

TRADUZIONE DEL TESTO DEL BREVETTO EUROPEO N. 2658870

DAL TITOLO:

“ANTICORPI ANTI-CD38 CONIUGATI”

*** **

Descrizione

STATO DELL'ARTE

[0002] La CD38, nota anche come ADP-ribosil ciclastasi idrolasi, è una glicoproteina transmembrana di tipo II con un dominio extracellulare C-terminale lungo e un dominio citoplasmatico N-terminale corto. La CD38 è un membro di un gruppo di enzimi legati alla membrana o solubili correlati, comprendente CD157 e *Aplysia* ADPR ciclastasi. Questa famiglia di enzimi ha la capacità unica di convertire NAD in ADP-ribosil ciclastasi o nicotinammide adenina dinucleotide fosfato.

[0003] Inoltre, la CD38 è stata segnalata come coinvolta nella mobilitazione di Ca^{2+} e nella trasduzione del segnale attraverso la fosforilazione della tirosina di numerose molecole di segnalazione, tra cui fosfolipasi $C\gamma$, ZAP-70, syk e c-cbl. Sulla base di queste osservazioni, la CD38 è stata proposta come un'importante molecola di segnalazione nella maturazione e nell'attivazione delle cellule linfoidi durante il loro normale sviluppo.

[0004] Tra le cellule ematopoietiche, diversi effetti funzionali sono stati ascritti alla segnalazione mediata da CD38, compresa la proliferazione dei linfociti, il rilascio di citochine, la regolazione dello

sviluppo e della sopravvivenza di linfociti B e cellule mieloidi e l'induzione della maturazione delle cellule dendritiche.

[0005] Tuttavia, il ruolo esatto della CD38 nella trasduzione del segnale e nell'ematopoiesi rimane poco chiaro, dal momento che la maggior parte degli studi di trasduzione del segnale hanno utilizzato linee cellulari che ectopicamente sovraesprimono CD38 e anticorpi monoclonali anti-CD38, che sono ligandi non fisiologici.

[0006] Il presunto ligando naturale della CD38 è CD31 (PECAM-1; Molecola di adesione di cellule endoteliali e piastrine-1). La CD31 è un membro da 130 kD della superfamiglia delle immunoglobuline che è espresso sulla superficie di piastrine circolanti, neutrofili, monociti e linfociti B naïve. Funzionalmente, si pensa che la CD31 agisca come una molecola di adesione. È stato suggerito che l'interazione di CD38 e CD31 possa agire nel promuovere la sopravvivenza delle cellule leucemiche.

[0007] I modelli animali carenti di una singola molecola sono stati in molti casi strumenti fondamentali per comprendere il ruolo biologico della molecola nell'animale. L'ipotesi sottostante è che se la proteina esercita una funzione non ridondante, la sua completa mancanza comporterà la perdita completa di tale funzione.

[0008] Sono stati generati topi knockout per CD38. Questi animali mostrano una perdita quasi completa dell'attività associata alla NADasi tessutale. Tuttavia, questi animali sono vitali, portando alla conclusione che la CD38 e le sue attività non sono necessarie per la

vita. Questi topi presentano tuttavia un difetto nella loro immunità innata e una ridotta risposta umorale dipendente dalle cellule T.

[0009] In contrasto con i risultati nei topi, negli esseri umani vi sono forti prove circostanziali che l'assenza della CD38 sia incompatibile con la vita. L'analisi di oltre 5.000 campioni di sangue da neonati non è riuscita a identificare un singolo soggetto CD38⁻, suggerendo che, a differenza dei topi, la CD38 sia necessaria per la sopravvivenza. Pertanto, non è chiaro se le osservazioni fatte sui topi riguardanti la funzione della CD38 possano essere estrapolate nell'uomo.

[0010] La CD38 è sovraregolata in molte neoplasie ematopoietiche e in linee cellulari derivate da varie neoplasie ematopoietiche tra cui linfoma non Hodgkin (NHL), linfoma di Burkitt (BL), mieloma multiplo (MM), leucemia linfatica cronica a cellule B (B-CLL), leucemia linfatica acuta a cellule B e T (ALL), linfoma a cellule T (TCL), leucemia mieloide acuta (LMA), leucemia a cellule capellute (HCL), linfoma di Hodgkin (HL) e leucemia mieloide cronica (CML). D'altra parte, la maggior parte delle cellule staminali pluripotenti primitive del sistema ematopoietico sono CD38⁻ (Figura 1).

WO 2006/125640 fornisce un metodo per l'uso di regioni e anticorpi leganti antigene ricombinanti e frammenti funzionali contenenti tali regioni leganti antigene specifiche per CD38.

[0011] Nonostante i recenti progressi nella scoperta e nello sviluppo di agenti antitumorali, molte forme di cancro che coinvolgono i

tumori che esprimono CD38 hanno ancora una prognosi sfavorevole. Pertanto, vi è la necessità di metodi migliorati per il trattamento di tali forme di cancro.

BREVE SOMMARIO DELLA PRESENTE INVENZIONE

La presente invenzione fornisce un anticorpo isolato che si lega specificamente alla CD38 umana (SEQ ID NO: 1) e alla CD38 di cynomolgus (SEQ ID NO: 2) comprendente:

a) una regione variabile della catena pesante comprendente SEQ ID NO:9;

b) una regione variabile della catena leggera comprendente SEQ ID NO:10; e

c) una porzione di farmaco attaccata covalentemente.

La presente invenzione fornisce inoltre una cellula ospite comprendente un acido nucleico isolato codificante la catena pesante di un anticorpo della presente invenzione e un acido nucleico isolato codificante la catena leggera di un anticorpo della presente invenzione.

La presente invenzione fornisce inoltre un metodo per produrre l'anticorpo della presente invenzione comprendente la coltivazione di una cellula ospite della presente invenzione in condizioni in cui viene prodotto detto anticorpo.

La presente invenzione fornisce inoltre un anticorpo isolato secondo la presente invenzione per l'uso in un metodo di trattamento del cancro.

