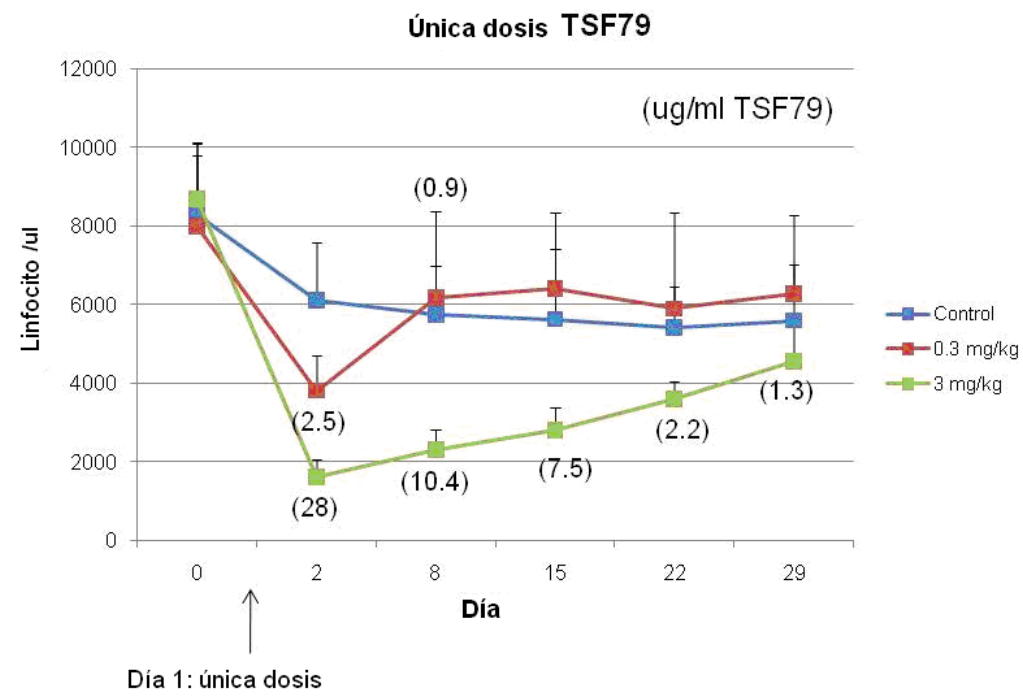
CD38 Macaca fascicularis/Cinomolgo/Macaco cangrejero (Acceso AAT36330.1; SEQ ID NO:2)

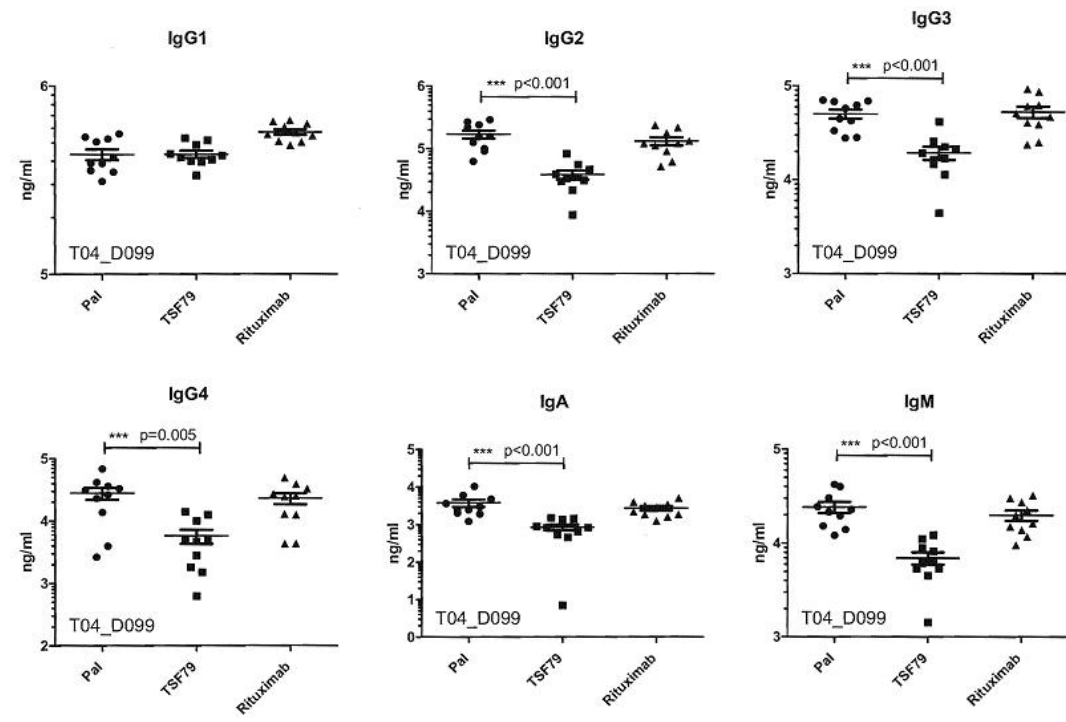
MANCEFSPVSGDKPCCRLSRRAQVCLGVCLLVLLILVVVVAVVLPRWRQQWSGS
GTTSRFPETVLARCVKYTEVHPEMRHVDCQSVWDAFKGAFISKYPCNITEEDYQPL
VKLGTQTVPCNKTLTLLWSRIKDLAHQFTQVQRDMFTLEDMLLGYLADDLTWCGEF
NTFEINYQSCPDWRKDCSNNPVSFVWKTVSRRFAETACGVVHVMLNGSRSKIFDK
NSTFGSVEVHNLQPEKVQALEAWVIHGGREDSRDLCQDPTIKELESIIISKRNIRFFC
KNIYRPDKFLQCVKNPEDSSCLSGI

