

TERAPIAS COMBINADAS DIRIGIDAS A CD38 Y TGF-BETA

REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

[0001] Esta solicitud reivindica prioridad de la Solicitud de Patente Provisional de Estados Unidos 62/696.198, presentada el 10 de julio de 2018. La descripción de esta solicitud se incorpora a la presente memoria como referencia en su totalidad.

LISTA DE SECUENCIAS

[0002] La presente solicitud contiene una Lista de Secuencias que se ha presentado electrónicamente en formato ASCII y se incorpora a la presente memoria como referencia en su totalidad. La copia electrónica de la Lista de Secuencias, creada el 9 de julio de 2019, se llama 022548_WO025_SL.txt y tiene un tamaño de 52.428 bytes.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

[0003] El factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) es una citocina que regula diversos procesos biológicos, tales como la formación de matriz extracelular, la cicatrización de heridas, el desarrollo embrionario, el desarrollo óseo, la hematopoyesis, las respuestas inmunitarias e inflamatorias, y la transformación maligna. La desregulación de TGF- β conduce a afecciones patológicas, p. ej., defectos de nacimiento, cáncer, inflamación crónica y enfermedades autoinmunitarias y fibróticas.

[0004] El TGF- β tiene tres isoformas conocidas - TGF- β 1, 2, y 3. Las tres isoformas son pleiotrópicas en cuanto a su función y se expresan en diferentes patrones a través de tipos de células y tejidos. Tienen actividades similares *in vitro*, pero las modificaciones genéticas para inactivar la expresión de genes individuales en tipos celulares específicos sugieren papeles no idénticos *in vivo* a pesar de su capacidad compartida para unirse al mismo receptor (Akhurst et al, Nat Rev Drug. Discov 11(10):790-811 (2012)).

[0005] Después de la unión de TGF- β a TGF β RII, la actividad quinasa constitutiva del receptor fosforila y activa TGF β RI, que fosforila SMAD2/3, permitiéndole que se asocie con SMAD4, que a continuación se localiza hacia el núcleo e inicia la transcripción de los genes de respuesta a TGF- β . *Id.* Además de esta cascada de señalización canónica, una vía no canónica transmite señales a través de otros factores, incluidos p38 MAPK, PI3K, AKT, JUN, JNK y NF- κ B. La señalización de TGF- β también está modulada por otras vías, incluidas WNT, Hedgehog, Notch, INF, TNF y RAS. Por tanto, el resultado final de la señalización de TGF- β es un solapamiento de todas estas vías de señalización que integra el estado y el entorno de la célula. *Id.*

[0006] CD38 es una glicoproteína transmembrana tipo II de 45 kD con un largo dominio extracelular C-terminal y un corto dominio citoplásmico N-terminal. La proteína CD38 es una ectoenzima bifuncional que cataliza la conversión de NAD⁺ en ADP-ribosa cíclica (cADPR) y también hidroliza cADPR a ADP-ribosa. Durante la ontogenia, CD38 aparece en células madre comprometidas positivas para CD34 y en progenitores comprometidos de linaje de células linfoides, eritroides y mieloides. La expresión de CD38 persiste principalmente en el linaje linfoide con niveles de expresión variables en diferentes etapas del desarrollo de las células T y B.

[0007] CD38 es regulado por incremento en muchos tumores malignos hematopoyéticos y en líneas celulares derivadas de varios tumores malignos hematopoyéticos, incluyendo linfoma no Hodgkin (NHL), linfoma de Burkitt (BL), mieloma múltiple (MM), leucemia linfocítica crónica B (B-CLL), leucemia linfocítica aguda (ALL) B y T, linfoma de células T (TCL), leucemia mieloide aguda (AML), leucemia de células 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 negativas para CD38. La expresión de CD38 en neoplasias hematopoyéticas y su correlación con la progresión de la enfermedad hacen de CD38 una diana atractiva para la terapia con anticuerpos.

COMPENDIO DE LA INVENCION

[0008] En la presente memoria se proporcionan terapias combinadas dirigidas a CD38 y TGF- β . Los autores de la presente invención han encontrado que un anticuerpo anti-

TGF- β puede bloquear la capacidad de TGF- β para amortiguar el efecto antitumoral de un anticuerpo anti-CD38 (p. ej., TGF- β puede inhibir la ADCC mediada por células NK de un anticuerpo anti-CD38). En comparación con los tratamientos actualmente disponibles para el cáncer, incluyendo tratamientos con anticuerpos, las terapias combinadas proporcionadas en la presente memoria pueden proporcionar una eficacia clínica superior.

[0009] Por consiguiente, en la presente memoria se proporciona un método para mejorar la eficacia de un agente que se une específicamente a CD38 con un agente que se une específicamente a TGF- β . En algunas realizaciones, en la presente memoria se proporciona un método para tratar el cáncer en un paciente (p. ej., un paciente humano) administrando al paciente un agente que se une específicamente a CD38 humano y un agente que se une específicamente a TGF- β humano. En algunas realizaciones, el agente que se une específicamente a CD38 humano es un anticuerpo anti-CD38 o un fragmento del mismo que se une al antígeno. En ciertas realizaciones, el anticuerpo anti-CD38 es capaz de destruir una célula positiva para CD38 mediante apoptosis, citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC) y/o citotoxicidad dependiente del complemento (CDC), en donde la destrucción de la célula positiva para CD38 por apoptosis puede ocurrir en ausencia de células de estroma o citocinas derivadas de estroma. En algunas realizaciones, el agente que se une específicamente a TGF- β humano es un anticuerpo anti-TGF- β pan-específico o un fragmento de unión a antígeno del mismo.

[0010] En algunas realizaciones, en la presente memoria se proporciona un método de tratamiento del cáncer en un paciente humano que lo necesite, administrando al paciente un anticuerpo anti-CD38 y un anticuerpo anti-TGF- β o un fragmento de antígeno del mismo.

[0011] En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-CD38:

- a) tiene HCDR1-3 y LCDR1-3 que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 15-20, respectivamente;
- b) tiene un dominio variable de cadena pesada y un dominio variable de cadena ligera que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 13 y 14, respectivamente; o

c) tiene una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12.

[0012] En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-TGF- β :

a) tiene HCDR1-3 y LCDR1-3 que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 5-10, respectivamente;

b) tiene un dominio variable de cadena pesada y un dominio variable de cadena ligera que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 y 4, respectivamente; o.

c) tiene una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2.

[0013] En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-CD38 tiene CDR1 de cadena pesada (HCDR1), HCDR2, HCDR3, CDR1 de cadena ligera (LCDR1), LCDR2 y LCDR3 que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 15-20, respectivamente, y el anticuerpo anti-TGF- β o su fragmento de unión a antígeno tiene HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 y LCDR3 que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 5 a 10, respectivamente. En ciertas realizaciones, el anticuerpo anti-CD38 comprende un dominio variable de cadena pesada (V_H) y un dominio variable de cadena ligera (V_L) que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 13 y 14, respectivamente; y el anticuerpo anti-TGF- β comprende un V_H y un V_L que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 y 4, respectivamente. En realizaciones concretas, el anticuerpo anti-CD38 tiene una cadena pesada (HC) y una cadena ligera (LC) que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 11 y 12, respectivamente; y el anticuerpo anti-TGF- β tiene una cadena pesada y una cadena ligera que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 y 2, respectivamente.

[0014] En cualquiera de las realizaciones proporcionadas en la presente memoria, el anticuerpo anti-CD38 puede comprender una región Fc de IgG₁ humana y el anticuerpo anti-TGF- β puede comprender una región Fc de IgG₄ humana.

[0015] También se proporciona en la presente memoria un método de tratamiento de

mieloma múltiple en un paciente humano que lo necesite, que comprende administrar al paciente un anticuerpo anti-CD38 que comprende una secuencia de aminoácidos de dominio variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 13 y una secuencia de aminoácidos de dominio variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 14, y un anticuerpo anti-TGF- β que comprende una secuencia de aminoácidos de dominio variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 3 y una secuencia de aminoácidos de dominio variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 4.

[0016] También se proporciona en la presente memoria un método de tratamiento de mieloma múltiple en un paciente humano que lo necesite, que comprende administrar al paciente un anticuerpo anti-CD38 que comprende una secuencia de aminoácidos de cadena pesada de SEQ ID NO: 11 y una secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de SEQ ID NO: 12, y un anticuerpo anti-TGF- β que comprende una secuencia de aminoácidos de cadena pesada de SEQ ID NO: 1 y una secuencia de aminoácidos de cadena ligera de SEQ ID NO: 2.

[0017] En cualquiera de las realizaciones proporcionadas en la presente memoria, el anticuerpo anti-CD38 y el anticuerpo o fragmento anti-TGF- β se pueden administrar al paciente secuencialmente.

[0018] También se proporcionan en la presente memoria un anticuerpo anti-CD38 para su uso en el tratamiento del cáncer en un paciente humano que lo necesite combinado con un anticuerpo anti-TGF- β , y el uso de un anticuerpo anti-CD38 para la fabricación de un medicamento para tratar el cáncer en un paciente humano que lo necesite combinado con un anticuerpo anti-TGF- β . En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-CD38

- a) tiene HCDR1-3 y LCDR1-3 que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 15-20, respectivamente;
- b) tiene un dominio variable de cadena pesada y un dominio variable de cadena ligera que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 13 y 14, respectivamente; o
- c) tiene una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12.

[0019] También se proporciona en la presente memoria un anticuerpo anti-TGF- β para

su uso en el tratamiento del cáncer en un paciente humano que lo necesite combinado con un anticuerpo anti-CD38, y el uso de un anticuerpo anti-TGF- β para la fabricación de un medicamento para tratar el cáncer en un paciente humano que lo necesite combinado con un anticuerpo anti-CD38. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-TGF- β

- a) tiene HCDR1-3 y LCDR1-3 que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 5-10, respectivamente;
- b) tiene un dominio variable de cadena pesada y un dominio variable de cadena ligera que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 y 4, respectivamente; o
- c) tiene una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2.

[0020] En algunas realizaciones de los métodos, los anticuerpos para su uso, y los usos de los anticuerpos descritos en la presente memoria, el cáncer es positivo para CD38.

[0021] En algunas realizaciones de los métodos, los anticuerpos para su uso, y los usos de los anticuerpos descritos en la presente memoria, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en mieloma múltiple, linfoma no Hodgkin, linfoma de Hodgkin, linfoma de células B grandes difuso, linfoma de células T periférico, leucemia de células pilosas, leucemia linfocítica crónica, leucemia mieloide crónica, leucemia mieloide aguda, leucemia linfocítica aguda, melanoma, glioblastoma, cáncer de pulmón, carcinoma cutáneo de células escamosas, cáncer colorrectal, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de cabeza y cuello, carcinoma hepatocelular, cáncer urotelial y carcinoma de células renales.

[0022] En algunas realizaciones de los métodos, los anticuerpos para su uso, y los usos de los anticuerpos descritos en la presente memoria, el cáncer es un tumor maligno hematológico.

[0023] En algunas realizaciones de los métodos, anticuerpos para su uso, y los usos de los anticuerpos descritos en la presente memoria, el cáncer es mieloma múltiple. En realizaciones concretas, los tratamientos descritos en la presente memoria dan como resultado una menor destrucción ósea que el tratamiento con el anticuerpo anti-CD38 solo y/o mejoran la formación ósea dando como resultado la remodelación ósea y/o la

curación ósea, en pacientes con mieloma múltiple.

[0024] Por consiguiente, en algunas realizaciones, proporcionadas en la presente memoria es un método para reducir la destrucción ósea en un paciente de mieloma múltiple humano, que comprende administrar al paciente un agente que se une específicamente a CD38 humano como se describe en la presente memoria (p. ej., un anticuerpo anti-CD38) y un agente que se une específicamente al TGF- β humano como se describe en la presente memoria (p. ej., un anticuerpo anti-TGF- β). También se proporcionan en la presente memoria un anticuerpo anti-TGF- β como se describe en la presente memoria para su uso en la reducción de la destrucción ósea en un paciente con mieloma múltiple humano combinado con un anticuerpo anti-CD38, y el uso de un anticuerpo anti-TGF- β para la fabricación de un medicamento para reducir la destrucción ósea en un paciente con mieloma múltiple humano combinado con un anticuerpo anti-CD38.

[0025] También se proporciona en la presente memoria un método para mejorar la formación de hueso que da como resultado la remodelación ósea y/o la curación ósea en un paciente con mieloma múltiple, que comprende administrar al paciente un agente que se une específicamente a CD38 humano como se describe en la presente memoria (p. ej., un anticuerpo anti-CD38) y un agente que se une específicamente a TGF- β humano como se describe en la presente memoria (p. ej., un anticuerpo anti-TGF- β). También se proporcionan en la presente memoria un anti-TGF- β anticuerpo como se describe en la presente memoria para su uso en la mejora de la formación de hueso en un paciente con mieloma múltiple humano combinado con un anticuerpo anti-CD38, y el uso de un anticuerpo anti-TGF- β para la fabricación de un medicamento para mejorar la formación de hueso en un paciente con mieloma múltiple humano combinado con un anticuerpo anti-CD38.

[0026] En algunas realizaciones de los métodos, los anticuerpos para su uso, y los usos de los anticuerpos descritos en la presente memoria, el cáncer es refractario al tratamiento con Ab2 o tratamiento con daratumumab, o refractario a ambos tratamientos. En algunas realizaciones, el paciente tiene mieloma múltiple recurrente o refractario y ha recibido al menos una terapia previa o al menos dos terapias previas.

[0027] También se proporciona en la presente memoria es un artículo de fabricación que

comprende un anticuerpo anti-CD38 y un anticuerpo anti-TGF- β , en donde dicho artículo de fabricación es adecuado para el tratamiento de cáncer en un paciente, p. ej., en un método de tratamiento descrito en la presente memoria. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-CD38

- a) tiene HCDR1-3 y LCDR1-3 que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 15-20, respectivamente;
- b) tiene un dominio variable de cadena pesada y un dominio variable de cadena ligera que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 13 y 14, respectivamente; o
- c) tiene una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12; y

el anticuerpo anti-TGF- β

- a) tiene HCDR1-3 y LCDR1-3 que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 5-10, respectivamente;
- b) tiene un dominio variable de cadena pesada y un dominio variable de cadena ligera que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 y 4, respectivamente; o
- c) tiene una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0028] La FIG. 1 es un gráfico que muestra la liberación de TGF- β por líneas de células de mieloma múltiple a los uno, dos o tres días según se cuantifica mediante ELISA.