BREVE SOMMARIO DELLA DIVULGAZIONE

[0013] Qui sono forniti reagenti e metodi per il legame a CD38 e metodi per trattare malattie associate a CD38 e rilevare la CD38 usando agenti leganti CD38 specifici, compresi anticorpi specifici per la CD38. Per scopi terapeutici, gli anticorpi dell'invenzione includono una porzione di farmaco coniugato, come descritto di seguito. Per scopi diagnostici, gli anticorpi dell'invenzione possono facoltativamente includere un marcatore rilevabile. Di conseguenza, in alcune forme di realizzazione, è descritto un anticorpo isolato specifico per CD38 umana (SEQ ID NO:1) e CD38 di cynomolgus (SEQ ID NO:2). Questo anticorpo è composto da una regione variabile della catena pesante e una regione variabile della catena leggera, in cui la regione variabile della catena pesante è composta da tre regioni determinanti complementarietà (CDR), HCDR1, HCDR2 e HCDR3, e in cui la regione variabile della catena leggera è anch'essa composta da tre CDR, LCDR1, LCDR2 e LCDR3. Le sequenze delle CDR sono rappresentate da: HCDR1 (SEQ ID NO:3), HCDR2 (SEQ ID NO:4), HCDR3 (SEQ ID NO:5), LCDR1 (SEQ ID NO:6), LCDR2 (SEQ ID NO:7) e LCDR3 (SEQ ID NO:8). In alcune forme di realizzazione, l'anticorpo comprende inoltre una porzione di farmaco coniugato.

[0014] In altre forme di realizzazione, l'anticorpo isolato è composto da una regione variabile della catena pesante, in cui la sequenza della regione variabile della catena pesante è compresa da SEQ ID NO:9. In altre forme di realizzazione, l'anticorpo isolato è composto da una regione variabile della catena leggera, in cui la

sequenza della regione variabile della catena leggera è compresa da SEQ ID NO:10. In alcune forme di realizzazione, l'anticorpo comprende inoltre una porzione di farmaco coniugato.

[0015] In alcune forme di realizzazione, l'anticorpo isolato è composto da una regione variabile della catena pesante, in cui la sequenza della regione variabile della catena pesante è compresa da SEQ ID NO:9. In altre forme di realizzazione, l'anticorpo isolato è composto da una regione variabile della catena leggera, in cui la sequenza della regione variabile della catena leggera è compresa da SEQ ID NO:10. Questa combinazione della regione variabile della catena pesante e della regione variabile della catena leggera viene definita come Ab79. In alcune forme di realizzazione, l'anticorpo comprende inoltre una porzione di farmaco coniugato.

[0016] In alcune forme di realizzazione, l'anticorpo isolato è composto da una catena pesante e da una catena leggera, in cui la sequenza della catena pesante è inclusa da SEQ ID NO:11 e la catena leggera è inclusa da SEQ ID NO:12. In alcune forme di realizzazione, l'anticorpo comprende inoltre una porzione di farmaco coniugato.

[0017] In alcune forme di realizzazione, l'anticorpo isolato include un dominio Fc. In altre forme di realizzazione, il dominio Fc è un dominio Fc umano. In ancora altre forme di realizzazione, il dominio Fc è un dominio Fc variante.

[0018] In alcune forme di realizzazione, è fornito un acido nucleico isolato codificante la catena pesante di SEQ ID NO:11. In altre

forme di realizzazione, è fornito un acido nucleico isolato codificante la catena leggera di SEQ ID NO:12.

[0019] In alcune forme di realizzazione, viene fornita una cellula ospite, la cellula ospite contenente l'acido nucleico isolato codificante la catena pesante di SEQ ID NO:11 e l'acido nucleico isolato codificante la catena leggera di SEQ ID NO:12.

[0020] In alcune forme di realizzazione, è fornito un metodo per produrre l'anticorpo della divulgazione. Il metodo comprende la coltura di una cellula ospite contenente l'acido nucleico isolato codificante la catena pesante di SEQ ID NO:11 e l'acido nucleico isolato codificante la catena leggera di SEQ ID NO:12 in condizioni in cui uno o più acidi nucleici isolati sono espressi e viene prodotto un anticorpo. La porzione di farmaco è quindi attaccata all'anticorpo usando sostanze chimiche standard nell'arte.

[0021] In alcune forme di realizzazione, è descritto un anticorpo isolato specifico per CD38 umana (SEQ ID NO:1) e CD38 di cynomolgus (SEQ ID NO:2). Questo anticorpo è composto da sei CDR, in cui ogni CDR di questo anticorpo può differire da SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7 e SEQ ID NO:8 di 0, 1 o 2 sostituzioni amminoacidiche. In alcune forme di realizzazione, l'anticorpo comprende inoltre una porzione di farmaco coniugato.

[0022] In altre forme di realizzazione, è descritto un anticorpo isolato specifico per CD38 umana (SEQ ID NO:1) e CD38 di cynomolgus (SEQ ID NO:2). Questo anticorpo è composto da una

regione variabile della catena pesante e una regione variabile della catena leggera, in cui la regione variabile della catena pesante è composta da tre regioni determinanti complementarità (CDR), HCDR1, HCDR2 e HCDR3, e in cui la regione variabile della catena leggera è anch'essa composta da tre CDR, LCDR1, LCDR2 e LCDR3. Le sequenze delle CDR sono rappresentate da: HCDR1 (SEQ ID NO:13), HCDR2 (SEQ ID NO:14), HCDR3 (SEQ ID NO:15), LCDR1 (SEQ ID NO:16), LCDR2 (SEQ ID NO:17) e LCDR3 (SEQ ID NO:18). In alcune forme di realizzazione, l'anticorpo comprende inoltre una porzione di farmaco coniugato.

[0023] In altre forme di realizzazione, l'anticorpo isolato è composto da una regione variabile della catena pesante, in cui la sequenza della regione variabile della catena pesante è compresa da SEQ ID NO:19. In altre forme di realizzazione, l'anticorpo isolato è composto da una regione variabile della catena leggera, in cui la sequenza della regione variabile della catena leggera è compresa da SEQ ID NO:20. In alcune forme di realizzazione, l'anticorpo comprende inoltre una porzione di farmaco coniugato.

[0024] In alcune forme di realizzazione, l'anticorpo isolato è composto da una regione variabile della catena pesante, in cui la sequenza della regione variabile della catena pesante è compresa da SEQ ID NO:19. In altre forme di realizzazione, l'anticorpo isolato è composto da una regione variabile della catena leggera, in cui la sequenza della regione variabile della catena leggera è compresa da

SEQ ID NO:20. Questa combinazione della regione variabile della catena pesante e della regione variabile della catena leggera viene definita come Ab19. In alcune forme di realizzazione, l'anticorpo comprende inoltre una porzione di farmaco coniugato. In alcune forme di realizzazione, l'anticorpo comprende inoltre un marcatore rilevabile per facilitare la diagnosi.