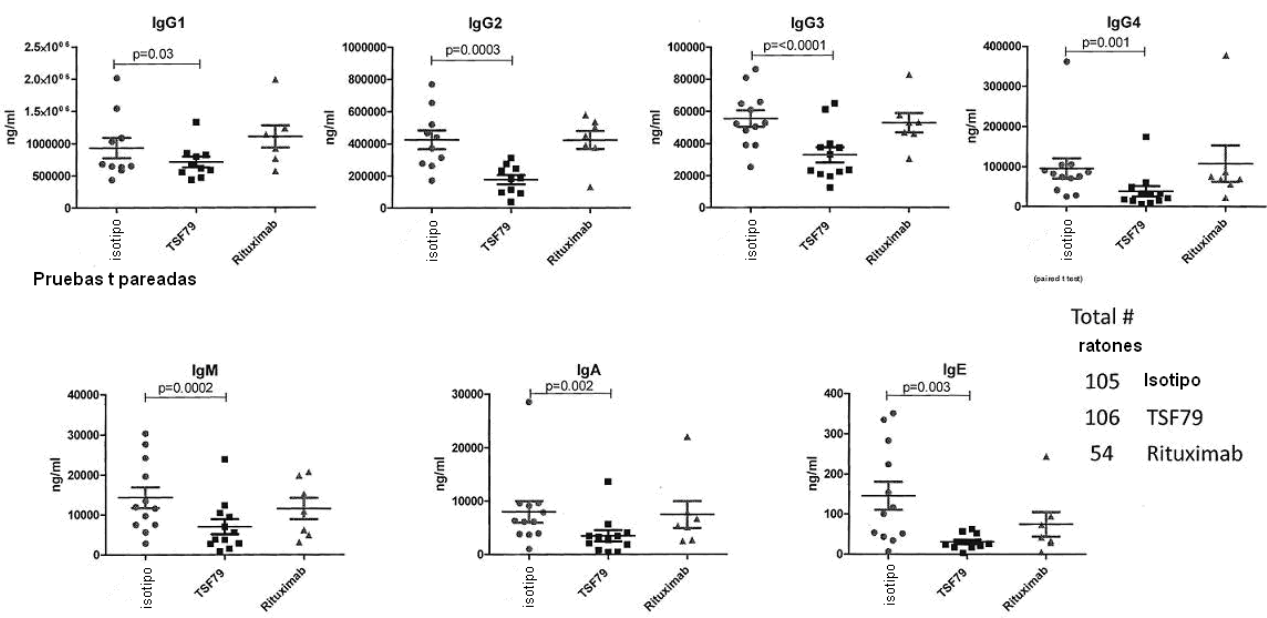
BM2		BM1		TSF19		TSF79	
E	76	N	120	G	91	K	121
H	79	K	121	E	103	F	135
E	104	F	135	E	104	Q	139
Q	107	Q	139	D	105	D	141
M	110	D	141	Q	107	M	142
K	111	D	202	M	110	E	239
L	112	V	203	K	111	W	241
G	113	H	205	T	114	S	274
T	114	Q	236	Q	115	C	275
Q	115	T	237	T	148	K	276
T	116	E	239	V	192	F	284
V	117	W	241	R	194	V	288
C	119	Q	272	R	195	K	289
T	148	F	273	F	196	N	290
L	150	S	274	E	198	P	291
T	191	C	275	A	199	E	292
V	192	K	276	H	228	D	293
R	194	F	284	N	229	S	294
R	195	P	291	Q	231		
F	196	E	292	E	233		
E	198	T	297	K	234		
A	199	S	298				
Q	231						
E	233						
K	234						