[0029] La FIG. 2 es un gráfico que muestra los niveles de fluorescencia de calceína (% de lisis) de células diana MOLP8 incubadas con Ab2 a una concentración de 0, 0,001, 0,1 o 1 $\mu\text{g/mL}$ y lisadas durante 1 hora por células NK humanas incubadas con TGF- β a 10 ng/mL durante la noche, 24 horas, 48 horas o 72 horas.

[0030] La FIG. 3 es un gráfico que muestra los niveles de fluorescencia de calceína (% de lisis) de células diana MOLP8 incubadas con Ab2 a una concentración de 0, 0,001,

0,01, 0,1 o 1 $\mu\text{g/mL}$ o un control de IgG₁ y lisadas durante 1 hora por células NK humanas incubadas con TGF- β a 10 ng/mL y Ab1 a 50 $\mu\text{g/mL}$ durante 90 horas.

[0031] La FIG. 4 es un gráfico que muestra el efecto de TGF- β a 0,1, 1 y 10 ng/mL sobre la ADCC mediada por Ab2 de células NCI-H929.

[0032] La FIG. 5 es un gráfico que muestra la ADCC mediada por Ab2 de células NCI-H929 tratadas con IgG₄ a 100 $\mu\text{g/mL}$, Ab1 a 100 $\mu\text{g/mL}$, TGF- β , TGF- β + IgG₄ o TGF- β + Ab1 a 10 ng/mL. * = p <0,05 frente a NT; ** = p <0,005 frente a NT.

[0033] La FIG. 6 es un gráfico que muestra la ADCC mediada por Ab2 de células NCI-H929 tratadas con IgG₄ a 200 $\mu\text{g/mL}$, Ab1 a 200 $\mu\text{g/mL}$, TGF- β , TGF- β + IgG₄ o TGF- β + Ab1 a 10 ng/mL. * = p <0,05 frente a NT; ** = p <0,005 frente a NT.

[0034] La FIG. 7 es un gráfico que muestra los niveles de fluorescencia de calceína (% de lisis) de células diana K562 lisadas por la actividad citolítica de células NK humanas incubadas con células JJN3 liberadoras de TGF- β endógenas y Ab1 a 100 $\mu\text{g/mL}$ o un control de isotipo durante 90 horas.

[0035] La FIG. 8 es un gráfico que muestra la ADCC mediada por Ab2 de las células diana RPMI8226 incubadas con Ab2 a una concentración de 0, 0,01 o 0,1 $\mu\text{g/mL}$ o con un mutante de Ab2 de control a una concentración de 0,1 $\mu\text{g/mL}$ y lisadas durante 1 hora por células NK humanas incubadas con células JJN3 que liberan TGF- β endógeno y Ab1 a 100 $\mu\text{g/mL}$ o un control de isotipo durante 90 horas.

DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION

[0036] La presente descripción proporciona nuevas terapias combinadas que se dirigen a TGF- β humano y CD38 humano, por ejemplo, mediante el uso de anticuerpos que se unen estas dianas. Las terapias combinadas se pueden utilizar para tratar afecciones tales como el cáncer. A menos que se indique lo contrario, “TGF- β ” se refiere a TGF- β humano en la presente memoria. Las secuencias de polipéptidos de las tres isoformas de TGF- β humano (TGF- β 1, TGF- β 2 y TGF- β 3) están disponibles con los Núm. de Acceso de SwissProt P01137, P08112 y P10600, respectivamente, que se muestran aquí como SEQ ID NO: 21-23. A menos que se indique lo contrario, “CD38” se refiere a CD38 humano en la presente memoria. La secuencia del polipéptido CD38 humano está disponible con el Núm. de Acceso de Genbank NP_001766, que se muestra aquí como

SEQ ID NO: 24.

[0037] Como se emplea en la presente memoria, el término “anticuerpo” (Ab) o “inmunoglobulina” (Ig) se refiere a una proteína tetramérica que comprende dos cadenas pesadas (H) (aproximadamente 50-70 kDa) y dos cadenas ligeras (L) (aproximadamente 25 kDa) interconectadas por enlaces disulfuro. Cada cadena pesada está compuesta por un dominio variable de cadena pesada (V_H) y una región constante de cadena pesada (C_H). Cada cadena ligera está compuesta por un dominio variable de cadena ligera (V_L) y una región constante de cadena ligera (C_L). Los dominios V_H y V_L se pueden subdividir adicionalmente en regiones de hipervariabilidad, denominadas “regiones determinantes de complementariedad” (CDR), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas “regiones marco” (FR). Cada V_H o V_L se compone de tres CDR y cuatro FR, dispuestas desde el extremo amino al extremo carboxilo en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 y FR4. La asignación de aminoácidos a cada región puede estar de acuerdo con las definiciones de IMGT® (Lefranc et al., Dev Comp Immunol 27(1):55-77 (2003)); o las definiciones de Kabat, Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, MD (1987 y 1991)); Chothia & Lesk, J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987); o Chothia et al., Nature 342:878-883 (1989).

[0038] El término “afinidad” se refiere a una medida de la atracción entre un antígeno y un anticuerpo. El atractivo intrínseco del anticuerpo por el antígeno se expresa típicamente como la constante de equilibrio de afinidad de unión (K_D) de una interacción anticuerpo-antígeno concreta. Se dice que un anticuerpo se une específicamente a un antígeno cuando la K_D es menor de 10^{-7} M, tal como menos de 10^{-8} M (p. ej., 1-9 nM), según lo determinado por, p. ej., resonancia de plasmón de superficie o Interferometría de biocapa.

[0039] El término “ k_{off} ” se refiere a la constante de velocidad de disociación de una interacción anticuerpo-antígeno concreta. Se puede medir una constante de velocidad de disociación k_{off} , por ejemplo, mediante Interferometría de BioCapa.

[0040] El término “epítipo”, como se emplea en la presente memoria se refiere a una porción (determinante) de un antígeno que se une específicamente a un anticuerpo. Los determinantes epitípicos generalmente consisten en agrupaciones superficiales

químicamente activas de moléculas tales como aminoácidos o cadenas laterales de carbohidratos o azúcares y generalmente tienen características estructurales tridimensionales específicas, así como características de carga específicas. Un epítopo puede ser "lineal" o "conformacional". En un epítopo lineal, todos los puntos de interacción entre una proteína (p. ej., un antígeno) y una molécula que interactúa (tal como un anticuerpo) se producen linealmente a lo largo de la secuencia de aminoácidos primaria de la proteína. En un epítopo conformacional, los puntos de interacción se producen a través de restos de aminoácidos en la proteína que están separados entre sí en la secuencia de aminoácidos primaria. Una vez que se determina un epítopo deseado en un antígeno, es posible generar anticuerpos contra ese epítopo utilizando mecanismos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, se puede generar un anticuerpo contra un epítopo lineal, por ejemplo, inmunizando un animal con un péptido que tiene los restos de aminoácidos del epítopo lineal. Se puede generar un anticuerpo contra un epítopo conformacional, por ejemplo, inmunizando un animal con un minidominio que contiene los restos de aminoácidos relevantes del epítopo conformacional. También se puede generar un anticuerpo contra un epítopo concreto, por ejemplo, inmunizando un animal con la molécula diana de interés o una porción relevante de la misma, y a continuación seleccionando la unión al epítopo.

[0041] Se puede determinar si un anticuerpo se une al mismo epítopo que, o compite por la unión con, un anticuerpo como se describe en la presente memoria mediante el uso de métodos conocidos en la técnica, incluyendo, sin limitación, ensayos de competición, agrupación de epítopos, y barrido de alanina. En algunas realizaciones, el anticuerpo de prueba y un anticuerpo como se describe en la presente memoria se unen a al menos un resto común (p. ej., al menos dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve o diez restos) en la proteína diana (es decir, TGF- β o CD38). En realizaciones adicionales, los restos de contacto en la proteína diana son completamente idénticos entre el anticuerpo de prueba y el anticuerpo como se describe en la presente memoria. En una realización, se permite que el anticuerpo como se describe en la presente memoria se una a la proteína diana en condiciones de saturación y a continuación se mide la capacidad del anticuerpo de prueba para unirse a la proteína diana. Si el anticuerpo de prueba puede unirse a la proteína diana al mismo tiempo que el anticuerpo de referencia, el anticuerpo

de prueba se une a un epítopo diferente al del anticuerpo de referencia. Sin embargo, si el anticuerpo de prueba no puede unirse a la proteína diana al mismo tiempo, el anticuerpo de prueba se une al mismo epítopo, un epítopo solapante o un epítopo que está muy cerca del epítopo al que se ha unido el anticuerpo como se describe en la presente memoria. Este experimento se puede realizar utilizando, por ejemplo, ELISA, RIA, BIACORE™, SPR, Interferometría de biocapa o citometría de flujo. Para probar si un anticuerpo compite de forma cruzada con otro anticuerpo, se puede utilizar el método de competición descrito anteriormente en dos direcciones, es decir, determinando si el anticuerpo conocido bloquea el anticuerpo de prueba y viceversa.

[0042] El término “humanizar” se refiere al hecho de que, cuando un anticuerpo tiene un origen que es total o parcialmente no humano (p. ej., un anticuerpo murino obtenido a partir de la inmunización de ratones con un antígeno de interés, o un anticuerpo quimérico basado en tal anticuerpo murino), es posible reemplazar ciertos aminoácidos, en particular en las regiones marco y las regiones constantes de las cadenas pesada y ligera, para evitar o minimizar una respuesta inmunitaria en seres humanos. Aunque no es posible predecir con precisión la inmunogenicidad y, por lo tanto, la respuesta anti-anticuerpo humana de un anticuerpo concreto, los anticuerpos no humanos tienden a ser más inmunogénicos en seres humanos que los anticuerpos humanos. Se ha demostrado que los anticuerpos quiméricos, en los que las regiones constantes foráneas (p. ej., de roedor) han sido reemplazadas por secuencias de origen humano, son generalmente menos inmunogénicas que los anticuerpos de origen completamente foráneo, y la tendencia de los anticuerpos terapéuticos es hacia anticuerpos humanizados o completamente humanos. Los anticuerpos quiméricos u otros anticuerpos de origen no humano pueden, por tanto, humanizarse para reducir el riesgo de una respuesta anti-anticuerpo humana.

[0043] Para los anticuerpos quiméricos, la humanización típicamente implica la modificación de las regiones estructurales de las secuencias de dominio variable. Los restos de aminoácidos que forman parte de las regiones determinantes de complementariedad (CDR) con mayor frecuencia no se alterarán con relación a la humanización, aunque en ciertos casos puede ser deseable alterar los restos de aminoácidos de las CDR individuales, por ejemplo, para eliminar un sitio de glicosilación,

un sitio de desamidación, un sitio de isomerización de aspartato o un resto de cisteína o metionina no deseado. La glicosilación ligada a N se produce mediante la unión de una cadena de oligosacárido a un resto de asparragina en la secuencia tripeptídica Asn-X-Ser o Asn-X-Thr, donde X puede ser cualquier aminoácido excepto Pro. La eliminación de un sitio de N-glicosilación se puede lograr mutando el resto de Asn o Ser/Thr a un resto diferente, preferiblemente mediante sustitución conservativa. La desamidación de los restos de asparragina y glutamina se puede producir dependiendo de factores tales como el pH y la exposición de la superficie. Los restos de asparragina son particularmente susceptibles a la desamidación, principalmente cuando están presentes en la secuencia Asn-Gly, y en menor grado en otras secuencias dipeptídicas tales como Asn-Ala. Cuando un sitio de desamidación de este tipo, en particular Asn-Gly, está presente en una secuencia de CDR, puede ser deseable por lo tanto eliminar el sitio, típicamente mediante sustitución conservativa para eliminar uno de los restos implicados.

[0044] Se conocen numerosos métodos para la humanización de una secuencia de anticuerpo en la técnica; véase, p. ej., la revisión de Almagro y Fransson, *Front Biosci.* 13:1619-1633 (2008). Un método comúnmente utilizado es el injerto de CDR, que para, por ejemplo, un anticuerpo quimérico obtenido a partir de una especie murina implica la identificación de los genes homólogos de la línea germinal humana con respecto a los genes de dominio variable murino y el injerto de las secuencias de CDR murinas en este marco. La especificidad de la interacción de un anticuerpo con un antígeno diana reside principalmente en los restos de aminoácidos ubicados en las seis CDR de la cadena pesada y ligera. Por tanto, las secuencias de aminoácidos dentro de las CDR son mucho más variables entre anticuerpos individuales que las secuencias fuera de las CDR. Debido a que las secuencias de CDR son responsables de la mayoría de las interacciones anticuerpo-antígeno, es posible expresar anticuerpos recombinantes que imiten las propiedades de un anticuerpo específico de origen natural, o más generalmente cualquier anticuerpo específico con una secuencia de aminoácidos dada, por ejemplo, mediante la construcción de vectores de expresión que expresan secuencias de CDR del anticuerpo específico injertado en secuencias marco de un anticuerpo diferente. Como resultado, es posible "humanizar" un anticuerpo no humano y aún mantener sustancialmente la especificidad y afinidad de unión del anticuerpo

original. El injerto de CDR se puede basar en las definiciones de CDR de Kabat, aunque una publicación más reciente (Magdelaine-Beuzelin et al., Crit. Rev. Oncol Hematol. 64:210-225 (2007)) ha sugerido que la definición de IMGT® (el sistema de información internacional ImMunoGeneTics®, www.imgt.org) puede mejorar el resultado de la humanización (véase Lefranc et al., Dev. Comp Immunol. 27:55-77 (2003)).

[0045] En algunos casos, el injerto de CDR puede reducir la especificidad y afinidad de unión, y por lo tanto la actividad biológica, de un anticuerpo no humano injertado con CDR, en comparación con el anticuerpo parental del que se obtienen las CDR. Se pueden introducir retromutaciones (a veces denominadas de "reparación de marco") en posiciones seleccionadas del anticuerpo injertado con CDR, típicamente en las regiones marco, para restablecer la especificidad de unión y la afinidad del anticuerpo original. Las posiciones para posibles mutaciones inversas pueden identificarse utilizando la información disponible en la bibliografía y en las bases de datos de anticuerpos. Los restos de aminoácidos que son candidatos para retromutaciones suelen ser los que se encuentran en la superficie de una molécula de anticuerpo, mientras que los restos que están ocultos o que tienen un bajo grado de exposición superficial normalmente no se alterarán.