[0025] In alcune forme di realizzazione, l'anticorpo isolato è composto da una catena pesante e da una catena leggera, in cui la sequenza della catena pesante è inclusa da SEQ ID NO:21 e la catena leggera è inclusa da SEQ ID NO:22. In alcune forme di realizzazione, l'anticorpo comprende inoltre una porzione di farmaco coniugato.

[0026] In alcune forme di realizzazione, è fornito un acido nucleico isolato codificante la catena pesante di SEQ ID NO:21. In altre forme di realizzazione, è fornito un acido nucleico isolato codificante la catena leggera di SEQ ID NO:22.

[0027] In alcune forme di realizzazione, viene fornita una cellula ospite, la cellula ospite contenente l'acido nucleico isolato codificante la catena pesante di SEQ ID NO:21 e l'acido nucleico isolato codificante la catena leggera di SEQ ID NO:22.

[0028] In alcune forme di realizzazione, è fornito un metodo per produrre l'anticorpo come qui descritto. Il metodo comprende la coltura di una cellula ospite contenente l'acido nucleico isolato codificante la catena pesante di SEQ ID NO:21 e l'acido nucleico isolato codificante la catena leggera di SEQ ID NO:22 in condizioni in cui uno o più acidi

nucleici isolati sono espressi e viene prodotto un anticorpo. La porzione di farmaco è quindi attaccata all'anticorpo usando sostanze chimiche standard nell'arte.

[0029] In altre forme di realizzazione, è descritto un anticorpo isolato specifico per CD38 umana (SEQ ID NO:1) e CD38 di cynomolgus (SEQ ID NO:2). Questo anticorpo è composto da sei CDR, in cui ogni CDR di questo anticorpo può differire da SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:17 e SEQ ID NO:18 di 0, 1 o 2 sostituzioni amminoacidiche.

[0030] In alcune forme di realizzazione, è fornito un anticorpo anti-CD38 isolato che si lega specificamente a CD38 umana (SEQ ID NO:1) e CD38 di cynomolgus (SEQ ID NO:2), in cui l'anticorpo si lega alla CD38 umana con un KD di circa 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} o più e si lega alla CD38 di cynomolgus con un KD di circa 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} o più.

[0031] In alcune forme di realizzazione, sono forniti anticorpi che competono con Ab79 e/o Ab19 per legarsi a CD38 umana e/o CD38 di cynomolgus.

[0032] Queste e altre forme di realizzazione, caratteristiche e potenziali vantaggi risulteranno chiari con riferimento alla seguente descrizione e ai disegni.

BREVE DESCRIZIONE DEI DISEGNI

[0033] La FIG. 1 illustra il profilo di espressione della CD38 sulle cellule della linea linfoide. L'espressione di CD38 è stata identificata su cellule pro-B (CD34⁺CD19⁺CD20⁻), cellule B attivate

(CD19⁺CD20⁺), plasmacellule (CD138⁺CD19⁻CD20⁻), cellule T CD4⁺ e CD8⁺ attivate, cellule NKT (CD3⁺CD56⁺) e cellule NK (CD56⁺CD16⁺). Inoltre, l'espressione della CD38 si trova su cellule progenitrici linfoidi (CD34⁺CD45RA⁺CD10⁺CD19⁻) ma non sulle cellule staminali linfoidi.

[0034] La FIG. 2 mostra le sequenze delle catene pesante e leggera di Ab79 e Ab19.

[0035] La FIG. 3 illustra le sequenze della CD38 umana e di cynomolgus.

[0036] La FIG. 4 mostra il rilevamento del legame di Ab79 a tessuti normali mediante immunofluorescenza. (A) colon umano normale colorato con Ab79 (B) colon umano normale colorato con anticorpo di controllo irrilevante Palivizumab (C) microscopia ottica di colon umano normale controcolorato con ematossilina (D) prostata umana normale colorata con Ab79 (E) prostata umana normale colorata con anticorpo di controllo irrilevante Palivizumab (F) microscopia ottica di prostata umana normale controcolorata con ematossilina (G) linfonodo umano normale colorato con Ab79 (I) microscopia ottica di linfonodo umano normale controcolorato con ematossilina.

[0037] La FIG. 5 mostra il rilevamento del legame di Ab79 a campioni di midollo osseo da pazienti con mieloma multiplo (MM). (A) Colorazione immunofluorescente di Ab79 di midollo osseo normale (B) Colorazione immunofluorescente di Ab79 rappresentativa di midollo osseo da un paziente MM. L'epitopo riconosciuto da Ab79 era fortemente espresso in circa il 50% o più delle cellule in tutti i campioni

di mieloma multiplo esaminati, mentre nel midollo osseo normale era circa il 10% o meno delle cellule.

[0038] La FIG. 6 illustra il legame di Ab79 a varie linee cellulari come rilevato mediante immunofluorescenza. (A) MOLP-8 (B) Daudi (C) RPMI (D) MCF7.

[0039] La FIG. 7 mostra l'analisi FACS dell'espressione di Ab79 su cellule derivate dal midollo osseo di un paziente con mieloma multiplo (A) e PBMC da un paziente con leucemia linfocitica cronica (con gating su cellule CD5⁺) (B).

[0040] La FIG. 8 illustra uno studio di risposta alle dosi *in vivo* che confronta Ab19, Ab79 e anticorpi di riferimento BM1 e BM2.

[0041] La FIG. 9 illustra la visualizzazione della disseminazione del linfoma in topi trattati con Ab19, Ab79 e anticorpi di riferimento BM1 e BM2.

[0042] La FIG. 10 illustra il legame di Ab79 alla CD38 in base a dati di cristallografia a raggi X.

[0043] La FIG. 11 illustra diverse forme di realizzazione di ADC. Come descritto qui, le porzioni linker possono cambiare, inclusa la composizione degli amminoacidi, i linker autoimmolativi, ecc.

[0044] La FIG. 12 mostra gli epitopi di CD38 umana che si legano a ciascuno degli anticorpi, Benchmark 1 e 2, Ab19 e Ab79.

[0045] La FIG. 13 illustra la struttura di una combinazione linker/farmaco preferita. Come sarà compreso dagli esperti del ramo, l'anticorpo TSF79 (ad esempio, Ab79) qui illustrato può essere

commutato sull'anticorpo AB19. Similmente, come discusso qui, può essere usato qualsiasi numero di combinazioni di farmaco/linker aggiuntive, in aggiunta al derivato di auristatina E qui mostrato.

[0046] La FIG.14 mostra la variazione percentuale nel numero di cellule nelle scimmie cynomolgus 24 ore dopo la somministrazione.

[0047] La FIG. 15 mostra il recupero dell'esaurimento dopo una singola dose di Ab79.