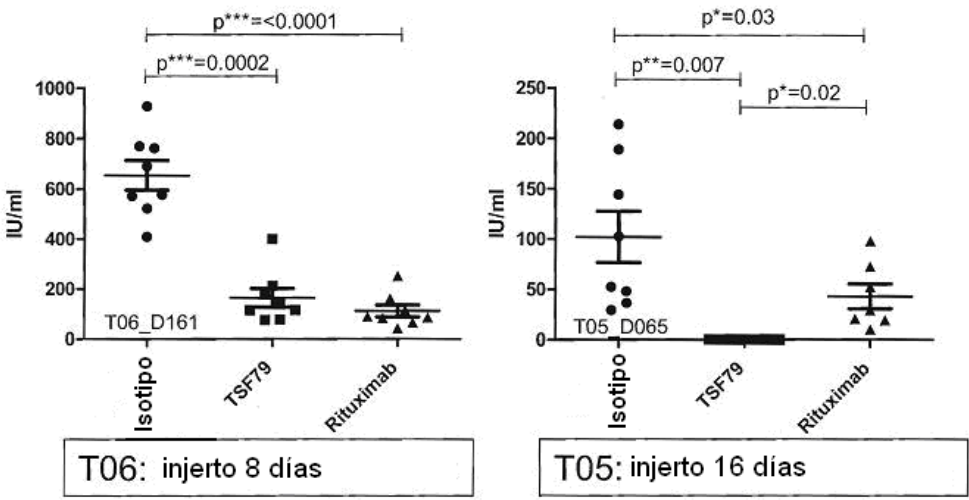




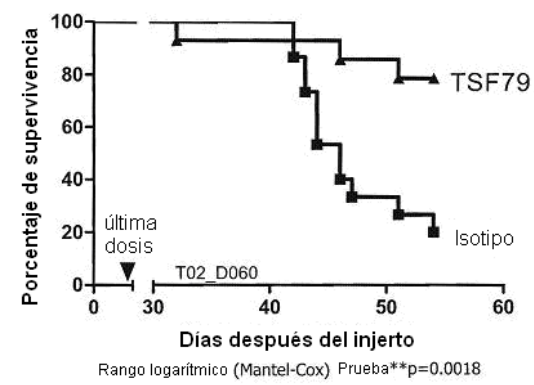
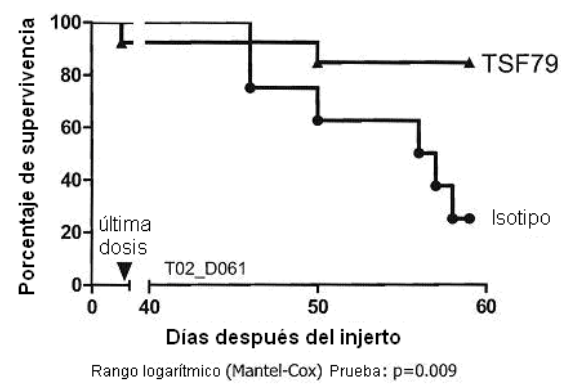