[0046] Una técnica de humanización alternativa al injerto de CDR y la retromutación es la reconstrucción superficial, en la que se conservan los restos expuestos no superficiales de origen no humano, mientras que los restos superficiales se alteran hacia restos humanos.

[0047] En ciertos casos, puede ser deseable alterar uno o más restos de aminoácidos de la CDR con el fin de mejorar la afinidad de unión al epítipo diana. Esto se conoce como "maduración por afinidad". En la técnica se conocen varios métodos de maduración por afinidad, por ejemplo, el método de mutagénesis de saturación por exploración *in vitro* descrito por Burks et al., Proc Natl Acad Sci USA, 94:412-417 (1997), y el método de maduración por afinidad *in vitro* por etapas de Wu et al., Proc Natl Acad Sci USA 95: 6037-6042 (1998).

[0048] El término "anticuerpo humano" se refiere a un anticuerpo en el que las secuencias del dominio variable y de la región constante se obtienen a partir de secuencias humanas. El término abarca anticuerpos con secuencias derivadas de genes

humanos, pero esas secuencias se han modificado, por ejemplo, para disminuir la inmunogenicidad, aumentar la afinidad y aumentar la estabilidad. El término abarca anticuerpos producidos de forma recombinante en células no humanas, que pueden conferir glucosilación no típica de células humanas. El término también incluye anticuerpos producidos en organismos transgénicos no humanos con genes de anticuerpos humanos.

[0049] El término “porción de unión a antígeno” o “fragmento de unión a antígeno” de un anticuerpo se refiere a una porción o fragmento de un anticuerpo que conservan la capacidad de unirse específicamente a un antígeno. En algunas realizaciones, un fragmento de unión a antígeno de la presente descripción es un fragmento Fab, Fab', F(ab')₂, Fv o scFv. En ciertas realizaciones, un fragmento de unión a antígeno de la presente descripción es un fragmento F(ab')₂, que es un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos por un puente disulfuro en la región bisagra (Fab es un fragmento de anticuerpo monovalente que consiste en los dominios V_L, V_H, C_L y C_{H1}). En algunas realizaciones, un fragmento de unión a antígeno de la presente descripción puede también comprender un dominio C_{H2} o C_{H3}. Los fragmentos de anticuerpos se pueden preparar, por ejemplo, a partir de anticuerpos completos utilizando técnicas convencionales, tales como digestión con papaína o pepsina de anticuerpos completos. Además, se pueden obtener anticuerpos, fragmentos de anticuerpos y moléculas de inmunoadherencia utilizando técnicas de ADN recombinante convencionales, por ejemplo, como se describe en la presente memoria.

[0050] Los anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno aquí descritos pueden ser aislados. Los términos "proteína aislada", "polipéptido aislado" o "anticuerpo aislado" se refieren a una proteína, polipéptido o anticuerpo que en virtud de su origen o fuente de obtención (1) no están asociados con componentes asociados naturalmente que lo acompañan en su estado nativo, (2) está sustancialmente libre de otras proteínas de la misma especie, (3) es expresada por una célula de una especie diferente, o (4) no se encuentra en la naturaleza. Por tanto, un polipéptido que se sintetiza químicamente o se sintetiza en un sistema celular diferente de la célula de la que se origina naturalmente será "aislado" de sus componentes asociados naturalmente. Una proteína también puede quedar sustancialmente libre de componentes asociados naturalmente mediante

aislamiento, utilizando mecanismos de purificación de proteínas bien conocidos en la técnica.

[0051] La clase (isotipo) y la subclase de los anticuerpos descritos en la presente memoria se puede determinar por cualquier método conocido en la técnica. En general, la clase y subclase de un anticuerpo se pueden determinar utilizando anticuerpos que son específicos para una clase y subclase de anticuerpo en particular. Estos anticuerpos están disponibles comercialmente. La clase y subclase se pueden determinar mediante ELISA y Transferencia Western, así como con otras técnicas. Alternativamente, la clase y subclase se pueden determinar secuenciando todas o una parte de las regiones constantes de las cadenas pesadas y/o ligeras de los anticuerpos, comparando sus secuencias de aminoácidos con las secuencias de aminoácidos conocidas de varias clases y subclases de inmunoglobulinas y determinando la clase y subclase de anticuerpos. Un isotipo preferido de la presente descripción es un isotipo IgG.

Agentes que inhiben TGF- β

[0052] En algunas realizaciones, el agente que se une específicamente a TGF- β utilizado en una terapia combinada descrita en la presente memoria es un anticuerpo anti-TGF- β o un fragmento de unión a antígeno del mismo (p. ej., Ab1, fresolimumab, XOMA 089/NIS793 (Gramont et al., *Oncoimmunology* 6(1):e1257453 (2017)), SRK-181 (Scholar Rock), ABBV-151 (AbbVie), lerdelimumab o metelimumab) o una molécula trampa de TGF- β (p. ej., M7824 (Knudson et al., *Oncoimmunology* 7(5):e1426519 (2018)) o AVID200 (Thwaites et al., *Blood* 130:2532 (2017))). En ciertas realizaciones, el anticuerpo anti-TGF- β es un anticuerpo monoclonal humano. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-TGF- β es un anticuerpo monoclonal TGF- β pan-específico que es menos propenso a formar semianticuerpos en comparación con los anticuerpos anteriores conocidos, tales como fresolimumab. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-TGF- β tiene perfiles farmacocinéticos superiores tales como una mayor exposición en el organismo en comparación con fresolimumab.

[0053] En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-TGF- β es un anticuerpo descrito en la patente PCT WO 2018/134681, la Publicación de Patente PCT WO 2006/086469, la Publicación de Patente PCT WO 2014/153435, la Patente de Estados Unidos Núm.

8.569.462, o la Patente de Estados Unidos 7.527.791, que se incorporan en la presente memoria como referencia en su totalidad. En ciertas realizaciones, el anticuerpo anti-TGF- β es el anticuerpo Ab1, o una variante del mismo, en donde la variante puede, por ejemplo, contener ciertos cambios mínimos de aminoácidos con respecto a Ab1 (p. ej., 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 cambios de aminoácidos, que pueden ser, por ejemplo, en las regiones marco) sin perder la especificidad de unión al antígeno del anticuerpo.

[0054] El anticuerpo Ab1 tiene un peso molecular estimado de 144 kD cuando se encuentra no glicosilado. Sus secuencias de aminoácidos de cadena pesada y ligera son SEQ ID NO: 1 y 2, respectivamente. Estas dos secuencias se muestran a continuación. Los dominios variables están en cursiva. Las CDR se muestran en recuadros. El sitio de glicosilación en el dominio constante de la cadena pesada está en negrita y en minúsculas (N297). Ab1 tiene una región constante de IgG₄ humana donde el resto 228 (numeración UE) en la región de bisagra ha sido mutado de serina a prolina. P228 está en recuadro y en negrita en la secuencia de SEQ ID NO: 1 que se muestra a continuación.

QVQLVQSGAE VKKPGSSVKV SCKASGYTFS **SNVIS**WVRQA PGQGLEWMG**G** **VIPIVDIANY**
AQRFKGRVTI TADESTSTTY MELSSLRSED TAVYYCAS**TL** **GLVLDAMDY**W GQGTLVTVSS
 ASTKGPSVFP LAPCSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS
 GLYSLSSVVT VPSSSLGTKT YTCNVDHKPS NTKVDKRVES KYGPPCP**P**CP APEFLGGPSV
 FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSQED PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQFnSTY
 RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPS SIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSQEEMTK
 NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTPPVLDSDGSFFLYSRL TVDKSRWQEG
 NVFSCSVME ALHNHYTQKS LSLSLGK (SEQ ID NO:1)

ETVLTQSPGT LSLSPGERAT LSC**RASQSLG** **SSYLA**WYQQK PGQAPRLLIY **GASSRAP**GIP
 DRFSGSGSGT DFTLTISRLE PEDFAVYYC**Q** **QYADSPIT**FG QGTRLEIKRT VAAPSVFIFP
 PSDEQLKSGT ASVVCLLNNF YPREAKVQWK VDNALQSGNS QESVTEQDSK DSTYSLSSTL
 TLSKADYEKH KVYACEVTHQ GLSSPVTKSF NRGEC (SEQ ID NO:2)

[0055] En algunas realizaciones, un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno anti-TGF- β descritos en la presente memoria compiten por la unión al TGF- β con, o se unen

al mismo epítopo sobre TGF- β que, Ab1.

[0056] En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-TGF- β descrito en la presente memoria tiene una cadena pesada que comprende:

- a) CDR1-3 de cadena pesada (HCDR 1-3) que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 5-7, respectivamente;
- b) un dominio variable de cadena pesada (V_H) que tiene una secuencia idéntica en al menos 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3;
- c) un V_H que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3; o
- d) la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1.

[0057] En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-TGF- β descrito en la presente memoria tiene una cadena ligera que comprende:

- a) CDR1-3 de cadena ligera (LCDR 1-3) que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 8-10, respectivamente;
- b) un dominio variable de cadena ligera (V_L) que tiene una secuencia idéntica en al menos 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4;
- c) un V_L que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4; o
- d) la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2.

[0058] En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-TGF- β descrito en la presente memoria comprende cualquiera de las cadenas pesadas anteriores combinadas con cualquiera de las cadenas ligeras anteriores.

[0059] En algunas realizaciones, un anticuerpo anti TGF- β descrito en la presente memoria comprende:

- a) HCDR 1-3 y LCDR 1-3 que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 5-10, respectivamente;
- b) un V_H que tiene una secuencia idéntica en al menos 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 y un V_L que tiene una secuencia idéntica en al menos 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4;

- c) un V_H que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 y un V_L que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4; y
- d) una HC que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 y una LC que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2.

[0060] En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-TGF-β descrito en la presente memoria (p. ej., un anticuerpo anti-TGF-β con las seis CDR o el V_H y V_L de Ab1) tiene una región constante de IgG₄ humana. En ciertas realizaciones, el resto 228 (numeración UE) en la región bisagra de la región constante de IgG₄ se ha mutado de serina a prolina. El dominio constante de un anticuerpo anti-TGF-β descrito en la presente memoria también se puede modificar, por ejemplo, en el resto de Kabat L248 (p. ej., introduciendo la mutación L248E), para reducir cualquier función efectora no deseada de la molécula.

[0061] En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-TGF-β descrito en la presente memoria tiene una región de cadena ligera kappa de inmunoglobulina humana.

[0062] En algunas realizaciones, un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno anti-TGF-β descritos en la presente memoria se unen específicamente a TGF-β1, -β2, y -β3 humano.

[0063] En algunas realizaciones, un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno anti-TGF-β descritos en la presente memoria se unen a TGF-β1, -β2, y/o -β3 (p. ej., TGF-β1, -β2, y -β3) con una K_D de 1 x 10⁻⁸ M o inferior, por ejemplo, 9 x 10⁻⁹ M, 8 x 10⁻⁹ M, 7 x 10⁻⁹ M, 6 x 10⁻⁹ M, 5 x 10⁻⁹ M, 4 x 10⁻⁹ M, 3 x 10⁻⁹ M, 2 x 10⁻⁹ M, o 1 x 10⁻⁹ M. En ciertas realizaciones, el anticuerpo anti-TGF-β o fragmento de unión a antígeno une TGF-β1, -β2 y -β3 con una K_D de 3 x 10⁻⁹ M o menor.

[0064] En algunas realizaciones, un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno anti-TGF-β descritos en la presente memoria tienen una o más de las siguientes propiedades:

- a) inhiben la transducción de señales de TGF-β;
- b) neutralizan el TGF-β cuando se analiza en un ensayo de células epiteliales de pulmón de visón;
- c) tienen una CE50 de aproximadamente 0,05 a 1 µg/mL según se determina en un ensayo de inducción de IL-11 en células A549;
- d) inhiben la diferenciación de células T CD4 positivas en células T reguladoras inducibles (iTreg);

- e) alivian el microentorno tumoral inmunosupresor;
- f) aumentan los niveles de MIP2 en un paciente (p. ej., en el tejido tumoral de un paciente);
- g) aumentan los niveles de KC/GRO en un paciente (p. ej., en el tejido tumoral de un paciente);
- h) promueven la activación o la infiltración en el tejido tumoral de las células T CD8 positivas, tales como células T CD8 positivas INF- γ -positivas;
- i) aumentan el agrupamiento de células asesinas naturales (NK) en un paciente (p. ej., en el tejido tumoral de un paciente); y
- j) restauran la actividad citolítica de las células NK-92 después de la incubación con TGF- β recombinante humano.

En algunas realizaciones, un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno anti-TGF- β descritos en la presente memoria tienen 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o todos de dichas propiedades.

[0065] En algunas realizaciones, un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno anti-TGF- β descritos en la presente memoria tienen una mayor semivida, un aumento de la exposición, o ambos, en comparación con fresolimumab. Por ejemplo, el aumento es un aumento de 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o 100% o más. La exposición de un fármaco, tal como un anticuerpo o fragmento descritos en la presente memoria, está en función de la concentración del fármaco en el organismo con respecto al tiempo. La concentración del fármaco en el organismo suele estar indicada por el nivel del fármaco en la sangre, el plasma o el suero. La semivida y la exposición (bioexposición) de un fármaco se pueden medir mediante métodos bien conocidos (p. ej., como se describe en la publicación de patente PCT WO 2018/134681).

Agentes que inhiben CD38

[0066] En algunas realizaciones, el agente que se une específicamente a CD38 utilizado en una terapia combinada descrita en la presente memoria es un anticuerpo anti-CD38 o un fragmento de unión a antígeno del mismo. En ciertas realizaciones, el anticuerpo anti-CD38 es un anticuerpo monoclonal humanizado. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-CD 38 es un anticuerpo descrito en la Patente de Estados Unidos

8.153.765, que se incorpora en la presente memoria como referencia en su totalidad. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-CD38 es producido por una línea celular de hibridoma depositada en la Colección Americana de Cultivos Tipo con el número de depósito PTA-7670. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-CD38 es Ab2, Ab3, Ab4, daratumumab, MOR202 (Raab et al., Blood 128:1152 (2016)), TAK-079 (Roepcke et al., Pharmacol Res Perspect 6(3):e00402 (2018)), TAK-573 (Takeda), TAK-169 (Takeda), HexaBody®-CD38 (Genmab/Janssen), un SIFbody anti-CD38 (Momenta) o TSK011010 (CASI).