DESCRIZIONE DETTAGLIATA DELL'INVENZIONE

Panoramica

[0048] Il dominio extracellulare della CD38 ha dimostrato di possedere attività enzimatica bifunzionale, avente sia attività ADP-ribosilciclastasi sia attività ADP-ribosilidrolasi. Pertanto, la CD38 può catalizzare la conversione di NAD⁺ in cADPR (ciclastasi) e può ulteriormente idrolizzarla in ADP-ribosio (idrolasi). Il cADPR è coinvolto nella mobilizzazione del calcio dai depositi intracellulari, che è una seconda attività messaggera importante per la proliferazione cellulare, la differenziazione e l'apoptosi.

[0049] L'espressione aumentata della CD38 è stata documentata in una varietà di malattie di origine ematopoietica ed è stata descritta come marcatore prognostico negativo nella leucemia linfoblastica cronica. Tali malattie includono ma non sono limitate a mieloma multiplo (Jackson *et al.* (1988)), leucemia linfoblastica cronica (Moribito *et al.* (2001), Jelinek *et al.* (2001), Chevalier *et al.* (2002), Dürig *et al.* (2002)), leucemia linfatica cronica B, leucemia linfoblastica

acuta (Keyhani *et al.* (2000)) compresa leucemia linfatica acuta B, macroglobulinemia di Waldenstrom, amiloidosi sistemica primaria, linfoma a cellule del mantello, leucemia pro-linfocitaria/mielocitica, leucemia mieloide acuta (Keyhani *et al.* (1993)), leucemia mieloide cronica (Marinov *et al.* (1993)), linfoma follicolare, leucemia a cellule NK e leucemia plasmacellulare. Come tale, la CD38 fornisce un obiettivo utile nel trattamento delle malattie del sistema ematopoietico.

[0050] Diversi anticorpi anti-CD38 sono inclusi in studi clinici per il trattamento dei tumori associati alla CD38 (di seguito indicati come "Benchmark 1 e Benchmark 2"). Di conseguenza, sono utili anticorpi anti-CD38 con effetto terapeutico e/o applicazioni diagnostiche. La divulgazione fornisce due diversi gruppi di CDR anti-CD38 che si legano a diversi epitopi della CD38 e che legano entrambe le forme umana e di cynomolgus della CD38 e gli anticorpi che contengono queste CDR. Gli anticorpi comprendono inoltre coniugati farmaco/linker come qui discusso.

[0051] Un vantaggio, non riscontrabile in alcuni anticorpi anti-CD38 nei test clinici, è la capacità di legarsi alla CD38 di cynomolgus, poiché questi primati vengono impiegati in test preclinici, e quindi ciò può portare a una valutazione precoce di dosaggio, tossicità, efficacia, ecc.

[0052] Proteine CD38

[0053] Di conseguenza, la presente invenzione fornisce anticorpi anti-CD38 isolati che legano in modo specifico la proteina

CD38 umana (e, come descritto di seguito, legano ulteriormente e preferibilmente specificamente la proteina CD38 dei primati). Come è noto nell'arte, le proteine CD38 si trovano in diverse specie. Di particolare utilità nella presente invenzione sono gli anticorpi che si legano sia alle proteine CD38 degli esseri umani sia a quelle dei primati, in particolare i primati utilizzati in test clinici, come la scimmia cynomolgus (*Macaca fascicularis*, Macaco mangia-granchi, a volte indicato come "cyno"). Con "CD38 umana" o "antigene CD38 umano" si intende la proteina di SEQ ID NO:1 o una frazione funzionale, come un epitopo, come qui definito. In generale, la CD38 possiede una coda intracitoplasmatica corta, un dominio transmembrana e un dominio extracellulare, in specifiche forme di realizzazione gli anticorpi dell'invenzione si legano alla parte extracellulare della proteina CD38. Per "CD38 di cynomolgus" qui si intende SEQ ID NO:2 che è identico al 92% alla CD38 umana.

[0054] Sinonimi di CD38 includono ADP ribosilciclastasi 1, cADPr idrolasi 1, Cd38-rsl, ADP-ribosil ciclastasi idrolasi 1, 1-19 e antigene NIM-R5.

[0055] Gli anticorpi Ab79 anti-CD38 dell'invenzione interagiscono con CD38 a diversi residui amminoacidici tra cui K121, F135, Q139, D141, M142, D202, V203, H205, Q236, E239, W241, S274, C275, K276, F284, C287, V288, K289, N290, P291, E292, D293. Come descritto qui, anche altri anticorpi che interagiscono con questi residui trovano impiego in applicazioni terapeutiche e diagnostiche.

[0056] In alcune forme di realizzazione, gli anticorpi anti-CD38 della presente invenzione facoltativamente (e in alcuni casi preferibilmente) non si legano ad altri membri della famiglia CD38 come CD157. Ad esempio, le forme di realizzazione preferite qui non si legano a CD157 umano di SEQ ID NO:23 (accesso Genbank NP_004325).

[0057] Anticorpi

[0058] La presente invenzione fornisce 8 anticorpi anti-CD3, anticorpi generalmente terapeutici e/o diagnostici come descritto qui. Gli anticorpi che trovano impiego nella presente invenzione possono assumere diversi formati come qui descritto, inclusi anticorpi tradizionali così come derivatidi anticorpi, frammenti e mimetici, descritti di seguito. Essenzialmente, la divulgazione fornisce strutture di anticorpi che contengono un insieme di 6 CDR come qui definite (compresi piccoli numeri di variazioni amminoacidiche come descritto di seguito).

[0059] Le unità strutturali anticorpali tradizionali comprendono tipicamente un tetramero. Ogni tetramero è tipicamente composto da due coppie identiche di catene polipeptidiche, ciascuna coppia avente una catena "leggera" (di solito con un peso molecolare di circa 25 kDa) e una catena "pesante" (di solito con un peso molecolare di circa 50-70 kDa). Le catene leggere umane sono classificate come catene leggere kappa e lambda. Le catene pesanti sono classificate come mu, delta, gamma, alfa o epsilon e definiscono l'isotipo dell'anticorpo come IgM, IgD, IgG, IgA e IgE, rispettivamente. IgG ha svariate sottoclassi,

incluse, ma non limitate a, IgG1, IgG2, IgG3, e IgG4. IgM ha sottoclassi, incluse, ma non limitate a, IgM1 e IgM2. Pertanto, "isotipo" come qui usato è inteso come una qualsiasi delle sottoclassi di immunoglobuline definite dalle caratteristiche chimiche e antigeniche delle loro regioni costanti. Gli isotipi di immunoglobulina umana noti sono IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2, IgM1, IgM2, IgD e IgE. Dovrebbe essere compreso che gli anticorpi terapeutici possono anche comprendere ibridi di isotopi e/o sottoclassi.