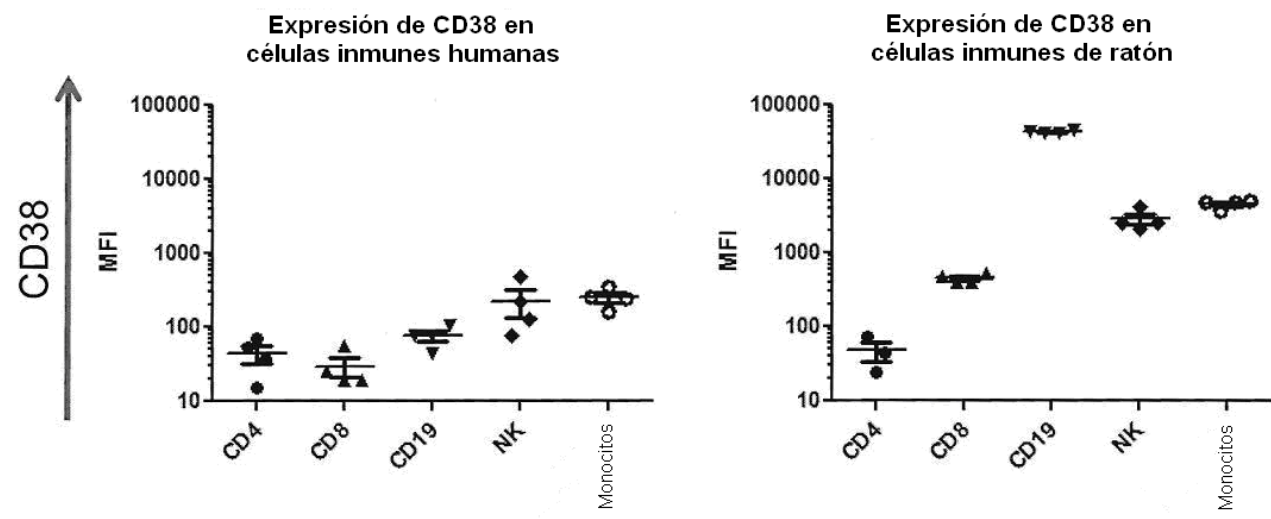


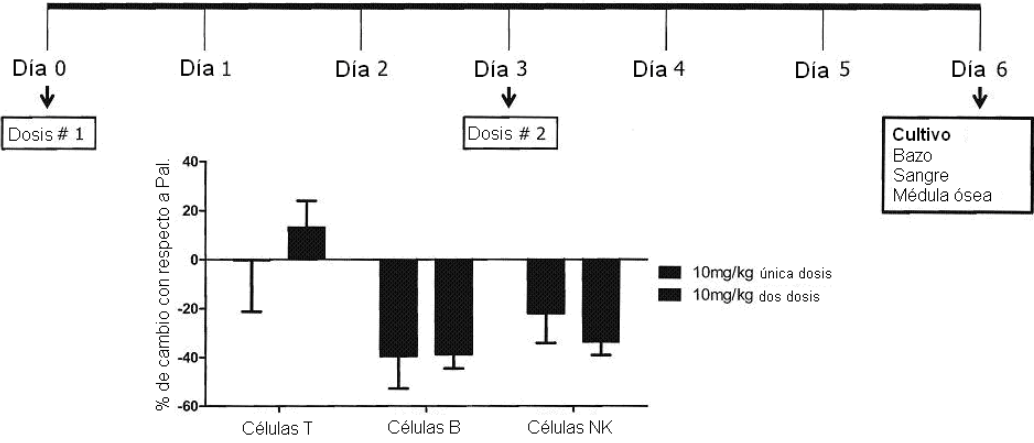




Supervivencia







PODER

El (los)

TAKEDA PHARMACEUTICAL COMPANY LIMITED

Domiciliados en 1-1, Doshomachi 4-Chome, Chuo-ku, Osaka-shi, Osaka, 541-0045, Japón

Nombran por el presente a XIMENA CASTELLANOS A. y/o MARGARITA CASTELLANOS A. abogadas con oficinas en la Calle 94A No. 7A-09, Bogotá-Colombia para y para obtener la protección de mi (nuestra) propiedad Industrial e intelectual y con este fin autorizamos a dichos apoderados para que nos representen ante cualesquiera autoridades o personas de los órdenes administrativo, contencioso –administrativo y judicial en todo lo relacionado con los siguientes actos y gestiones:

- a) Obtención de patentes de invención, modelos y dibujos industriales; registro de marcas de fabrica, de servicio, colectivas o defensivas y de denominaciones de origen, depósito de nombres y enseñas comerciales; su renovación, prórroga, inscripción de traspaso y cambio de nombre o domicilio, cancelación voluntaria y el registro de licencias de uso de esos derechos;
- b) Para la obtención de registros sanitarios;
- c) Para la obtención de registros de derechos de autor.
- d) Acciones de oposición, observación, cancelación, nulidad, medidas cautelares y en general los juicios civiles, penales, administrativos o contencioso - administrativos que promovamos o se nos promuevan.

Pudiendo en todos los actos y gestiones arriba mencionados sustituir éste mandato entre los apoderados, transigir, desistir, recibir, cancelar, renunciar, aceptar notificaciones y nombrar apoderados judiciales y extra-judiciales. .

Finalmente, este poder ratifica la validez de todos los actos y solicitudes que, a nombre de la poderdante hubieren realizado los apoderados en relación con las facultades anteriormente enumeradas, antes de la suscripción del presente poder

Dado y firmado hoy 01/06/2011
en Kanagawa, Japon
por Takeda Pharmaceutical Company Limited.