[0067] En realizaciones concretas, el anticuerpo anti-CD38 es el anticuerpo Ab2, o una variante del mismo, en donde la variante puede por ejemplo contener ciertos mínimos cambios de aminoácidos respecto a Ab2 (p. ej., 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 cambios de aminoácidos, que pueden ser, por ejemplo, en las regiones marco) sin perder la especificidad de unión al antígeno del anticuerpo.

[0068] Las secuencias de aminoácidos de cadena pesada y ligera de Ab2 son SEQ ID NO: 11 y 12, respectivamente. Estas dos secuencias se muestran a continuación. Los dominios variables están en cursiva. Las CDR se muestran en recuadros. Ab2 tiene una región constante de IgG₁ humana

<i>QVQLVQSGAE</i>	<i>VAKPGTSVKL</i>	<i>SCKASGYTFT</i>	<i>DYWMQWVKQR</i>	<i>PGQGLEWIGT</i>	<i>IYPGDGDTGY</i>
<i>AQKFQGKATL</i>	<i>TADKSSKTVY</i>	<i>MHLSSLASED</i>	<i>SAVYYCARGD</i>	<i>YYGSNSLDYW</i>	<i>GQGTSVTVSS</i>
<i>ASTKGPSVFP</i>	<i>LAPSSKSTSG</i>	<i>GTAALGCLVK</i>	<i>DYFPEPVTVS</i>	<i>WNSGALTSGV</i>	<i>HTFPAVLQSS</i>
<i>GLYSLSSVVT</i>	<i>VPSSSLGTQT</i>	<i>YICNVNHKPS</i>	<i>NTKVDKKVEP</i>	<i>KSCDKTHTCP</i>	<i>PCPAPELLGG</i>
<i>PSVFLFPPKP</i>	<i>KDTLMISRTP</i>	<i>EVTCVVVDVS</i>	<i>HEDPEVKFNW</i>	<i>YVDGVEVHNA</i>	<i>KTKPREEQYN</i>
<i>STYRVVSVLT</i>	<i>VLHQDWLNGK</i>	<i>EYKCKVSNKA</i>	<i>LPAPIEKTIS</i>	<i>KAKGQPREPQ</i>	<i>VYTLPPSRDE</i>
<i>LTKNQVSLTC</i>	<i>LVKGFYPSDI</i>	<i>AVEWESNGQP</i>	<i>ENNYKTTTPV</i>	<i>LDSDGSFFLY</i>	<i>SKLTVDKSRW</i>

QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 11)

<i>DIVMTQSHLS</i>	<i>MSTSLGDPVS</i>	<i>ITCKASQDVS</i>	<i>TVVAWYQKQP</i>	<i>GQSPRRLIYS</i>	<i>ASYRYI</i>	<i>GVDP</i>
<i>RFTGSGAGTD</i>	<i>FTFTISSVQA</i>	<i>EDLAVYYCQQ</i>	<i>HYSPPYT</i>	<i>FGG</i>	<i>GTKLEIKRTV</i>	<i>AAPSVFIFPP</i>
<i>SDEQLKSGTA</i>	<i>SVVCLLNIFY</i>	<i>PREAKVQWKV</i>	<i>DNALQSGNSQ</i>	<i>ESVTEQDSKD</i>	<i>STYLSSTLT</i>	

LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEK (SEQ ID NO: 12)

[0069] En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno anti-CD38 compiten por la unión a CD38 con, o se une al mismo epítipo en CD38 que, Ab2.

[0070] En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-CD38 tiene una cadena pesada que comprende:

- a) CDR1-3 de cadena pesada (HCDR 1-3) que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 15-17, respectivamente;
- b) un dominio variable de cadena pesada (V_H) que tiene una secuencia idéntica en al menos 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13;
- c) un V_H que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13; o
- d) la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11.

[0071] En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-CD38 tiene una cadena ligera que comprende:

- a) CDR1-3 de cadena ligera (LCDR 1-3) que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 18-20, respectivamente;
- b) un dominio variable de cadena ligera (V_L) que tiene una secuencia idéntica en al menos 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14;
- c) un V_L que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14; o
- d) la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12.

[0072] En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-CD38 descrito en la presente memoria comprende cualquiera de las cadenas pesadas anteriores combinadas con cualquiera de las cadenas ligeras anteriores.

[0073] En algunas realizaciones, un anticuerpo anti CD38 anticuerpo descrito en la presente memoria comprende:

- a) HCDR 1-3 y LCDR 1-3 que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 15-20, respectivamente;
- b) un V_H que tiene una secuencia idéntica en al menos 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13 y un V_L que tiene una secuencia idéntica en al menos 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% a la secuencia de

aminoácidos de SEQ ID NO: 14;

c) una V_H que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13 y una V_L que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14; y

d) una HC que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11 y una LC que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12.

[0074] En ciertas realizaciones, el anticuerpo anti-CD38 es un anticuerpo Ab3, o una variante del mismo, en donde la variante puede contener, por ejemplo, ciertos cambios mínimos de aminoácidos respecto a Ab3 (p. ej., 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 cambios de aminoácidos, que pueden ser, por ejemplo, en las regiones marco) sin perder la especificidad de unión al antígeno del anticuerpo.

[0075] Las secuencias de aminoácidos de cadena pesada y ligera de Ab3 son SEQ ID NO: 25 y 26, respectivamente. Estas dos secuencias se muestran a continuación. Los dominios variables están en cursiva. Los CDR se muestran en recuadros.

<i>QVQLVQSGAE</i>	<i>VVKPGASVKV</i>	<i>SCKAS</i> <u><i>GYTFT</i></u> <i>SYAMH</i> <i>HWVKEA</i>	<i>PGQRLEWIGY</i>	<u><i>IYPGQGGT</i></u> <i>NY</i>	
<i>NQKFQGRATL</i>	<i>TADTSASTAY</i>	<i>MELSSLRSED</i>	<i>TAVYFC</i> <u><i>ARTG</i></u> <i>GLRRAYFTY</i> <i>W</i>	<i>GQGTLVTVSS</i>	
<i>ASTKGPSVFP</i>	<i>LAPSSKSTSG</i>	<i>GTAALGCLVK</i>	<i>DYFPEPVTVS</i>	<i>WNSGALTSGV</i>	<i>HTFPAVLQSS</i>
<i>GLYSLSSVVT</i>	<i>VPSSSLGTQT</i>	<i>YICNVNHKPS</i>	<i>NTKVDKKVEP</i>	<i>KSCDKTHTCP</i>	<i>PCPAPELLAG</i>
<i>PDVFLFPPKP</i>	<i>KDTLMISRTP</i>	<i>EVTCVVVDVS</i>	<i>HEDPEVKFNW</i>	<i>YVDGVEVHNA</i>	<i>KTKPREEQYN</i>
<i>STYRVVSVLT</i>	<i>VLHQDWLNGK</i>	<i>EYKCKVSNKA</i>	<i>LPLPEEKTIS</i>	<i>KAKGQPREPQ</i>	<i>VYTLPPSRDE</i>
<i>LTKNQVSLTC</i>	<i>LVKGFYPSDI</i>	<i>AVEWESNGQP</i>	<i>ENNYKTTTPV</i>	<i>LDSDGSFFLY</i>	<i>SKLTVDKSRW</i>
<i>QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPG (SEQ ID NO: 25)</i>					

<i>DIVLTQSPAT</i>	<i>LSLSPGERAT</i>	<i>ISCRAS</i> <u><i>QSVS</i></u> <i>SYGQGF</i> <i>MHWY</i>	<i>QQKPGQPRL</i>	<i>LIY</i> <u><i>GAS</i></u> <i>SRAT</i>	
<i>GIPARFSGSG</i>	<i>SGTDFTLTIS</i>	<i>PLEPEDFAVY</i>	<i>YC</i> <u><i>QQNKEDPW</i></u> <i>T</i> <i>FGGGTKLEI</i>	<i>KRTVAAPSVF</i>	
<i>IFPPSDEQLK</i>	<i>SGTASVCLL</i>	<i>NNFYPREAKV</i>	<i>QWKVDNALQS</i>	<i>GNSQESVTEQ</i>	<i>DSKDSTYSLS</i>
<i>STLTLSKADY EKHVYACEV THQGLSSPVT KSFNRGEC (SEQ ID NO: 26)</i>					

[0076] En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno anti-CD38 compiten por la unión a CD38 con, o se unen al mismo epítipo sobre CD38 que, Ab3.

[0077] En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-CD38 tiene una cadena pesada que

comprende:

- a) CDR1-3 de cadena pesada (HCDR1-3) que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 29-31, respectivamente;
- b) un dominio variable de cadena pesada (V_H) que tiene una secuencia idéntica en al menos 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 27;
- c) un V_H que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 27; o
- d) la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25.

[0078] En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-CD38 tiene una cadena ligera que comprende:

- a) CDR1-3 de cadena ligera (LCDR 1-3) que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 32-34, respectivamente;
- b) un dominio variable de cadena ligera (V_L) que tiene una secuencia idéntica en al menos 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 28;
- c) un V_L que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 28; o
- d) la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 26.

[0079] En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-CD38 descrito en la presente memoria comprende cualquiera de las cadenas pesadas anteriores combinada con cualquiera de las cadenas ligeras anteriores.

[0080] En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-CD38 descrito en la presente memoria comprende:

- a) HCDR 1-3 y LCDR 1-3 que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 29-34, respectivamente;
- b) un V_H que tiene una secuencia idéntica en al menos 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 27 y un V_L que tiene una secuencia idéntica en al menos 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 28;
- c) un V_H que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 27 y un V_L que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 28; y

- d) una HC que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25 y una LC que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 26.

[0081] En ciertas realizaciones, el anticuerpo anti-CD38 es un anticuerpo Ab4, o una variante del mismo, en donde la variante puede contener, por ejemplo, ciertos cambios mínimos de aminoácidos respecto a Ab4 (p. ej., 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 cambios de aminoácidos, que pueden ser, por ejemplo, en las regiones marco) sin perder la especificidad de unión al antígeno del anticuerpo.

[0082] Las secuencias de aminoácidos de cadena pesada y ligera de Ab4 son SEQ ID NO: 35 y 36, respectivamente. Estas dos secuencias se muestran a continuación. Los dominios variables están en cursiva. Los CDR se muestran en recuadros.

<i>QVQLVESGGG</i>	<i>VVQPGRSLRL</i>	<i>SCAAS</i> <i>GFTFS</i>	<i>SYGMH</i> <i>WVRQA</i>	<i>PGKGLEWVAV</i>	<i>IWYDGSNK</i> <i>YY</i>
<i>ADSVKGRFTI</i>	<i>SGDNSKNTLY</i>	<i>LQMNSLRAED</i>	<i>TAVYYC</i> <i>ARMF</i>	<i>RGAFDY</i> <i>WGQG</i>	<i>TLVTVSSAST</i>
<i>KGPSVFPLAP</i>	<i>SSKSTSGGTA</i>	<i>ALGCLVKDYF</i>	<i>PEPVTVSWNS</i>	<i>GALTSGVHTF</i>	<i>PAVLQSSGLY</i>
<i>SLSSVTVPS</i>	<i>SSLGTQTYIC</i>	<i>NVNHKPSNTK</i>	<i>VDKKVEPKSC</i>	<i>DKTHTCPPCP</i>	<i>APELLAGPDV</i>
<i>FLFPPKPKDT</i>	<i>LMISRTPEVT</i>	<i>CVVVDVSHED</i>	<i>PEVKFNWYVD</i>	<i>GVEVHNAKTK</i>	<i>PREEQYNSTY</i>
<i>RVVSVLTVLH</i>	<i>QDWLNGKEYK</i>	<i>CKVSNKALPL</i>	<i>PEEKTISKAK</i>	<i>GQPREPQVYT</i>	<i>LPPSRDELTK</i>
<i>NQVSLTCLVK</i>	<i>GFYPSDIAVE</i>	<i>WESNGQPENN</i>	<i>YKTTTPVLDS</i>	<i>DGSFFLYSKL</i>	<i>TVDKSRWQQG</i>
<i>NVFSCSVME</i>	<i>ALHNHYTQKS</i>	<i>LSLSPG</i>	(SEQ ID NO: 35)		

<i>AIQMTQSPSS</i>	<i>LSASVGDRV</i> <i>T</i>	<i>ITCRAS</i> <i>QGIR</i>	<i>ND</i> <i>LGWYQQK</i> <i>P</i>	<i>GKAPKLLIYA</i>	<i>AS</i> <i>SLQSGVPS</i>
<i>RFSGSGSGTD</i>	<i>FTLTISGLQP</i>	<i>EDSATYYC</i> <i>LQ</i>	<i>DYIYYPT</i> <i>FGQ</i>	<i>GTKVEIKRTV</i>	<i>AAPSVFIFPP</i>
<i>SDEQLKSGTA</i>	<i>SVVCLLNNFY</i>	<i>PREAKVQWKV</i>	<i>DNALQSGNSQ</i>	<i>ESVTEQDSKD</i>	<i>STYSLSSTLT</i>
<i>LSKADYEKHK</i>	<i>VYACEVTHQG</i>	<i>LSSPVTKSFN</i>	<i>RGEC</i>	(SEQ ID NO: 36)	

[0083] En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno anti-CD38 compiten por la unión a CD38 con, o se une al mismo epítipo sobre CD38 que, Ab4.

[0084] En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-CD38 tiene una cadena pesada que comprende:

- a) CDR1-3 de cadena pesada (HCDR1-3) que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 39-41, respectivamente;

- b) un dominio variable de cadena pesada (V_H) que tiene una secuencia idéntica en al menos 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 37;
- c) un V_H que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 37; o
- d) la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 35.