[0060] La porzione ammino-terminale di ciascuna catena include una regione variabile di circa 100-110 o più amminoacidi, principalmente responsabile del riconoscimento dell'antigene. Nella regione variabile, vengono raccolti tre anelli per ciascuno dei domini V della catena pesante e della catena leggera per formare un sito legante antigene. Ciascuno degli anelli è indicato come una regione determinante complementarietà (in seguito denominata "CDR"), in cui la variazione nella sequenza amminoacidica è più significativa. "Variabile" si riferisce al fatto che alcuni segmenti della regione variabile differiscono ampiamente in sequenza tra gli anticorpi. La variabilità all'interno della regione variabile non è equamente distribuita. Invece, le regioni V sono costituite da stiramenti relativamente invariati denominati regioni cornice (FR) di 15-30 amminoacidi separati da regioni più corte di variabilità estrema denominate "regioni ipervariabili" che sono lunghe ciascuna 9-15 amminoacidi o più.

[0061] Ciascuna VH e VL è composta da tre regioni ipervariabili ("regioni determinanti complementarità", "CDR") e quattro FR, disposte da ammino-terminale a carbossi-terminale nel seguente ordine: FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4.

[0062] La regione ipervariabile generalmente comprende residui amminoacidici da circa 24-34 residui amminoacidici (LCDR1; "L" indica catena leggera), 50-56 (LCDR2) e 89-97 (LCDR3) nella regione variabile della catena leggera e circa 31-35B (HCDR1; "H" indica catena pesante), 50-65 (HCDR2) e 95-102 (HCDR3) nella regione variabile della catena pesante; Kabat et al., SEQUENCES OF PROTEINS OF IMMUNOLOGICAL INTEREST, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991) e/o quei residui che formano un anello ipervariabile (ad esempio residui 26-32 (LCDR1), 50-52 (LCDR2) e 91-96 (LCDR3) nella regione variabile della catena leggera e 26-32 (HCDR1), 53-55 (HCDR2) e 96-101 (HCDR3) nella regione variabile della catena pesante: Chothia e Lesk (1987) J. Mol. Biol. 196:901-917. CDR specifiche dell'invenzione sono descritte di seguito.

[0063] In tutta la presente descrizione, il sistema di numerazione di Kabat è generalmente usato quando si fa riferimento a un residuo nel dominio variabile (approssimativamente, i residui 1-107 della regione variabile della catena leggera e i residui 1-113 della regione variabile della catena pesante) (ad esempio, Kabat *et al.*, supra (1991)), con il sistema numerico UE utilizzato per la regione Fc.

[0064] Le CDR contribuiscono alla formazione del sito legante antigene o, più specificamente, legante epitopo degli anticorpi. "Epitopo" si riferisce a un determinante che interagisce con un sito legante antigene specifico nella regione variabile di una molecola anticorpale nota come paratopo. Gli epitopi sono raggruppamenti di molecole come amminoacidi o catene laterali dello zucchero e solitamente hanno caratteristiche strutturali specifiche, oltre a caratteristiche specifiche di carica. Un singolo antigene può avere più di un epitopo. Ad esempio, come mostrato qui, i due diversi anticorpi qui citati come "Ab19" e "Ab79" si legano a epitopi diversi sulla molecola CD38.

[0065] L'epitopo può comprendere residui amminoacidici direttamente coinvolti nel legame (chiamato anche componente immunodominante dell'epitopo) e altri residui amminoacidici, che non sono direttamente coinvolti nel legame, come i residui amminoacidici effettivamente bloccati dal peptide legante specificamente antigene; in altre parole, il residuo amminoacidico si trova all'interno dell'impronta del peptide legante specificamente antigene.

[0066] Gli epitopi possono essere conformazionali o lineari. Un epitopo conformazionale è prodotto da amminoacidi giustapposti spazialmente da diversi segmenti della catena polipeptidica lineare. Un epitopo lineare è prodotto da residui amminoacidici adiacenti in una catena polipeptidica. Gli epitopi conformazionali e non conformazionali

possono essere distinti in quanto il legame con il primo ma non con l'ultimo viene perso in presenza di solventi denaturanti.

[0067] Un epitopo include tipicamente almeno 3, e più solitamente almeno 5 o 8-10 amminoacidi in una conformazione spaziale unica. Gli anticorpi che riconoscono lo stesso epitopo possono essere verificati in un semplice saggio immunologico che mostri la capacità di un anticorpo di bloccare il legame di un altro anticorpo a un antigene bersaglio, ad esempio "binning", come descritto negli studi di cristallografia a raggi X di esempio mostrati negli Esempi, che hanno identificato i residui amminoacidici che si legano agli anticorpi sia della divulgazione (compresi Ab19 e Ab79) sia dell'arte precedente (Benchmark 1 e Benchmark 2), come mostrato nella Figura 12.

[0068] Nella presente invenzione, Ab79 come descritto negli Esempi interagisce con diversi residui amminoacidici di CD38 comprendenti K121, F135, Q139, D141, M142, E239, W241, S274, C275, K276, F284, V288, K289, N290, P291, E292 e D293. Va notato che questi residui sono identici nell'essere umano e nelle scimmie cynomolgus, con l'eccezione che S274 è in realtà F274 nelle cynomolgus. Questi residui possono rappresentare l'epitopo immunodominante e/o residui all'interno dell'impronta del peptide legante specificamente antigene.

[0069] Come descritto qui, Ab19 si lega ad un epitopo diverso, inclusi G91, E103, E1034, D105, Q107, M110, K111, T114, Q115, T148, V192, R194, R195, F196, A199, H228, N229, Q231, E233 e

K234. Va notato che questi residui sono identici nell'essere umano e nelle scimmie cynomolgus, con l'eccezione che M110 è V110 nelle cynomolgus e A199 è T199 nelle cynomolgus.

[0070] Pertanto, in alcune forme di realizzazione, gli anticorpi che competono con AB79 e Ab19 legandosi a uno di questi epitopi possono essere usati per trattare malattie autoimmuni. Va notato che Ab79 e BM1 hanno una certa sovrapposizione; quindi gli anticorpi che competono con Ab79 e non sono BM1 trovano impiego nella presente invenzione.