(El notario debe suscribir el documento en la pagina siguiente)
(Se requiere legalización consular o mediante apostilla)

POWER OF ATTORNEY

I (we) the undersigned

TAKEDA PHARMACEUTICAL COMPANY LIMITED

Of 1-1, Doshomachi 4-Chome, Chuo-ku, Osaka-shi, Osaka, 541-0045, Japan

hereby grant(s) Power of Attorney to XIMENA CASTELLANOS A. and /or MARGARITA CASTELLANOS a. attorneys residing at Calle 94A No. 7A-09, Bogotá- Colombia, to and to obtain the protection of my (our) Intellectual Property, for which purpose we authorize the said attorneys to represent us before any authorities, or persons, specially those, administrative, contentious and judicial, in all matters concerning the following:

- a) Obtainment of patents, models and designs, registration of trademarks, service, collective and defensive marks, and of designations of origin; the deposit of trade names and ensigns; its renewal, extension, recordal of assignments, change of name or domicile, voluntary cancellation, and the registration of licenses of use of the above rights;
- b) For the obtainment of Sanitary registrations;
- c) For the obtainment of copyright registrations
- d) Actions of opposition, cancellation, nullity, infringement, granting of licenses; and in general the civil, criminal and administrative suits related to those rights; actions and suits instituted by us or against us;

In all the above matters they may substitute this power of attorney within the appointed attorneys, compromise, cancel, receive, withdraw, renounce, accept notifications and appoint attorneys in fact in or out of court.

Finally, this power of attorney ratifies the validity of all acts and applications made by the representatives in the name of the signatory of this power of attorney, with regard to the faculties above given, before the execution of the present power of attorney.

Given and signed this 01/06/2011
in Kanagawa, Japan
by Yoichi Okumura
General Manager, Intellectual Property Department.
Takeda Pharmaceutical Company Limited

(Notary shall execute on the other side)
(Consular legalization or apostille is required)

CASTELLANOS & Co.
INTELLECTUAL PROPERTY LAW FIRM

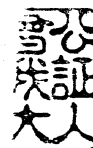
CALLE 94 A No. 7 A – 09 / P.O. BOX 6349
PHONE (57 1) 756 07 70 / FAX (57 1) 755 01 58
BOGOTÁ D.C. COLOMBIA
info@castellanosco.com



平成23年登簿第
認

79
証

号



日本国政府大阪法務局の平成23年4月18日発行にかかる履歴事項全部証明書により明らかなどころであるが、日本国法律により設立され本店が大阪府大阪市中央区道修町4丁目1番1号に所在する武田薬品工業株式会社の知的財産部長奥村洋一は別紙委任状に署名する権限を付与されており、別紙委任状の証書の署名が自己のものに相違ない旨代理人LEVESQUE SON HYUN REGINAを通じ本公証人に対し自認した。以上

よって、これを認証する。

平成23年 6 月 1 日、本公証人役場において

藤沢市鵜沼石上2丁目11番2号

横浜地方法務局所属

公証人

Notary

曾我大三郎



DAISABURO SOGA

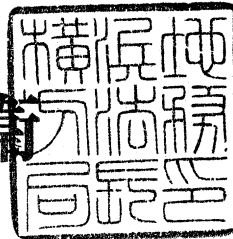
証 明

上記署名は、横浜地方法務局所属公証人の署名に相違ないものであり、かつ、その押印は、真実のものであることを証明する。

平成23年 6 月 1 日

横浜地方法務局長

神尾 衛



APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. Country : JAPAN

This public document

2. has been signed by DAISABURO SOGA

3. acting in the capacity of Notary of the Yokohama District
Legal Affairs Bureau

4. bears the seal/stamp of DAISABURO SOGA , Notary

Certified

5. at Tokyo

6. JUN. 1. 2011

7. by the Ministry of Foreign Affairs

8. 11- N^o 301579

9. Seal/stamp :

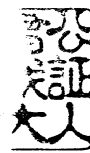
10. Signature :



K. Oyabe

Kazutoyo OYABE

For the Minister for Foreign Affairs



NOTARIAL CERTIFICATE

This is to certify that LEVESQUE SON HYUN REGINA, an agent of Yoichi OKUMURA, General Manager, Intellectual Property Department of Takeda Pharmaceutical Company Limited ,who has been authorized to grant Power of Attorney on behalf of said company organized and existing according to the law of Japan, located at 1-1 ,Doshomachi 4-chome, Chuo-ku Osaka-shi Osaka Japan, has stated in my very presence that said Yoichi OKUMURA has acknowledged himself that the signature on the attached document is his own.