[0085] En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-CD38 tiene una cadena ligera que comprende:

- a) CDR1-3 de cadena ligera (LCDR 1-3) que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 42-44, respectivamente;
- b) un dominio variable de cadena ligera (V_L) que tiene una secuencia idéntica en al menos 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 38;
- c) un V_L que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 38; o
- d) la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 36.

[0086] En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-CD38 descrito en la presente memoria comprende cualquiera de las cadenas pesadas anteriores combinada con cualquiera de las cadenas ligeras anteriores.

[0087] En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-CD38 descrito en la presente memoria comprende:

- a) HCDR 1-3 y LCDR 1-3 que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 39-44, respectivamente;
- b) un V_H que tiene una secuencia idéntica en al menos 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 37 y un V_L que tiene una secuencia idéntica en al menos 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 38;
- c) un V_H que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 37 y un V_L que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 38; y
- d) una HC que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 35 y una LC que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 36.

[0088] En algunas realizaciones, un anticuerpo anti CD38 anticuerpo descrito en la

presente memoria tiene una región constante de IgG₁ humana.

[0089] En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-CD38 descrito en la presente memoria tiene una región de cadena ligera kappa de inmunoglobulina humana.

[0090] En algunas realizaciones, un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno anti-CD38 descritos en la presente memoria se unen a CD38 con una K_D de 1×10^{-8} M o inferior, por ejemplo, 9×10^{-9} M, 8×10^{-9} M, 7×10^{-9} M, 6×10^{-9} M, 5×10^{-9} M, 4×10^{-9} M, 3×10^{-9} M, 2×10^{-9} M, o 1×10^{-9} M. En ciertas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno anti-CD38 se unen a CD38 con una K_D de 3×10^{-9} M o menor.

[0091] En algunas realizaciones, un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno anti-CD38 descritos en la presente memoria destruyen una célula CD38 positiva mediante apoptosis, ADCC, CDC y; en ciertas realizaciones, la destrucción de dichas células CD38 positivas mediante apoptosis puede ocurrir en ausencia de células de estroma o citocinas derivadas de estroma. En algunas realizaciones, la célula CD38 positiva es una célula maligna. En algunas realizaciones, la célula CD38 positiva es una célula B. En ciertas realizaciones, la célula CD38 positiva es una célula tumoral derivada de un tumor maligno hematopoyético. En una realización más preferida, la célula CD38 positiva es una célula de linfoma, una célula de leucemia o una célula de mieloma múltiple. En una realización preferida adicional, la célula CD38 positiva es una célula NHL, BL, MM, B-CLL, ALL, TCL, AML, HCL, HL o CML.

[0092] En algunas realizaciones, un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno anti-CD38 descrito en la presente memoria es capaz de destruir al menos 10%, 15%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26 %, 27%, 28%, 29%, 30%, 35% o 40% (p. ej., al menos 24%) de células de linfoma de Daudi en ausencia de células de estroma o citocinas derivadas de estroma in vitro.

[0093] En algunas realizaciones, un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno anti-CD38 descritos en la presente memoria son capaces de destruir al menos 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, o 10% (p. ej., al menos 7%) de células de linfoma de Ramos en ausencia de células de estroma o citocinas derivadas de estroma in vitro.

[0094] En algunas realizaciones, un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno anti-CD38 descrito en la presente memoria son capaces de destruir al menos 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13 %, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19% o 20% (p. ej., al menos

11%) de células de mieloma múltiple MOLP-8 en ausencia de células de estroma o citocinas derivadas de estroma en vitro.

[0095] En algunas realizaciones, un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno anti-CD38 descrito en la presente memoria son capaces de destruir al menos 25%, 30%, 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 36%, 37 %, 38%, 39%, 40%, 45% o 50% (p. ej., al menos 36%) de células de linfoma SU-DHL-8 en ausencia de células de estroma o citocinas derivadas de estroma in vitro.

[0096] En algunas realizaciones, un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno anti-CD38 descrito en la presente memoria son capaces de destruir al menos 20%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, o 35% (p. ej., al menos 27%) de células de linfoma NU-DUL-1 en ausencia de células de estroma o citocinas derivadas de estroma in vitro.

[0097] En algunas realizaciones, un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno anti-CD38 descritos en la presente memoria son capaces de destruir al menos 50%, 55%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 70 %, o 75% (p. ej., al menos 62%) de células de leucemia DND-41 en ausencia de células de estroma o citocinas derivadas de estroma in vitro.

[0098] En algunas realizaciones, un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno anti-CD38 descritos en la presente memoria son capaces de destruir al menos 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, o 13% (p. ej., al menos 9%) de células de leucemia JVM-13 en ausencia de células de estroma o citocinas derivadas de estroma in vitro.

[0099] En algunas realizaciones, un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno anti-CD38 descritos en la presente memoria son capaces de destruir al menos 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, u 8% (p. ej., al menos 4%) de células de leucemia HC-1 en ausencia de células de estroma o citocinas derivadas de estroma in vitro.

[0100] En algunas realizaciones, el agente que se une específicamente a CD38 es un producto conjugado que comprende un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno anti-CD38 descrito en la presente memoria conectado a un agente citotóxico. El agente citotóxico puede seleccionarse entre, por ejemplo, un maitansinoide, un fármaco pequeño, un derivado de tomaymicina, un derivado de leptomicina, un profármaco, un taxoide, CC-1065 y un análogo de CC-1065, o cualquier agente citotóxico descrito en la patente de EE.UU. Núm. 8.153.765. (que se incorpora en la presente memoria como

referencia en su totalidad).

[0101] La clase de un anticuerpo anti-TGF- β o anti-CD38 descrito en la presente memoria puede ser cambiada o remplazada por otra clase o subclase. En un aspecto, una molécula de ácido nucleico que codifica V_L o V_H se aísla utilizando métodos bien conocidos en la técnica de manera que no incluye secuencias de ácido nucleico que codifican CL o CH. Las moléculas de ácido nucleico que codifican V_L o V_H se unen a continuación operativamente a una secuencia de ácido nucleico que codifica una CL o CH, respectivamente, de una clase diferente de molécula de inmunoglobulina. Esto se puede lograr utilizando un vector o molécula de ácido nucleico que comprenda una cadena CL o CH, como se describió anteriormente. Por ejemplo, un anticuerpo que originalmente era IgM puede cambiarse de clase a IgG. Adicionalmente, el cambio de clase se puede utilizar para convertir una subclase de IgG en otra, por ejemplo, de IgG1 a IgG2. Una región constante de cadena ligera κ se puede cambiar, por ejemplo, a una región constante de cadena ligera λ . Un método preferido para producir un anticuerpo como se describe en la presente memoria con un isotipo de Ig deseado comprende las etapas de aislar una molécula de ácido nucleico que codifica la cadena pesada de un anticuerpo y una molécula de ácido nucleico que codifica la cadena ligera de un anticuerpo, obteniendo el dominio variable de la cadena pesada, ligando el dominio variable de la cadena pesada con la región constante de una cadena pesada del isotipo deseado, expresando la cadena ligera y la cadena pesada ligada en una célula, y recolectando el anticuerpo con el isotipo deseado.

[0102] Un anticuerpo descrito en la presente memoria puede ser una molécula de IgG, de IgM, de IgE, de IgA o de IgD, pero típicamente es del isotipo IgG, p. ej. de la subclase de IgG IgG₁, IgG_{2a} o IgG_{2b}, IgG₃, o IgG₄.

[0103] En una realización, el anticuerpo puede comprender al menos una mutación en la región Fc. Se conocen varias mutaciones de Fc diferentes, donde estas mutaciones proporcionan una función efectora alterada. Por ejemplo, en muchos casos será deseable reducir o eliminar la función efectora, por ejemplo, cuando no se desean interacciones ligando/receptor o en el caso de productos conjugados de anticuerpo-fármaco.

[0104] En algunas realizaciones, los anticuerpos descritos en la presente memoria, tales

como los anticuerpos anti-TGF- β y anti-CD38, no tienen la lisina C-terminal en la cadena pesada. La lisina C-terminal puede ser eliminada durante la fabricación o por tecnología recombinante (es decir, la secuencia codificante de la cadena pesada no incluye un codón para la lisina C-terminal). Por tanto, también se contemplan en la presente descripción anticuerpos que comprenden la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de SEQ ID NO: 1 u 11 sin la lisina C-terminal.

Terapias combinadas

[0105] La presente descripción proporciona una terapia combinada que comprende un agente que se une específicamente a TGF- β humano y un agente que se une específicamente a CD38 humano. En algunas realizaciones, el agente que se une específicamente a TGF- β puede ser cualquiera de los anticuerpos anti-TGF- β o fragmentos de unión a antígeno de los mismos descritos en la presente memoria. En algunas realizaciones, el agente que se une específicamente a CD38 puede ser cualquiera de los anticuerpos anti-CD38 o fragmentos de unión a antígeno de los mismos descritos en la presente memoria. La presente descripción también contempla la terapia combinada con uno o más agentes que inhiben TGF- β (p. ej., galunisertib, LY3200882, PF-06952229 (Pfizer), GFH-018 (GenFleet) y/o vactosertib) y/o uno o más de otros agentes que inhiben CD38. Una terapia combinada descrita en la presente memoria puede adoptar la forma de un método de tratamiento utilizando dichos agentes o una composición farmacéutica que comprende dichos agentes.

[0106] La presente descripción también contempla una terapia combinada que comprende un agente que se une específicamente a CD38 humano (p. ej., un anticuerpo anti-CD38 o fragmento de unión a antígeno del mismo, tal como se describe en la presente memoria) y un agente que se une específicamente a LAP (p. ej., un anticuerpo anti-LAP).

[0107] En algunas realizaciones, la terapia combinada de la presente descripción utiliza el anticuerpo anti-TGF- β Ab1 y el anticuerpo anti-CD38 Ab2. En algunas realizaciones, la terapia combinada de la presente descripción utiliza un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo que compite por unirse o se une al mismo epítipo de TGF- β que Ab1 y un anticuerpo que compite por unirse o se une al mismo epítipo de CD38

que Ab2. En ciertas realizaciones, los agentes Ab1 y Ab2 se utilizan en composiciones separadas (p. ej., administradas secuencialmente). En ciertas realizaciones, los agentes Ab1 y Ab2 se utilizan en una única composición.

[0108] En ciertas realizaciones, la terapia combinada de la presente descripción utiliza:

- un anticuerpo anti-TGF- β o un fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende HCDR 1-3 y LCDR 1-3 con las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 5-10, respectivamente; y un anticuerpo anti-CD38 que comprende HCDR 1-3 y LCDR 1-3 con las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 15-20, respectivamente;
- un anticuerpo anti-TGF- β o un fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende un V_H con una secuencia idéntica en al menos 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3, y un V_L con una secuencia idéntica en al menos 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93 %, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4; y un anticuerpo anti-CD38 que comprende un V_H con una secuencia idéntica en al menos 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13, y un V_L con una secuencia idéntica en al menos 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96 %, 97%, 98% o 99% a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14;
- un anticuerpo anti-TGF- β o un fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende un V_H y un V_L con las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 y 4, respectivamente; y un anticuerpo anti-CD38 que comprende un V_H y V_L con las secuencias de aminoácidos de SEC ID NO: 13 y 14, respectivamente; o
- un anticuerpo anti-TGF- β que comprende una HC y LC con las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 y 2, respectivamente; y un anticuerpo anti-CD38 que comprende una HC y una LC con las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 11 y 12, respectivamente.

[0109] En algunas realizaciones, los anticuerpos anti-TGF- β y anti-CD38 utilizados en la terapia combinada tienen isotipos IgG₄ e IgG₁, respectivamente. En ciertas realizaciones, el anticuerpo anti-TGF- β tiene una región constante de IgG₄ humana donde el resto 228 (numeración UE) en la región bisagra se ha mutado de serina a prolina.

[0110] En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-TGF- β o fragmento de unión a

antígeno del mismo descritos en la presente memoria alivia los efectos inmunosupresores de TGF- β en ADCC mediada por células NK por un anticuerpo anti-CD38 descritos en la presente memoria, haciendo que la terapia combinada de la presente descripción sea más eficaz que el tratamiento con el anticuerpo anti-CD38 solo.

[0111] En algunas realizaciones, una terapia combinada que comprende un agente que se une específicamente a TGF- β humano y un agente que se une específicamente a CD38 humano (p. ej., un anticuerpo anti-TGF- β y un anticuerpo anti-CD38, tales como Ab1 y Ab2, respectivamente) puede comprender adicionalmente un agente o terapia adicional. En ciertas realizaciones, el agente o terapia adicional puede ser, p. ej., lenalidomida, pomalidomida, bortezomib, metilprednisolona, dexametasona, prednisona, melfalán, bortezomib, ixazomib, carfilzomib, talidomida, ciclofosfamida, pembrolizumab, inhibidor pan-histona desacetilasa (p. ej. Panobinostat), un ácido retinoico (p. ej., ácido retinoico todo trans), radioinmunoterapia, quimioterapia, etc. En ciertas realizaciones, el agente o terapia adicional es una combinación de lenalidomida y dexametasona. En ciertas realizaciones, el agente o terapia adicional es una combinación de bortezomib, melfalán y prednisona. En ciertas realizaciones, el agente o terapia adicional es una combinación de bortezomib y dexametasona. En ciertas realizaciones, el agente o terapia adicional es una combinación de pomalidomida y dexametasona. En ciertas realizaciones, el agente o terapia adicional es dexametasona. En algunas realizaciones, el agente o terapia adicional es un tratamiento para la afección dirigida por la terapia combinada de la presente descripción. Por ejemplo, cuando la afección es mieloma (p. ej., mieloma múltiple), el tratamiento puede ser, p. ej., elotuzumab.

[0112] En algunas realizaciones, los agentes en una terapia combinada de la presente descripción se administran en más de una composición. En ciertas realizaciones, cada agente se proporciona en una composición separada. En caso de que haya más de una composición, las composiciones se pueden administrar de forma simultánea, secuencial o por separado. En otras realizaciones, los agentes se administran en una sola composición. Por ejemplo, una terapia combinada que comprende un anticuerpo anti-TGF- β y un anticuerpo anti-CD38 puede implicar la administración de una composición única que comprende ambos anticuerpos, o una composición separada para cada anticuerpo (donde las composiciones separadas se pueden administrar de forma

secuencial o concurrente).