[0071] Pertanto, la presente divulgazione fornisce anticorpi che si legano a CD38 umana e di cynomolgus e interagiscono con almeno l'80%, il 90%, il 95% o il 98% di questi residui. Detto in modo diverso, l'area superficiale della zona di interazione non è altro che l'area di questi residui.

[0072] La porzione carbossi-terminale di ciascuna catena definisce una regione costante principalmente responsabile della funzione effettrice. Kabat *et al.* hanno raccolto numerose sequenze primarie delle regioni variabili di catene pesanti e catene leggere. Sulla base del grado di conservazione delle sequenze, hanno classificato le singole sequenze primarie nella CDR e nella cornice e ne hanno fatto un elenco (si veda SEQUENCES OF IMMUNOLOGICAL INTEREST, 5a edizione, pubblicazione NIH, No. 91-3242, E.A. Kabat et al.).

[0073] Nella sottoclasse IgG delle immunoglobuline, ci sono diversi domini immunoglobulinici nella catena pesante. Per "dominio

immunoglobulinico (Ig)" si intende qui una regione di una immunoglobulina avente una struttura terziaria distinta. Di interesse per la presente invenzione sono i domini della catena pesante, compresi i domini pesanti costanti (CH) e i domini cerniera. Nel contesto degli anticorpi IgG, gli isotipi IgG hanno ciascuno tre regioni CH. Di conseguenza, i domini "CH" nel contesto di IgG sono i seguenti: "CH1" si riferisce alle posizioni 118-220 secondo l'indice UE come in Kabat. "CH2" si riferisce alle posizioni 237-340 secondo l'indice UE come in Kabat e "CH3" si riferisce alle posizioni 341-447 secondo l'indice UE come in Kabat.

[0074] Un altro tipo di dominio Ig della catena pesante è la regione cerniera. Per "cerniera" o "di cerniera" o "regione cerniera anticorpale" o "regione cerniera immunoglobulinica" qui si intende il polipeptide flessibile comprendente gli amminoacidi tra il primo e il secondo dominio costante di un anticorpo. Strutturalmente, il dominio IgG CH1 termina alla posizione UE 220 e il dominio IgG CH2 inizia dalla posizione UE residua 237. Pertanto, per IgG la cerniera anticorpale è qui definita come includente le posizioni da 221 (D221 in IgG1) a 236 (G236 in IgG1), in cui la numerazione è secondo l'indice UE come in Kabat. In alcune forme di realizzazione, ad esempio nel contesto di una regione Fc, è inclusa la cerniera inferiore; la "cerniera inferiore" generalmente si riferisce alle posizioni 226 o 230.

[0075] Di particolare interesse per la presente invenzione sono le regioni Fc. Per "Fc" o "regione Fc" o "dominio Fc" come qui usato si

intende il polipeptide comprendente la regione costante di un anticorpo escludente il primo dominio immunoglobulinico della regione costante e, in alcuni casi, parte della cerniera. Pertanto Fc si riferisce agli ultimi due domini immunoglobulinici della regione costante di IgA, IgD e IgG, gli ultimi tre domini immunoglobulinici della regione costante di IgE e IgM e l'N-terminale cerniera flessibile a questi domini. Per IgA e IgM, Fc può includere la catena J. Per IgG, il dominio Fc comprende domini immunoglobulinici C γ 2 e C γ 3 (C γ 2 e C γ 3) e la regione cerniera inferiore tra C γ 1 (C γ 1) e C γ 2 (C γ 2). Sebbene i confini della regione Fc possano variare, la regione Fc della catena pesante di IgG umana viene solitamente definita come includente i residui C226 o P230 al suo carbossil-terminale, in cui la numerazione è secondo l'indice UE come in Kabat. In alcune forme di realizzazione, come più ampiamente descritto in seguito, sono apportate modifiche amminoacidiche alla regione Fc, ad esempio per alterare il legame a uno o più recettori Fc γ R o al recettore FcRn.

[0076] In alcune forme di realizzazione, gli anticorpi sono a lunghezza intera. Con "anticorpo a lunghezza intera" si intende qui la struttura che costituisce la forma biologica naturale di un anticorpo, comprese le regioni variabili e costanti, incluse una o più modifiche come qui delineato.

[0077] In alternativa, gli anticorpi possono essere una varietà di strutture, inclusi, ma non limitati a, frammenti anticorpali, anticorpi monoclonali, anticorpi bispecifici, minibody, anticorpi di dominio,

anticorpi sintetici (talvolta indicati come "mimetici di anticorpi"), anticorpi chimerici, anticorpi umanizzati, fusioni di anticorpi (a volte indicati come "coniugati di anticorpi") e frammenti di ciascuno, rispettivamente.

[0078] In una forma di realizzazione, l'anticorpo è un frammento di anticorpo. Specifici frammenti di anticorpi includono, ma non sono limitati a, (i) il frammento Fab costituito da domini VL, VH, CL e CH1, (ii) il frammento Fd costituito dai domini VH e CH1, (iii) il frammento Fv costituito dai domini VL e VH di un singolo anticorpo; (iv) il frammento dAb (Ward et al., 1989, Nature 341:544-546) che consiste di un singolo dominio variabile, (v) regioni CDR isolate, (vi) frammenti F(ab')₂, un frammento bivalente comprendente due frammenti Fab legati (vii) molecole Fv a catena singola (scFv), in cui un dominio VH e un dominio VL sono collegati da un linker peptidico che consente ai due domini di associarsi per formare un sito legante antigene (Bird et al., 1988, Science 242:423-426, Huston et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85:5879-5883), (viii) Fv a catena singola bispecifica (WO 03/11161) e (ix) "diabody" o "triabody", frammenti multivalenti o multispecifici costruiti mediante fusione genica (Tomlinson et al., 2000, Methods Enzymol. 326:461-479; WO94/13804; Holliger et al., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90:6444-6448).

[0079] Anticorpi chimerici e umanizzati

[0080] In alcune forme di realizzazione, l'anticorpo può essere una miscela di diverse specie, ad esempio un anticorpo chimerico e/o un anticorpo umanizzato. Cioè, nella presente invenzione, gli insiemi di

CDR possono essere usati con regioni costanti diverse da quelle specificatamente descritte dalla sequenza qui presente.