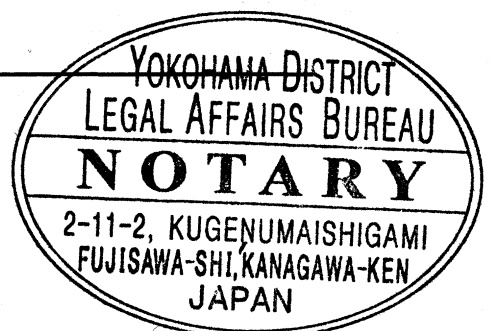
The foregoing was duly evidenced by the certified Register of said company issued by the Certificate of All Registered Items dated 18 April, 2011 from Osaka Legal Affairs Bureau for Corporate Number KU250214 and Title Certificate dated April 14, 2011.

Dated this 1st day of June, 2011.

Daisaburo Soga

Daisaburo Soga

Notary



attached to Yokohama District Legal Affairs Bureau

2-11-2, Kugenuma Ishigami Fujisawa-shi

Kanagawa-ken Japan

-----TRADUCCION OFICIAL No. 11-0607-----

De un documento escrito en INGLES, el cual para su identificación lleva el sello y firma de la Traductora e Intérprete Oficial, Res. 2755/68 y 01144/97 de Minjusticia.-----

(Anexos a un documento de Poder de TAKEDA PHARMACEUTICAL COMPANY LIMITED)

Registro No. 79

CERTIFICADO NOTARIAL

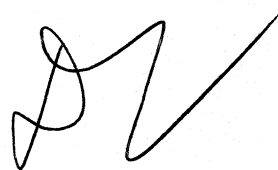
La presente es para certificar que LEVESQUE SON HYUN REGINA, agente de Yoichi OKUMURA, Gerente General, Departamento de Propiedad Intelectual de Takeda Pharmaceutical Company Limited, quien ha sido autorizado para otorgar Poder en nombre de dicha compañía, constituida y existente de acuerdo con la ley de Japón, domiciliada en 1-1, Doshomachi 4-chome, Chuo-ku Osaka-shi, Osaka Japón ha manifestado en mi propia presencia que la firma en el documento adjunto es de éste.

Lo anterior fue debidamente evidenciado por el Certificado de Registro de dicha compañía expedido por el Certificado de Todos los Items Registrados de fecha abril 18 de 2011 de la Oficina de Asuntos Legales de Osaka para Sociedades No. KU250214 y el Certificado de Título de fecha Abril 14, 2011.

Dado hoy día primero de Junio de 2011.

(fdo) ilegible

Daisaburo Soga



Notario

Adjunto a la Oficina de Asuntos Legales del Distrito de
Yokohama – 2-11-2, Kugenuma Ishigami Fujisawa-shi
Kanagawa-ken, Japón

(Sello Notarial): OFICINA DE ASUNTOS LEGALES

DISTRITO DE YOKOHAMA

NOTARIO

2-11-2, Kugenumaishigami

Fujisawa-shi, Kanagawa-ken – Japón

MINISTERIO DE
RELACIONES EXTERIORES
JUN 14 A 5:00 PM
CERTIFICACIONES
BOGOTA D.C.

APOSTILLA

(Convención de La Haya de Octubre 5, 1961)

1. País: JAPON

Este documento público

2. ha sido firmado por: DAISABURO SOGA

3. actuando en su carácter de: Notario Público de la Oficina de
Asuntos Legales del Distrito de Yokohama

4. lleva el sello de DAISURO SOGA - Notario

CERTIFICADO:

5. en Tokyo

6. el día 1º de Junio de 2011

7. por el Ministerio de Relaciones Exteriores

8. 11 No. 301579

9. Sello

10. Firma: (fdo) ilegible

NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD
074703
JAPON APOCICEMI
DOCUMENTO NOTARIAL
LAS FIRMAS INICIALES

MARIA DORA DUQUE DE BERNAL
TRADUCTORA E INTERPRETE OFICIAL
R.S. 02755/68 Y 01144/97 - MINJUSTICIA
RE. DE COLOMBIA

Kazutoyo OYABE

Por el Ministerio de Relaciones Exteriores

(Sello)

ES TRADUCCION FIEL Y COMPLETA, a la cual me remito,

Bogotá, D. C., Junio 13, 2011



MARIA DORA DUQUE DE BERNAL
TRADUCTORA E INTERPRETE OFICIAL
R.S. 02755/68 Y 01144/97 - MINJUSTICIA
RE. DE COLOMBIA

LISTADO DE SECUENCIAS

SEQ ID NO:1 (CD38 *Homo sapiens*; NP_001766.2)