Usos terapéuticos de las terapias combinadas de la presente descripción

[0113] En un aspecto, las terapias combinadas de la presente descripción se utilizan para tratar una afección que se basa en la expresión de CD38. En algunas realizaciones, las terapias combinadas de la presente descripción se utilizan para tratar un trastorno hiperproliferativo, una enfermedad inflamatoria, una enfermedad autoinmunitaria o una afección fibrótica. En ciertas realizaciones, las terapias combinadas de la presente descripción se utilizan para tratar el cáncer.

[0114] En algunas realizaciones, las terapias combinadas de la presente descripción se dirigen a células CD38 positivas (p. ej., células de cáncer CD38 positivas, tales como células B malignas). Una célula se puede identificar como CD38 positiva mediante cualquier método adecuado para determinar la expresión de genes o proteínas, por ejemplo, mediante histología, citometría de flujo, RT-PCR o secuenciación de ARN. Las células cancerosas utilizadas para la determinación se pueden obtener mediante biopsia tumoral o mediante la recolección de células tumorales circulantes. Sin desear ceñirse a la teoría, se contempla que el agente que se une específicamente a CD38 se unirá a células CD38 positivas y mediará ADCC/CDC en las células, y que el agente que se une específicamente a TGF- β reducirá la inmunidad o efecto supresor de TGF- β , mejorando así la eficacia de la terapia contra el cáncer.

[0115] En algunas realizaciones, las terapias combinadas de la presente descripción se utilizan para tratar el mieloma tales como el mieloma múltiple (p. ej., recaída y/o mieloma múltiple refractario, mieloma múltiple recién diagnosticado (opcionalmente no elegible para el trasplante), mieloma múltiple latente, mieloma de cadena ligera, mieloma no secretor, mieloma de inmunoglobulina D o mieloma de inmunoglobulina E). En ciertas realizaciones, las terapias combinadas de la presente descripción dan como resultado una menor destrucción ósea en las lesiones óseas de mieloma que la terapia con solo un agente que se une específicamente a CD38 (p. ej., un anticuerpo anti-CD38). En realizaciones concretas, las terapias combinadas de la presente descripción pueden dar como resultado una curación mejorada de las lesiones óseas de mieloma. Sin desear ceñirse a la teoría, se contempla que el agente que se une específicamente a TGF- β (p.

ej., un anticuerpo anti-TGF- β) inhibirá la actividad supresora de TGF-beta sobre la diferenciación de osteoblastos y la mineralización de la matriz, mejorando así la formación hueso y dando como resultado remodelación ósea y consolidación ósea. Además, debido a que los osteoblastos maduros potencian la apoptosis y la detención del ciclo celular de las células de mieloma múltiple, el agente que se une específicamente a TGF- β también puede suprimir el crecimiento de las células de mieloma múltiple.

[0116] En algunas realizaciones, las terapias combinadas de la presente descripción se utilizan para tratar, p. ej., la amiloidosis (tal como amiloidosis primaria recurrente o refractaria o la amiloidosis de cadena ligera), el síndrome mielodisplásico (MDS), la gammapatía monoclonal, el plasmacitoma solitario, el plasmacitoma extramedular, o la macroglobulinemia de Waldenström.

[0117] En algunas realizaciones, las terapias combinadas de la presente descripción se utilizan para tratar un tumor maligno hematológico, por ejemplo, leucemia o linfoma. Por ejemplo, el tumor maligno puede ser leucemia linfocítica crónica, leucemia linfocítica aguda B y T, leucemia linfoblástica aguda (p. ej., leucemia linfoblástica aguda de células B o leucemia linfoblástica aguda de células B o de precursores de células T), leucemia mieloide aguda linfocítica crónica, leucemia mieloide crónica, leucemia mielógena aguda, leucemia mielógena crónica, leucemia promielocítica y leucemia de células pilosas), linfoma no Hodgkin, linfoma de Hodgkin, linfoma de Burkitt, linfoma de células B (tal como linfoma difuso de células B grandes o linfoma de células B de centro germinal), linfoma de células T (tal como linfoma periférico de células T), linfoma de células asesinas naturales/células T (p. ej., tipo nasal), linfoma linfoblástico, linfoma de células del manto y linfoma folicular. En ciertas realizaciones, las terapias combinadas de la presente descripción se utilizan para tratar la leucemia linfoblástica.

[0118] Otros tipos de cáncer que pueden ser tratados mediante las terapias combinadas de la presente descripción pueden ser tumores sólidos y pueden incluir, pero no se limitan a, cáncer de piel (p. ej., melanoma, incluyendo melanoma no resecable o metastásico, carcinoma cutáneo de células escamosas, xeroderma pigmentosa y queratoacantoma), cáncer de tiroides, cáncer de pulmón (p. ej., cáncer de pulmón de células no pequeñas), cáncer de esófago, cáncer de estómago, cáncer de colon, cáncer colorrectal, cáncer de páncreas, cáncer de hígado (p. ej., carcinoma hepatocelular), cáncer peritoneal primario,

cáncer de vejiga, cáncer renal o cáncer de riñón (p. ej., carcinoma de células renales), carcinoma urotelial, cáncer de mama (p. ej., cáncer de mama Her2 positivo o cáncer de mama triple negativo), cáncer de ovario, cáncer de trompas de Falopio, cáncer de cuello uterino, cáncer de útero, cáncer de próstata, cáncer testicular, cáncer de cabeza y cuello (p. ej., carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello), cáncer de cerebro, neuroblastoma, glioblastoma, glioma, astrocitoma, schwannoma, mesotelioma, fibrosarcoma, rhabdomioma, osteosarcoma, sarcoma de Kaposi, seminoma, y teratocarcinoma. En algunas realizaciones, se utiliza una terapia combinada de la presente descripción para tratar cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de próstata (p. ej., adenocarcinoma de próstata), glioblastoma, cáncer hepatocelular, cáncer de ovario, cáncer de cabeza y cuello, cáncer urotelial o cáncer colorrectal.

[0119] Las terapias combinadas de la presente descripción también pueden ser útiles para inhibir el tumor maligno mediado ciclosporina o la progresión del cáncer (p. ej., metástasis).

[0120] En algunas realizaciones, las terapias combinadas de la presente descripción son útiles en el tratamiento de cáncer en una fase temprana, intermedia, avanzada o metastásica. En algunas realizaciones, las terapias combinadas se utilizan para tratar a un paciente (p. ej., un paciente con mieloma múltiple) que ha recibido al menos una terapia previa. En algunas realizaciones, las terapias combinadas son útiles para tratar el cáncer recurrente o refractario.

[0121] En algunas realizaciones, las terapias combinadas de la presente descripción se utilizan para tratar cualquiera de las afecciones descritas en la presente memoria (p. ej., un cáncer descrito en la presente memoria) en un paciente que ha progresado durante o después de la terapia convencional para dicha afección, o para quien no existe una terapia convencional eficaz para dicha afección.

[0122] En algunas realizaciones, las terapias combinadas de la presente descripción se utilizan para tratar cualquiera de las afecciones descritas en la presente memoria (p. ej., un cáncer descrito en la presente memoria) en un paciente que es resistente a una o más terapias convencionales para dicha afección. En ciertas realizaciones, el paciente puede tener una afección (p. ej., un cáncer tal como mieloma múltiple) refractaria al tratamiento con Ab2, Ab3, Ab4, galunisertib, LY3200882, XOMA 089, daratumumab,

MOR202, TAK-079, TAK-573, TAK-169, HexaBody®-CD38, o cualquier combinación de los mismos. La afección puede ser refractaria al tratamiento con un agente que se une específicamente a CD38. En realizaciones concretas, el paciente puede tener una afección (p. ej., un cáncer tal como mieloma múltiple) refractaria al tratamiento con Ab2 o al tratamiento con daratumumab, o refractaria a ambos tratamientos.

[0123] En algunas realizaciones, las terapias combinadas de la presente descripción se utilizan para tratar un cáncer descrito en la presente memoria, en donde el cáncer muestra altos niveles de expresión de TGF- β . En ciertas realizaciones, el cáncer muestra altos niveles de expresión de TGF- β y es resistente al tratamiento con un agente que se une específicamente a CD38 (p. ej., Ab2, Ab3, Ab4, daratumumab, MOR202, TAK-079, TAK-573, TAK-169, HexaBody®-CD38, o cualquier combinación de los mismos). En realizaciones concretas, el cáncer puede ser refractario al tratamiento con Ab2 o al tratamiento con daratumumab, o refractario a ambos tratamientos.

[0124] En algunas realizaciones, las terapias combinadas de la presente descripción se utilizan para tratar a un paciente con mieloma múltiple recién diagnosticado que no puede recibir un tipo de trasplante de células madre que utiliza sus propias células madre (trasplante autólogo de células madre). Adicional o alternativamente, el paciente ha recibido al menos un medicamento previo para tratar el mieloma múltiple. En realizaciones concretas, las terapias combinadas comprenden adicionalmente:

- a) lenalidomida y/o dexametasona,
- b) bortezomib, lenalidomida y/o dexametasona,
- c) bortezomib, melfalán y/o prednisona, o
- d) bortezomib y/o dexametasona.

[0125] En algunas realizaciones, las terapias combinadas de la presente descripción se utilizan para tratar a un paciente que ha recibido al menos dos medicamentos anteriores para tratar el mieloma múltiple. En ciertas realizaciones, los dos medicamentos anteriores incluyen lenalidomida y/o un inhibidor del proteasoma.

[0126] En algunas realizaciones, las terapias combinadas de la presente descripción se utilizan para tratar a un paciente que ha recibido al menos tres medicamentos anteriores para tratar el mieloma múltiple. En ciertas realizaciones, los tres medicamentos anteriores incluyen un inhibidor del proteasoma y/o un agente inmunomodulador.

[0127] En algunas realizaciones, las terapias combinadas de la presente descripción se utilizan para tratar a un paciente que no respondió a un inhibidor del proteasoma y/o un agente inmunomodulador.

[0128] En algunas realizaciones, las terapias combinadas de la presente descripción se utilizan para tratar a un paciente con mieloma múltiple recurrente/refractario combinado con pomalidomida y/o dexametasona (p. ej., dosis baja de dexametasona). En ciertas realizaciones, el paciente ha recibido al menos dos medicamentos anteriores para tratar el mieloma múltiple. En realizaciones concretas, los dos medicamentos anteriores incluyen lenalidomida y/o un inhibidor del proteasoma.

[0129] "Tratar", "tratando" y "tratamiento" se refieren a un método para aliviar o anular un trastorno biológico y/o al menos uno de sus síntomas acompañantes. Como se emplea en la presente memoria, "aliviar" una enfermedad, trastorno o afección significa reducir la gravedad y/o la frecuencia de aparición de los síntomas de la enfermedad, trastorno o afección. Adicionalmente, las referencias en la presente memoria a "tratamiento" incluyen referencias a tratamientos curativos, paliativos y profilácticos. Por supuesto, se apreciará que, en el contexto de la terapia del cáncer, "tratamiento" incluye cualquier intervención médica que dé como resultado la desaceleración del crecimiento del cáncer, el retraso en la progresión o recurrencia del cáncer o la reducción de las metástasis del cáncer, así como la remisión parcial del cáncer para prolongar la esperanza de vida de un paciente.

[0130] Como se emplea en la presente memoria, los términos "administración conjunta", "administrado conjuntamente" y "combinado con" se refieren, sin limitación, a (i) la administración simultánea de los agentes terapéuticos a un paciente que necesita tratamiento, cuando tales agentes se formulan juntos en una sola forma de dosificación, (ii) la administración sustancialmente simultánea de tales agentes es a un paciente que necesita tratamiento, cuando tales agentes se formulan separados entre sí en formas de dosificación separadas, y (iii) administración secuencial de tales agentes a un paciente que necesita tratamiento, cuando tales agentes se formulan separados entre sí en formas de dosificación separadas que son ingeridos en distintos momentos por dicho paciente.

[0131] La razón entre el agente que se une específicamente a TGF- β (p. ej., un anticuerpo anti-TGF- β) y el agente que se une específicamente a CD38 (p. ej., un

anticuerpo anti-CD38) puede ser tal que los agentes son administrados en cantidades iguales (es decir, a una razón de 1: 1), pero no es necesario que sea así. Dependiendo de las características de los agentes individuales, puede ser deseable utilizar cantidades no iguales de los agentes.

[0132] Se entiende que las terapias combinadas de la presente descripción se pueden utilizar en un método de tratamiento como se describe en la presente memoria, puede ser para uso en un tratamiento como se describe en la presente memoria, y/o puede ser para uso en la fabricación de un medicamento para un tratamiento como se describe en la presente memoria.

Régimen de dosificación

[0133] Las terapias combinadas de la presente descripción se administrarán en una cantidad eficaz para el tratamiento de la afección en cuestión, es decir, a dosificaciones y durante periodos de tiempo necesarios para alcanzar un resultado deseado. Una cantidad terapéuticamente eficaz puede variar según factores tales como la afección concreta que se esté tratando, la edad, el sexo, la salud y el peso del paciente, y si los agentes se administran como un tratamiento independiente o combinados con uno o más tratamiento contra el cáncer adicionales.

[0134] "Cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a la cantidad del agente terapéutico que se administra y que aliviará hasta cierto punto uno o más de los síntomas del trastorno que se está tratando. Esta cantidad puede ser determinada por un profesional sanitario utilizando principios bien establecidos. Una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente terapéutico contra el cáncer puede, por ejemplo, dar como resultado la contracción del tumor, el aumento de la supervivencia, la eliminación de células cancerosas, la disminución de la progresión de la enfermedad, la reversión de la metástasis u otros criterios de valoración clínicos deseados por los profesionales sanitarios.

[0135] En algunas realizaciones, los pacientes son controlados para determinar los efectos secundarios cardiacos y pulmonares cuando son tratados con las terapias combinadas de la presente descripción.

Células anfitrionas y métodos de producción de anticuerpos y composición de anticuerpos

[0136] Un aspecto de la presente descripción se refiere a métodos para producir los anticuerpos para las presentes terapias combinadas. Una realización se refiere a un método para producir anticuerpos como se describe en la presente memoria, que comprende proporcionar la célula anfitriona recombinante capaz de expresar los anticuerpos, cultivar dichas células anfitrionas en condiciones adecuadas para la expresión de los anticuerpos, y aislar los anticuerpos resultantes. Los anticuerpos producidos por tal expresión en tales células anfitrionas recombinantes se denominan en la presente memoria "anticuerpos recombinantes". También se describen las células de la progenie de tales células anfitrionas y los anticuerpos producidos por las mismas.