[0081] In generale, sia gli "anticorpi chimerici" sia gli "anticorpi umanizzati" si riferiscono ad anticorpi che combinano regioni di più di una specie. Ad esempio, gli "anticorpi chimerici" comprendono tradizionalmente una o più regioni variabili da un topo (o ratto, in alcuni casi) e una o più regioni costanti da un essere umano. Gli "anticorpi umanizzati" in genere si riferiscono ad anticorpi non umani le cui regioni cornice del dominio variabile sono state scambiate con sequenze presenti negli anticorpi umani. Generalmente, in un anticorpo umanizzato, l'intero anticorpo, ad eccezione delle CDR, è codificato da un polinucleotide di origine umana o è identico a tale anticorpo tranne che nelle sue CDR. Le CDR, alcune o tutte le quali sono codificate da acidi nucleici originati da un organismo non umano, sono innestate nella cornice beta-foglietto di una regione variabile di anticorpi umani per creare un anticorpo, la cui specificità è determinata dalle CDR innestate. La creazione di tali anticorpi è descritta in, ad esempio, WO 92/11018, Jones, 1986, Nature 321:522-525, Verhoeyen et al., 1988, Science 239:1534-1536. La "retromutazione" di residui cornice di accettori selezionati ai residui corrispondenti del donatore è spesso necessaria per riacquisire l'affinità persa nel costrutto innestato iniziale (US 5530101; US 5585089; US 5693761; US 5693762; US 6180370; US 5859205; US 5821337; US 6054297 e US 6407213). L'anticorpo umanizzato comprenderà in modo ottimale anche almeno una porzione

di una regione costante di immunoglobulina, tipicamente quella di un'immunoglobulina umana, e quindi comprenderà tipicamente una regione Fc umana. Gli anticorpi umanizzati possono anche essere generati usando topi con un sistema immunitario geneticamente modificato. Roque et al., 2004, *Biotechnol. Prog.* 20:639-654. Diverse tecniche e metodi per umanizzare e rimodellare anticorpi non umani sono ben noti nell'arte (si veda Tsurushita & Vasquez, 2004, *Humanization of Monoclonal Antibodies, Molecular Biology of B Cells*, 533-545, Elsevier Science (USA) e i riferimenti sono citati nel presente documento). I metodi di umanizzazione includono ma non si limitano ai metodi descritti in Jones et al., 1986, *Nature* 321:522-525; Riechmann et al., 1988, *Nature* 332:323-329; Verhoeyen et al., 1988, *Science*, 239:1534-1536; Queen et al., 1989, *Proc Natl Acad Sci, USA* 86:10029-33; He et al., 1998, *J. Immunol.* 160: 1029-1035; Carter et al., 1992, *Proc Natl Acad Sci USA* 89:4285-9, Presta et al., 1997, *Cancer Res.* 57(20):4593-9; Gorman et al., 1991, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:4181-4185; O'Connor et al., 1998, *Protein Eng* 11:321-8. L'umanizzazione o altri metodi per ridurre l'immunogenicità di regioni variabili di anticorpi non umani possono includere metodi di resurfacing, come descritto ad esempio in Roguska et al., 1994, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:969-973. In una forma di realizzazione, l'anticorpo progenitore è stato maturato per l'affinità, come è noto nell'arte. Metodi basati sulla struttura possono essere impiegati per l'umanizzazione e la maturazione dell'affinità, ad esempio come descritto in USSN

11/004,590. Metodi basati sulla selezione possono essere impiegati per umanizzare e/o maturare per affinità regioni variabili anticorpali, inclusi ma non limitati ai metodi descritti in Wu et al., 1999, J. Mol. Biol. 294:151-162; Baca et al., 1997, J. Biol. Chem. 272(16):10678-10684; Rosok et al., 1996, J. Biol. Chem. 271(37): 22611-22618; Rader et al., 1998, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 8910-8915; Krauss et al., 2003, Protein Engineering 16(10):753-759. Altri metodi di umanizzazione possono comportare l'innesto solo di parti delle CDR, inclusi ma non limitati ai metodi descritti in USSN 09/810,510; Tan et al., 2002, J. Immunol. 169:1119-1125; De Pascalis et al., 2002, J. Immunol. 169:3076-3084.

[0082] In una forma di realizzazione, gli anticorpi dell'invenzione possono essere anticorpi multispecifici e in particolare anticorpi bispecifici, talvolta definiti anche "diabody". Questi sono anticorpi che si legano a due (o più) diversi antigeni o epitopi diversi sullo stesso antigene. I diabody possono essere prodotti in vari modi noti nell'arte (Holliger e Winter, 1993, Current Opinion Biotechnol. 4: 446-449), ad esempio preparati chimicamente o da ibridomi ibridi.

[0083] In una forma di realizzazione, l'anticorpo è un minibody. I minibody sono proteine minimizzate simili agli anticorpi che comprendono una scFv unita a un dominio CH3. Hu et al., 1996, Cancer Res. 56:3055-3061. In alcuni casi, la scFv può essere unita alla regione Fc e può includere parte o l'intera regione cerniera.

[0084] Gli anticorpi della presente invenzione sono generalmente isolati o ricombinanti. "Isolato", quando usato per descrivere i vari polipeptidi qui divulgati, indica un polipeptide che è stato identificato e separato e/o recuperato da una cellula o coltura cellulare da cui è stato espresso. Normalmente, un polipeptide isolato verrà preparato mediante almeno una fase di purificazione. Un "anticorpo isolato" indica un anticorpo che è sostanzialmente privo di altri anticorpi aventi differenti specificità antigeniche. Ad esempio, un anticorpo isolato che si lega specificamente alla CD38 è sostanzialmente privo di anticorpi che si legano in modo specifico ad antigeni diversi dalla CD38.

[0085] Un anticorpo isolato che si lega specificamente ad un epitopo, una isoforma o variante di CD38 umana o di cynomolgus può tuttavia avere una cross-reattività ad altri antigeni correlati, ad esempio da altre specie, come gli omologhi della specie CD38. Inoltre un anticorpo isolato può essere sostanzialmente privo di altro materiale cellulare e/o di sostanze chimiche.

[0086] Gli anticorpi monoclonali isolati, aventi diverse specificità, possono essere combinati in una composizione ben definita. Pertanto, ad esempio, Ab79 e Ab19 possono essere combinati in una singola formulazione, se lo si desidera.

[0087] Gli anticorpi anti-CD38 della presente invenzione si legano in modo specifico ai ligandi CD38 (ad esempio le proteine CD38 umane e di cynomolgus di SEQ ID NO:1 e 2. "Legame specifico" o "si

lega specificamente a" o "specifico per" un particolare antigene o un epitopo indica un legame misurabilmente diverso da una interazione non specifica. Il legame specifico può essere misurato, ad esempio, determinando il legame di una molecola rispetto al legame di una molecola di controllo, che generalmente è una molecola di struttura simile che non ha attività legante. Ad esempio, il legame specifico può essere determinato dalla competizione con una molecola di controllo simile al bersaglio.