5 MANCEFSPVSGDKPCCRLSRRAQLCLGVSILVLILVVVLAVVVPRWRQQ
WSGPGTTKRFPETVLARCVKYTEIHPEMRHVDCQSVWDAFKGAFISKHPCNITEE
DYQPLMKLGTQTVPCNKILLWSRIKDLAHQFTQVQRDMFTLEDTLLGYLADDLTW
CGEFNTSKINYQSCPDWRKDCSNNPVSFVKTVSRRFAEAACDVVHVMLNGSR
SKIFDKNSTFGSVEVHNLQPEKVQTLAWVIHGGREDSRDLCQDPTIKELESISK
10 RNIQFSCKNYRDPDKFLQCVKNPEDSSCTSEI

SEQ ID NO:2 (CD38 *Macaca fascicularis*; AAT36330.1)

 MANCEFSPVSGDKPCCRLSRRAQVCLGVCLLVLLILVVVAVVLPRWRQ
15 QWSGSGTTSRFPETVLARCVKYTEVHPEMRHVDCQSVWDAFKGAFISKYPCNIT
EEDYQPLVKLGTQTVPCNKTLWSRIKDLAHQFTQVQRDMFTLEDMLLGYLADDL
TWCGEFNTFEINYQSCPDWRKDCSNNPVSFVKTVSRRFAETACGVVHVMLNG
SRSKIFDKNSTFGSVEVHNLQPEKVQALEAWVIHGGREDSRDLCQDPTIKELESII
SKRNIRFFCKNIYRDPDKFLQCVKNPEDSSCLSGI
20

SEQ ID NO:3 (HCDR1 Ab79)

GFTFDDYG

25 SEQ ID NO:4 (HCDR2 Ab79)

ISWNGGKT

5 SEQ ID NO:5 (HCDR3 Ab79)

ARGSLFHDSSGFYFGH

10 SEQ ID NO:6 (LCDR1 Ab79)

SSNIGDNY

15 SEQ ID NO:7 (LCDR2 Ab79)

RDS

20 SEQ ID NO:8 (LCDR3 Ab79)

QSYDSSLSGS

SEQ ID NO:9 (Ab79 de cadena pesada)

25 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFDDYGMSWVRQAPGKGLEW
VSDISWNGGKTHYVDSVKGQFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGSL
FHDSSGFYFGHWGQGTLTVSSASTKGPSVFPLA

SEQ ID NO:10 (Ab79 de cadena ligera)

25

QSVLTQPPSASGTPGQRTISCSGSSSNIGDNYVSWYQQLPGTAPKLLIY
RDSQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCQSYDSSLSGSVFGGG
TKLTVLGQPKANPTVTLFPPSSEEL

5 SEQ ID NO:11 (Ab19 de cadena pesada)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNNDMTWVRQAPGKGLEW
VAVISYDGSDKDYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVYYY
GFSGPSMDVWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLA

10

SEQ ID NO:12 (Ab19 de cadena ligera)

QSVLTQPPSASGTPGQRTISCSGSNSNIGSNTVNWYQQLPGTAPKLLIY
SDSNRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCQSYDSSLSGSRVFGG

15 GTKLTVLGQPKANPTVTLFPPSSEEL

SEQ ID NO:13 (HCDR1 Ab19)

GFTFNNG

20

SEQ ID NO:14 (HCDR2 Ab19)

ISYDGSDK

25 SEQ ID NO:15 (HCDR3 Ab19)

ARVYYYGFSGPSMDV

SEQ ID NO:16 (LCDR1 Ab19)

NSNIGSNT

5

SEQ ID NO:17 (LCDR2 Ab19)

SDS

10

SEQ ID NO:18 (LCDR3 Ab79)

QSYDSSLGSR

SEQ ID NO:19 (Ab19 de cadena pesada) con constante

15

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNNDMTWVRQAPGKGLEW
VAVISYDGSDKDYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVYYY
GFSGPSMDVWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP
EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKP
20 SNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC
VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL
NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLV
KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF
SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

25

SEQ ID NO:20 (Ab19 de cadena ligera) con constante

QSVLTQPPSASGTPGQRTISCSGSNSNIGSNTVNWYQQLPGTAPKLLIY
SDSNRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCQSYDSSLSGSRVFGG
GTKLTVLGQPKANPTVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADGSP
VKAGVETTKPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAP
5 TECS

SEQ ID NO:21 (Ab79 de cadena pesada)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFDDYGMSWVRQAPGKGLEW
10 VSDISWNGGKTHYVDSVKGQFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGSL
FHDSSGFYFGHWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY
FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH
KPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV
TCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD
15 WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTC
LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN
VFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO:22 (Ab79 de cadena ligera)

20
QSVLTQPPSASGTPGQRTISCSGSSSNIGDNYVSWYQQLPGTAPKLLIY
RDSQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCQSYDSSLSGSVFGGG
TKLTVLGQPKANPTVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADGSPV
KAGVETTKPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPT
25 ECS