[0137] El término "célula anfitriona recombinante" (o simplemente "célula anfitriona"), como se emplea en la presente memoria, significa una célula en la que se ha introducido un vector de expresión recombinante. La célula anfitriona puede comprender, p. ej., uno o más vectores como se describe en la presente memoria. Las células anfitrionas pueden comprender, p. ej., una secuencia de nucleótidos que codifica la cadena pesada o un fragmento de unión a antígeno de la misma, una secuencia de nucleótidos que codifica la cadena ligera o un fragmento de unión a antígeno de la misma, o ambos, de un anticuerpo anti-TGF- β y/o anti-CD38 o fragmento de unión a antígeno del mismo descritos en la presente memoria. Debe entenderse que "célula anfitriona recombinante" y "célula anfitriona" significan no sólo la célula sujeto en particular sino también la progenie de tal célula. Debido a que se pueden producir ciertas modificaciones en las generaciones sucesivas debido a mutaciones o influencias ambientales, tal progenie puede no ser, de hecho, idéntica a la célula parental, pero todavía está incluida dentro del alcance del término "célula anfitriona" como se emplea en la presente memoria.

[0138] En algunas realizaciones, una célula anfitriona de la presente descripción comprende:

- una secuencia de nucleótidos que codifica la cadena pesada o un fragmento de unión a antígeno de la misma, una secuencia de nucleótidos que codifica la cadena ligera o un fragmento de unión a antígeno de la misma, o ambos, de un anticuerpo anti-TGF- β como se describe en la presente memoria, y

- una secuencia de nucleótidos que codifica la cadena pesada o un fragmento de unión a antígeno de la misma, una secuencia de nucleótidos que codifica la cadena ligera o un fragmento de unión a antígeno de la misma, o ambos, de un anticuerpo anti-CD38 como se describe en la presente memoria.

[0139] Las moléculas de ácido nucleico que codifican las secuencias de aminoácidos de cadena pesada y/o ligera de anticuerpos anti-TGF- β y/o anti-CD38 o fragmentos de unión a antígeno de los mismos pueden estar comprendidas en vectores de expresión. Los vectores de expresión, en los que las secuencias de ácido nucleico de interés están conectadas a secuencias de control de la expresión necesarias, tales como secuencias de control de la transcripción y la traducción, incluyen plásmidos, retrovirus, adenovirus, virus adenoasociados (AAV), virus de plantas como el virus del mosaico de la coliflor, virus del mosaico el tabaco, cósmidos, YAC, episomas derivados de EBV y similares. La secuencia codificante de la cadena ligera del anticuerpo y la secuencia codificante de la cadena pesada del anticuerpo se pueden insertar en vectores separados y se pueden conectar operativamente a las mismas secuencias de control de la expresión o diferentes (p. ej., promotores). En una realización, ambas secuencias codificantes se insertan en el mismo vector de expresión y se pueden conectar operativamente a las mismas secuencias de control de la expresión (p. ej., un promotor común), a secuencias de control de la expresión idénticas separadas (p. ej., promotores) o a diferentes secuencias de control de la expresión (p. ej., promotores). Las secuencias que codifican el anticuerpo se pueden insertar en el vector de expresión mediante métodos convencionales (p. ej., ligación de sitios de restricción complementarios en el fragmento del gen del anticuerpo y el vector, o ligación de extremos romos si no hay sitios de restricción presentes).

[0140] Los vectores de expresión que codifican los anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos descritos en la presente memoria pueden ser introducidos en células anfitrionas para su expresión. En algunas realizaciones, los vectores de expresión que codifican el anticuerpo anti-TGF- β y los vectores de expresión que codifican el anticuerpo anti-CD38 se introducen en células anfitrionas separadas. En otras realizaciones, los vectores de expresión se introducen en la misma célula anfitriona. Las células anfitrionas se cultivan en condiciones adecuadas para la expresión del anticuerpo, que a continuación se recolecta y aísla. Las células anfitrionas incluyen

células anfitrionas de mamífero, vegetales, bacterianas o de levadura. Las líneas de células de mamíferos disponibles como anfitriones para la expresión son bien conocidas en la técnica e incluyen muchas líneas de células inmortalizadas disponibles de la Colección de Americana de Cultivos Tipo (ATCC). Estas incluyen, entre otras, células de ovario de hámster chino (CHO), células NS0, células SP2, células HEK-293T, células 293 Freestyle (Invitrogen), células NIH-3T3, células HeLa, células de riñón de cría de hámster (BHK), células de riñón de mono verde africano (COS), células de carcinoma hepatocelular humano (p. ej., Hep G2), células A549 y varias otras líneas celulares. Las líneas celulares pueden seleccionarse basándose en sus niveles de expresión. Otras líneas celulares que se pueden utilizar son las líneas celulares de insectos, tales como las células Sf9 o Sf21.

[0141] Adicionalmente, la expresión de anticuerpos se puede potenciar utilizando varias técnicas conocidas. Por ejemplo, el sistema de expresión del gen de la glutamina sintetasa (el sistema GS) es un enfoque común para potenciar la expresión en determinadas condiciones.

[0142] Los medios de cultivo de tejidos para las células anfitrionas pueden incluir, o estar libres de, componentes derivados de animales (ADC), tales como albúmina de suero bovino. En algunas realizaciones, se prefieren los medios de cultivo sin ADC para la seguridad humana. El cultivo de tejidos se puede realizar utilizando el método de alimentación por lotes, un método de perfusión continua o cualquier otro método apropiado para las células anfitrionas y el rendimiento deseado.

[0143] En algunas realizaciones, los presentes descripción se refiere a un método para producir una composición de anticuerpos que comprende un anticuerpo anti-TGF- β o un fragmento de unión a antígeno del mismo y un anticuerpo anti-CD38 o un fragmento de unión a antígeno del mismo, comprendiendo el método:

- proporcionar primeras y segundas células anfitrionas, en donde la primera célula anfitriona es capaz de expresar un anticuerpo anti-TGF- β o un fragmento de unión a antígeno del mismo como se describe en la presente memoria y la segunda célula anfitriona es capaz de expresar un anticuerpo anti-CD38 o un fragmento de unión a antígeno del mismo como se describe en la presente memoria,
- cultivar la primera y segunda y células anfitrionas en condiciones adecuadas para la

expresión del anticuerpo anti-TGF- β o fragmento de unión a antígeno del mismo y el anticuerpo anti-CD38 o fragmento de unión a antígeno del mismo,

- aislar los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno resultantes, y
- combinar opcionalmente los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno para producir una composición de anticuerpos.

Composiciones farmacéuticas

[0144] Otro aspecto de la presente descripción consiste en composiciones farmacéuticas que comprenden como ingredientes activos (p. ej., como los únicos ingredientes activos) un agente que se une específicamente a TGF- β humano (p. ej., un anticuerpo anti-TGF- β o un antígeno fragmento de unión del mismo) y un agente que se une específicamente a CD38 humano (p. ej., un anticuerpo anti-CD38 o un fragmento de unión a antígeno del mismo). El agente que se une específicamente a TGF- β y el agente que se une específicamente a CD38 se pueden formular conjuntamente, p. ej., mezclar y proporcionar en una sola composición. La presente descripción también proporciona (1) una composición farmacéutica que comprende un agente que se une específicamente a TGF- β humano, y (2) una composición farmacéutica que comprende un agente que se une específicamente a CD38 humano, en donde las composiciones farmacéuticas se utilizan en la misma terapia combinada.

[0145] En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas descritas en la presente memoria, cuando se administran en una terapia combinada de la presente descripción, están destinados a tratamiento (p. ej., mejora y/o prevención) de un trastorno, enfermedad o afección que mejora, o ralentiza su progresión, mediante la modulación de la actividad o expresión de TGF- β y CD38. En ciertas realizaciones, las composiciones farmacéuticas están destinadas al tratamiento (p. ej., mejora y/o prevención) del cáncer. En realizaciones concretas, el cáncer es mieloma múltiple.

[0146] En algunas realizaciones, la composición farmacéutica de la presente descripción comprende un anticuerpo anti-TGF- β descrito en la presente memoria que tiene menos de 1% de semianticuerpos. La formación de semianticuerpos se puede determinar a través de análisis de pureza de las preparaciones de anticuerpos monoclonales mediante el uso de, por ejemplo, electroforesis capilar con SDS bajo condiciones no reductoras o

análisis SDS-PAGE no reductor, seguido de densitometría, o RP-HPLC (Angal et al., Mol Immunol 30(1):105-8 (1993); Bloom et al., Protein Science 6:407-415 (1997); Schuurman et al., 38(1):1-8 (2001) y Solanos et al., Anal Chem 78:6583-94 (2006)).

[0147] Generalmente, las composiciones farmacéuticas descritas en la presente memoria son adecuadas para administrarse como una formulación asociada con uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables, por ejemplo, como se describe a continuación.

[0148] El término "excipiente" o "portador" se utiliza en la presente memoria para describir cualquier ingrediente distinto del compuesto o compuestos de la presente descripción. La elección de los excipientes dependerá en gran medida de factores tales como el modo concreto de administración, el efecto del excipiente sobre la solubilidad y la estabilidad y la naturaleza de la forma de dosificación. "Excipiente farmacéuticamente aceptable" incluye cualquiera y todos los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardadores de la absorción, y similares que son fisiológicamente compatibles. Algunos ejemplos de excipientes farmacéuticamente aceptables son agua, solución salina, solución salina tamponada con fosfato, dextrosa, glicerol, etanol y similares, así como combinaciones de los mismos. En algunos casos, se incluirán en la composición agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol o cloruro de sodio. Los ejemplos adicionales de sustancias farmacéuticamente aceptables son agentes humectantes o cantidades menores de sustancias auxiliares tales como agentes humectantes o emulsionantes, conservantes o tampones, que mejoran la vida útil o la eficacia del anticuerpo. En algunas realizaciones, una composición farmacéutica de la presente descripción puede comprender hialuronidasa (p. ej., hialuronidasa humana recombinante). En ciertas realizaciones, la composición farmacéutica que comprende hialuronidasa puede ser para administración subcutánea.

[0149] Una composición farmacéutica de la presente descripción se puede preparar, envasar o proporcionar a granel, como una única dosis unitaria, o como una pluralidad de dosis unitarias individuales. Como se emplea en la presente memoria, una "dosis unitaria" es una cantidad discreta de la composición farmacéutica que comprende una cantidad predeterminada del ingrediente o ingredientes activos. La cantidad de cada

ingrediente activo es generalmente igual a la dosificación del ingrediente activo que se administraría a un sujeto o una fracción conveniente de tal dosificación tal como, por ejemplo, la mitad o un tercio de tal dosificación.

[0150] Las composiciones farmacéuticas de la presente descripción son típicamente adecuadas para la administración parenteral. Como se emplea en la presente memoria, la "administración parenteral" de una composición farmacéutica incluye cualquier vía de administración caracterizada por la ruptura física de un tejido de un sujeto y la administración de la composición farmacéutica a través de la ruptura en el tejido, lo que generalmente da como resultado la administración directa al torrente sanguíneo, al músculo o a un órgano interno. Por tanto, la administración parenteral incluye, pero no se limita a, la administración de una composición farmacéutica mediante la inyección de la composición, mediante la aplicación de la composición a través de una incisión quirúrgica, mediante la aplicación de la composición a través de una herida no quirúrgica que penetra en el tejido, y similares. En particular, se contempla que la administración parenteral incluya, pero no se limite a, inyecciones o infusiones subcutáneas, intraperitoneales, intramusculares, intraesternales, intravenosas, intraarteriales, intratecales, intraventriculares, intrauretrales, intracraneales, intratumorales e intrasinoviales; y técnicas de infusión de diálisis renal. También se contempla la perfusión regional. Las realizaciones preferidas pueden incluir las vías intravenosa y subcutánea.

[0151] Las formulaciones de una composición farmacéutica adecuada para la administración parenteral comprenden típicamente el ingrediente o ingredientes activos combinados con un portador farmacéuticamente aceptable, tal como agua estéril o solución salina isotónica estéril. Tales formulaciones se pueden preparar, envasar o proporcionar en una forma adecuada para la administración en bolo o para la administración continua. Las formulaciones inyectables se pueden preparar, envasar o proporcionar en forma de dosificación unitaria, tal como en ampollas o en recipientes multidosis que contienen un conservante. Las formulaciones para administración parenteral incluyen, pero no se limitan a, suspensiones, soluciones, emulsiones en vehículos oleosos o acuosos, pastas y similares. Tales formulaciones pueden comprender adicionalmente uno o más ingredientes adicionales que incluyen, pero no se limitan a, agentes de suspensión, estabilizantes o dispersantes. En una realización de

una formulación para administración parenteral, el ingrediente o ingredientes activos se proporciona en forma seca (es decir, polvo o granular) para su reconstitución con un vehículo adecuado (p. ej., agua estéril libre de pirógenos) antes de la administración parenteral de la composición reconstituida. Las formulaciones parenterales también incluyen soluciones acuosas que pueden contener excipientes tales como sales, carbohidratos y agentes tamponadores (p. ej., con un pH de 3 a 9), pero, para algunas aplicaciones, se pueden formular más adecuadamente como una solución no acuosa estéril o como una forma seca (p. ej., liofilizada) para ser utilizada junto con un vehículo adecuado tal como agua estéril libre de pirógenos. Las formas de administración parenteral ilustrativas incluyen soluciones o suspensiones en soluciones acuosas estériles, por ejemplo, soluciones acuosas de propilenglicol o dextrosa. Tales formas de dosificación pueden tamponarse adecuadamente, si se desea. Otras formulaciones administrables por vía parenteral que son útiles incluyen las que comprenden el ingrediente o ingredientes activos en forma microcristalina, o en una preparación liposomal. Las formulaciones para administración parenteral se pueden formular para que sean de liberación inmediata y/o modificada. Las formulaciones de liberación modificada incluyen liberación retardada, sostenida, pulsada, controlada, dirigida, y programada.