SEQ ID NO:23 (CD157 Homo sapiens; NP_004325)

maaqqcaasrlqlqllllllaaggararwrgegtsahlrdiflgrcaeyrallspeqrnkntaiweafkv
alddpcsvlpsdydlfinlsrhisprdkslfwenshllvnsfadntrrfmplsdvlygrvadflswcrqkndsgldyqs
cpts
edcennpvdsfwkrasiqyskdssgvihvmlngseptgaypikgffadyeipnlqkekitrieiwvmheiggnv
5 escgegsmlkvlrldmngfygscindyrpvkllqcvdhsthpdalksaaaatqrkapslyteqragliiplflvlas
rtql

SEQ ID NO:24 (referencia 1; región variable de cadena pesada)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFTFNSFAMSWVRQAPGKGLEWV
10 SAISGSGGGTTYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYFCAKDILW
FGEPVFDYWGQGTLVTVSS

SEQ ID NO:25 (referencia 1; región variable de cadena ligera)

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYD
15 ASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSELPEDFAVYYCQQRSNWPPTFGQGTKV
EIKR

SEQ ID NO:26 (referencia 2; región variable de cadena pesada)

QVQLVQSGAEVAKPGTSVKLSCKASGYTFTDYWMQWVKQRPGQGLEW
20 IGTIYPGDGDTGYAQKFQGKATLTADKSSKTVYMHLSLASEDSAVYYCARGDYY
GSNSLDYWGQGTSTVTVSS

SEQ ID NO:27 (referencia 2; región variable de cadena ligera)

DIVMTQSHLSMSTSLGDPVSITCKASQDVSTVVAWYQQKPGQSPRRLIY
25 SASYRYIGVPDRFTGSGAGTDFTFTISSVQAEDLAVYYCQQHYSPPYTFGGGTKL
EIKR

SEQ ID NO:28 (Ab43 de cadena pesada)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEW
VSRINSDGSSTSYADSMKGQFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGGY
5 YYYAMDVWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP
VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN
TKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV
VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG
KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKG
10 FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC
SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO:29 (Ab43 de cadena ligera)

15 QSVLTQPPSASGTPGQRTVISCSSGSSNIGYKTVNWWYQQLPGTAPKLLIY
DNNKRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDDSLNGLVFGG
GTKLTVLGQPKANPTVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADGSP
VKAGVETTKPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAP
TECS
20

SEQ ID NO:30 (Ab72 de cadena pesada)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYGMNWRQAPGKGLEW
VSGISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDSNY
25 DFWSGYYYGMDVWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK
DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNV
NHKPSNTKVDRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP

EVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ
DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT
CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGSSFFLYSKLTVDKSRWQQG
NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

5

SEQ ID NO:31 (Ab72 de cadena ligera)

QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSKTVSWYQQLPGTAPKLLIY
DNNKRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCSSYAARSTNIIFGGGT
10 KLTVLGQPKANPTVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADGSPVK
AGVETTKPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTE
CS

SEQ ID NO:32 (Ab110 de cadena pesada)

15 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEW
VSIIYSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARRATWG
GATHDYWGQGT LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV
TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT
KVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV
20 DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK
EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGF
YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGSSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS
VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

25

SEQ ID NO:33 (Ab110 de cadena ligera)

QSVLTQPPSASGTPGQRTVISCSSSSNIGSNTVNWYQQLPGTAPKLLIY
RNNQRPSGVPDRFSGSGSGTSASLAISGLRSEDEADYYCATWDDSLNGVLFGG
GTKLTVLGQPKANPTVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADGSP
VKAGVETTKPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAP
5 TECS

SEQ ID NO:34 (Ab19 de cadena pesada) con constante

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNNDMTWVRQAPGKGLEW
10 VAVISYDGSDDYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVYYY
GFSGPSMDVWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP
EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKP
SNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC
VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL
15 NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLV
KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF
SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO:35 (Ab19 de cadena ligera) con constante

20
QSVLTQPPSASGTPGQRTVISCSSNSNIGSNTVNWYQQLPGTAPKLLIYSDSNR
PSGVPDRFSGSGSGTSASLAISGLRSEDEADYYCQSYDSSLGSRVFGGGTKLT
VLGQPKANPTVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADGSPVKAGV
ETTKPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

RESUMEN DE LA INVENCION

Se describen anticuerpos aislados que se unen a la CD38 humana y CD38 de cinomolgo. También se describen composiciones farmacéuticas que comprenden
5 los anticuerpos descritos y métodos terapéuticos y de diagnóstico para usar los anticuerpos descritos.

Supervivencia