Artículos de fabricación y kits

[0152] La presente descripción también proporciona artículos de fabricación que comprenden un agente que se une específicamente a TGF- β humano y un agente que se une específicamente a CD38 humano. En algunas realizaciones, un artículo de fabricación de la presente descripción comprende un anticuerpo anti-TGF- β o un fragmento de unión a antígeno del mismo descrito en la presente memoria, y un anticuerpo anti-CD38 o un fragmento de unión a antígeno del mismo descrito en la presente memoria. En ciertas realizaciones, el artículo de fabricación comprende Ab1 y Ab2. La presente descripción proporciona adicionalmente métodos para fabricar dichos artículos.

[0153] La presente descripción también proporciona kits que comprenden un agente que se une específicamente a TGF- β humano y un agente que se une específicamente a

CD38 humano, así como instrucciones para el uso de los agentes combinados. En algunas realizaciones, un kit de la presente descripción comprende un anticuerpo anti-TGF- β o un fragmento de unión a antígeno del mismo descrito en la presente memoria, y un anticuerpo anti-CD38 o un fragmento de unión a antígeno del mismo descrito en la presente memoria. En ciertas realizaciones, el kit comprende Ab1 y Ab2.

[0154] A menos que se defina lo contrario en la presente memoria, los términos científicos y técnicos utilizados en relación con la presente descripción tendrán los significados que entienden comúnmente los expertos en la técnica. A continuación, se describen métodos y materiales ilustrativos, aunque también se pueden utilizar métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en la presente memoria en la práctica o ensayo de la presente descripción. En caso de conflicto, prevalecerá la presente memoria descriptiva, incluidas las definiciones.

[0155] En general, la nomenclatura utilizada en relación con, y las técnicas de, cultivo de células y tejidos, biología molecular, inmunología, microbiología, genética, química analítica, química orgánica sintética, química medicinal y farmacéutica, y química de proteínas y ácidos nucleicos y la hibridación descritas en la presente memoria son aquellas bien conocidas y comúnmente utilizadas en la técnica. Las reacciones enzimáticas y las técnicas de purificación se realizan de acuerdo con las especificaciones del fabricante, como se logra comúnmente en la técnica o como se describe en la presente memoria.

[0156] Adicionalmente, a menos que sea requerido de otra manera por el contexto, los términos singulares incluirán pluralidades y los términos en plural incluirán el singular. A lo largo de esta memoria descriptiva y realizaciones, se entenderá que las palabras "tienen" y "comprenden", o variaciones tales como "tiene", "que tiene", "comprende" o "que comprende", implican la inclusión de un número entero o un grupo de números enteros establecidos, pero no la exclusión de ningún otro número entero o grupo de números enteros.

[0157] Todas las publicaciones y otras referencias mencionadas en la presente memoria se incorporan como referencia en su totalidad. Aunque en la presente memoria se citan varios documentos, estas citas no constituyen una admisión de que alguno de estos

documentos forme parte del conocimiento general común en la técnica.

EJEMPLOS

[0158] Con el fin de entender mejor la presente descripción, se exponen los siguientes ejemplos. Estos ejemplos son meramente ilustrativos y no se debe interpretar que limitan el alcance de la presente descripción de ninguna manera.

Ejemplo 1: El TGF- β es liberado por líneas celulares de mieloma múltiple y linfoma

[0159] Se cultivaron células JJN3, NCI-H929, RPMI8226, LP1, MOLP8, SUDHL-4, DAUDI, OCI-LY19, y SUDHL8 en RPMI 1640 (Núm. de cat. de Invitrogen 22400-089) con un suplemento de suero de ternero fetal al 10% (Núm. de cat. de Invitrogen 10082-147).

[0160] Para cuantificar el TGF- β liberado por líneas celulares de MM y linfoma, se sembraron en placa 1 x 10⁶ células de cada línea celular en una placa tratada para el cultivo de tejidos de 96 pocillos en un volumen de 100 μ L de RPMI con un suplemento de suero de ternero fetal al 10%. Las células se incubaron a 37°C durante 1 día, 2 días o 3 días en una incubadora humidificada a 37°C que contenía 5% de CO₂. Después de la centrifugación durante 5 minutos a 250 g, se recogieron 40 μ L de sobrenadante de cada pocillo y se determinó el nivel de TGF- β humano total utilizando un kit de ensayo de TGF- β 1 humano multimatriz de 96 pocillos MSD (Núm. de cat. de Meso Scale K151IUC-1) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Brevemente, las muestras se activaron mediante tratamiento con ácido y posteriormente se neutralizaron seguido de incubación con el anticuerpo de captura. A continuación, se detectó el anticuerpo utilizando un método basado en ELISA y los resultados se leyeron en un lector de imágenes MSD SECTOR.

[0161] Se detectó el TGF- β total en los sobrenadantes de todas las líneas celulares de MM y linfoma a niveles de más de 500 pg/mL, y se observó acumulación en el tiempo en la mayoría de líneas celulares, en particular en células JJN3, RPMI8226 y MOLP8 (Fig. 1).

Ejemplo 2: El TGF-beta reduce la actividad citolítica de las células NK humanas y disminuye la ADCC mediada por Ab2

[0162] Se suspendieron células NK92V (NK92-05 CD16 V/V; Conkwest) en fase de crecimiento log. en medio de crecimiento (Middle Myelocult H5100 (Núm. de cat. de StemCell. Technologies 05150) con un suplemento de 100 unidades/mL de interleucina-2 humana (Núm. de cat. de R&D 202-IL-010/CF)) y se sembraron en bandejas de 10 cm a una densidad de $0,8 \times 10^5$ células por mL. Las células se trataron con TGF-beta humano recombinante a una concentración final de 10 ng/mL durante la noche, 24 horas, 48 horas o 72 horas a 37°C.

[0163] Las células MOLP8 se cultivaron en medio RPMI 1640 (Núm. de cat. de Invitrogen 22400-089) con un suplemento de 20% de suero de ternero fetal (Núm. de cat. de Invitrogen 10082-147).

[0164] Se sembraron células diana MOLP8 y células efectoras NK92V marcadas con calceína (AM) (Núm. de cat. de Invitrogen C3100MP) en placas de 96 pocillos a una densidad de 4×10^4 células diana (MOLP8) y $1,2 \times 10^5$ efectoras células (NK92V) por pocillo. Las células se trataron con Ab2 a una concentración de 0, 0,001, 0,1, o 1 µg/mL, o con un control de IgG₁ (datos no mostrados), durante 1 hora a 37°C. La fluorescencia de calceína liberada de las células diana lisadas en los sobrenadantes se midió utilizando un lector de placas multimodo (Envision). La intensidad de la señal de fluorescencia era directamente proporcional al número de células diana lisadas.

[0165] La incubación de células NK humanas con TGF-β durante un máximo de 72 h dio como resultado una disminución dependiente del tiempo de la ADCC mediada por Ab2 (E:T = 3:1). Se bien las células NK incubadas con TGF-β durante 24 h conservaban su actividad lítica, la lisis por las células NK incubadas durante 48 o 72 h se redujo en aproximadamente 25-60% (Fig. 2).

Ejemplo 3: La neutralización de TGF-β restaura la actividad citolítica de NK y la ADCC mediada por Ab2

[0166] Se suspendieron células NK92V (NK92-05 CD16 V/V; Conkwest) en fase de crecimiento log. en medio de crecimiento (Middle Myelocult H5100 (Núm. de cat. de StemCell. Technologies 05150) con un suplemento de 100 unidades/mL interleucina-2

humana (Núm. de cat. de R&D 202-IL-010/CF)) y se sembraron en bandejas de 10 cm a una densidad de $0,8 \times 10^5$ células por mL. Las células se trataron con TGF-beta humano recombinante a una concentración final de 10 ng/mL, y con 1D11 (el sustituto murino de Ab1) o un anticuerpo de control de isotipo (13C4; datos no mostrados) a una concentración final de 50 µg/mL, durante 90 horas a 37°C.

[0167] Se sembraron células diana MOLP8 y células efectoras NK92V marcadas con calceína (AM) (Núm. de cat. de Invitrogen C3100MP) en placas de 96 pocillos a una densidad de 4×10^4 células diana (MOLP8) y $1,2 \times 10^5$ células efectoras (NK92V) por pocillo. Las células fueron tratadas con Ab2 a 0, 0,001, 0,01, 0,1, o 1 µg/mL, o con un control de IgG₁ a 1 µg/mL, durante 1 hora a 37°C. La fluorescencia de calceína liberada de las células diana lisadas en los sobrenadantes se midió utilizando un lector de placas multimodo (Envision). La intensidad de la señal de fluorescencia era directamente proporcional al número de células diana lisadas.

[0168] La disminución de la actividad lítica de las células NK y de la ADCC mediada por Ab2 inducida por TGF-β se restauró completamente cuando el TGF-β fue neutralizado por Ab1, pero no por un anticuerpo de control (Fig. 3).

Ejemplo 4: El TGF-β inhibe la ADCC mediada por Ab2 de células NCI-H929 y Ab1 bloquea esta inhibición

[0169] Se aislaron células NK humanas por selección negativa de donantes humanos normales (Stem Cell Technologies). Las células NK enriquecidas se cultivaron en presencia de IL-2 (a 100 UI/mL), TGF-β (como se indica) y/o Ab1 o control de isotipo durante 3 días a 37°C en una incubadora humidificada. En este punto, las células NCI-H929 en crecimiento exponencial se marcaron con calceína (AM) y se incubaron con Ab2 a 1 µg/mL durante 30 minutos. A continuación, las células efectoras NK se resuspendieron y se combinaron con las células diana NCI-H929 marcadas durante 1 hora en una incubadora humidificada. La ADCC mediada por Ab2 se cuantificó midiendo los niveles de células diana marcadas con calceína (AM) utilizando un espectrofotómetro. Se ha demostrado que dosis crecientes de TGF-β inhiben la capacidad de las células NK humanas normales para destruir células NCI-H929 pretratadas con Ab2, teniendo 0,1 ng/mL poco efecto sobre la lisis celular mediada por células NK, pero bloqueando 1 y 10

ng/mL la ADCC en aproximadamente un 50% (Fig. 4). A continuación, se evaluó la ADCC a 2 concentraciones diferentes de Ab1 (100 y 200 µg/mL). Ni el Ab de control de isotipo (IgG₄) ni Ab1 tuvieron ningún efecto sobre la ADCC cuando se añadieron a los cultivos en ausencia de TGF-β (Fig. 5 y 6). Se demostró que Ab1 bloquea la capacidad del TGF-β para inhibir la ADCC (Fig. 5 y 6, $p < 0,005$ frente a la ausencia de tratamiento), mientras que el control de IgG₄ no pudo bloquear los efectos del TGF-β en el mismo grado. Por lo tanto, este dato demuestra que Ab1 es capaz de aliviar los efectos inmunosupresores de TGF-β sobre la ADCC mediada por células NK.

Ejemplo 5: La neutralización del TGF-β endógeno por Ab1 restaura la actividad citolítica primaria de NK y la ADCC mediada por Ab2

[0170] Se cultivaron células JJN3, K562 y RPMI8226 en RPMI 1640 (Núm. de cat. de Invitrogen 22400-089) con un suplemento de suero de ternero fetal al 10% (Núm. de cat. de Invitrogen 10082-147).

[0171] Las células NK humanas primarias se aislaron mediante selección negativa a partir de PBMC humanas normales de acuerdo con los protocolos sugeridos por el fabricante (Núm. de cat. de StemCell Technologies 17955RF). Las células NK aisladas se cultivaron solas o se cultivaron conjuntamente en presencia de células JJN3 en 6 placas Transwell en presencia o ausencia de 100 mg/mL de Ab1 o un control de isotipo durante 90 horas a 37°C en una incubadora con 5% de CO₂.

[0172] Después de 90 horas de cultivo conjunto, las células NK de las placas Transwell se incubaron con células K562 marcadas con calceína (AM) (Núm. de cat. de Invitrogen C3100MP) durante 2 horas a 37°C para la detección de la función citolítica de las células NK función, o con RPMI 8226 marcadas con calceína (AM) en presencia de 0,001 o 0,1 mg/mL de Ab2, o 0,1 mg/mL de mutante de Ab2 de control (Ab*) durante 1 hora a 37°C para la detección de la ADCC mediada por Ab2. Se midió la fluorescencia de la calceína liberada de las células diana lisadas en los sobrenadantes utilizando un lector de placas multimodo (Envision). La intensidad de la señal fluorescente fue directamente proporcional al número de células diana lisadas.

[0173] El aumento de la actividad citolítica de las células NK primarias (Fig. 7) y el aumento de la ADCC mediada por Ab2 (Fig. 8) demuestran que la presencia de Ab1

neutralizó el TGF- β endógeno liberado por células JJN3 durante el cultivo conjunto de 90 horas.

Ejemplo 6: Tratamiento combinado con Ab1 y Ab2 en pacientes con mieloma múltiple

[0174] El efecto del tratamiento combinado con anticuerpos Ab1 y Ab2 puede evaluarse adicionalmente en pacientes humanos, tales como pacientes con mieloma múltiple resistente a uno o más de otros tratamientos dirigidos a CD38 (p. ej., isatuximab o daratumumab). Los pacientes con mieloma múltiple pueden, por ejemplo, no responder al otro tratamiento dirigido a CD38 o haber progresado durante el tratamiento con el otro tratamiento dirigido a CD38.

[0175] Se espera que la combinación de Ab1 y Ab2 trate el mieloma múltiple con más eficacia que Ab2 solo. Por ejemplo, el tratamiento combinado puede dar como resultado mejora de los síntomas, reducción de la destrucción ósea, aumento de la formación de hueso que dé como resultado remodelación ósea y/o curación de hueso, progresión o recurrencia retardada del cáncer, o mayor esperanza de vida en comparación con el tratamiento con Ab2 solo.

[0176] Ab1 y Ab2 se pueden administrar a dosificaciones (p. ej., 1-20 mg/kg), utilizando programas de dosificación (p. ej., cada una, dos, tres o cuatro semanas), y durante los períodos de tiempo necesarios para lograr un resultado deseado, p. ej., según lo determine un médico. En algunas realizaciones, se pueden administrar uno o ambos anticuerpos mediante infusión intravenosa. En ciertas realizaciones, el Ab2 se administra a 10 mg/kg o 16 mg/kg de peso corporal real cada una, dos, tres o cuatro semanas, o cualquiera de sus combinaciones durante el curso del tratamiento.