[0088] Un legame specifico per un particolare antigene o un epitopo può essere esibito, ad esempio, da un anticorpo avente un KD per un antigene o un epitopo di almeno circa 10^{-4} M, almeno circa 10^{-5} M, almeno circa 10^{-6} M, almeno circa 10^{-7} M, almeno circa 10^{-8} M, almeno circa 10^{-9} M, in alternativa almeno circa 10^{-10} M, almeno circa 10^{-11} M, almeno circa 10^{-12} M, o superiore, dove KD si riferisce a una velocità di dissociazione di una particolare interazione antigene-anticorpo. Tipicamente, un anticorpo che si lega specificamente un antigene avrà un KD che è maggiore di 20, 50, 100, 500, 1000, 5.000, 10.000 volte o più di una molecola di controllo relativa all'antigene o all'epitopo.

[0089] Inoltre, un legame specifico per un particolare antigene o un epitopo può essere esibito, ad esempio, da un anticorpo avente un KA o Ka per un antigene o un epitopo maggiore di almeno 20, 50, 100, 500, 1000, 5.000, 10.000 volte o più l'epitopo relativo a un controllo, in

cui KA o Ka si riferiscono a una velocità di associazione di una particolare interazione antigene-anticorpo.

[0090] Modifiche anticorpali

[0091] La presente invenzione fornisce inoltre anticorpi varianti. Cioè, vi sono alcune modifiche che possono essere apportate agli anticorpi dell'invenzione, incluse, ma non limitate a, modificazioni amminoacidiche nella regione Fc, varianti di glicosilazione, modifiche covalenti di altri tipi, ecc.

[0092] Per "variante" qui si intende una sequenza polipeptidica che differisce da quella di un polipeptide progenitore in virtù di almeno una modifica amminoacidica. Le modifiche amminoacidiche possono includere sostituzioni, inserzioni e delezioni, e il primo tipo viene preferito in molti casi.

[0093] In generale, le varianti possono includere qualsiasi numero di modifiche, purché sia ancora presente la funzione della proteina, come qui descritto. Cioè, nel caso di varianti amminoacidiche generate con le CDR di Ab79 o Ab19, ad esempio, l'anticorpo dovrebbe ancora legarsi specificamente sia alla CD38 umana sia a quella di cynomolgus. Allo stesso modo, se le varianti amminoacidiche sono generate con la regione Fc, ad esempio, gli anticorpi varianti dovrebbero mantenere le necessarie funzioni di legame al recettore per la particolare applicazione o indicazione dell'anticorpo.

[0094] Tuttavia, in generale sono utilizzate 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 sostituzioni amminoacidiche, poiché spesso l'obiettivo è quello di

alterare la funzione con un numero minimo di modifiche. In alcuni casi, ci sono da 1 a 5 modifiche; 1-2, 1-3 e 1-4 modifiche trovano spesso impiego molte forme di realizzazione.

[0095] Va notato che il numero di modifiche amminoacidiche può essere all'interno di domini funzionali: ad esempio, può essere desiderabile avere 1-5 modifiche nella regione Fc di proteine di tipo selvatico o ingegnerizzate, nonché ad esempio da 1 a 5 modifiche nella regione Fv. Una sequenza polipeptidica variante preferibilmente possiede almeno circa l'80%, l'85%, il 90%, il 95% o fino al 98 o 99% di identità con le sequenze progenitrici (ad esempio, le regioni variabili, le regioni costanti e/o le sequenze delle catene pesante e leggera per Ab79 e/o Ab19). Va notato che, a seconda delle dimensioni della sequenza, l'identità percentuale dipenderà dal numero di amminoacidi.

[0096] Per "sostituzione amminoacidica" o "sostituzione" qui si intende la sostituzione di un amminoacido in una particolare posizione in una sequenza polipeptidica progenitrice con un altro amminoacido. Ad esempio, la sostituzione S100A si riferisce a un polipeptide variante in cui la serina in posizione 100 viene sostituita con alanina. Con "inserzione amminoacidica" o "inserzione" come qui usato si intende l'aggiunta di un amminoacido in una particolare posizione in una sequenza polipeptidica progenitrice. Per "delezione amminoacidica" o "delezione" come qui usata si intende la rimozione di un amminoacido in una particolare posizione in una sequenza polipeptidica progenitrice.

[0097] Per "polipeptide progenitore", "proteina progenitrice", "polipeptide precursore" o "proteina precursore" come qui usato si intende un polipeptide non modificato che viene successivamente modificato per generare una variante. In generale, i polipeptidi progenitori qui sono Ab79 e Ab19. Il polipeptide progenitore può riferirsi al polipeptide stesso, a composizioni che comprendono il polipeptide progenitore o alla sequenza amminoacidica che lo codifica. Di conseguenza, con "polipeptide Fc progenitore" come qui usato si intende un polipeptide Fc che viene modificato per generare una variante, e per "anticorpo progenitore" come qui usato si intende un anticorpo che viene modificato per generare un anticorpo variante.

[0098] Per "tipo selvatico" o "WT" o "nativo" qui si intende una sequenza amminoacidica o una sequenza nucleotidica che si trova in natura, comprese le variazioni alleliche. Una proteina WT, polipeptide, anticorpo, immunoglobulina, IgG, ecc. ha una sequenza amminoacidica o una sequenza nucleotidica che non è stata intenzionalmente modificata.

[0099] Per "regione Fc variante" si intende qui una sequenza Fc che differisce da quella di una sequenza Fc di tipo selvatico in virtù di almeno una modifica amminoacidica. La variante Fc può riferirsi al polipeptide Fc stesso, a composizioni comprendenti il polipeptide variante Fc o alla sequenza amminoacidica.

[00100] In alcune forme di realizzazione qui descritte solo per riferimento, una o più modifiche amminoacidiche sono apportate in una

o più CDR dell'anticorpo (Ab79 o Ab19). In generale, solo 1 o 2 o 3 amminoacidi sono sostituiti in una singola CDR e generalmente non più di 4, 5, 6, 7, 8 9 o 10 modifiche vengono apportate all'interno di un insieme di CDR. Tuttavia, dovrebbe essere compreso che qualsiasi combinazione di nessuna sostituzione, 1, 2 o 3 sostituzioni in qualsiasi CDR può essere indipendentemente e facoltativamente combinata con qualsiasi altra sostituzione.

[00101] In alcuni casi, le modifiche amminoacidiche nelle CDR sono indicate come "maturazione dell'affinità". Un anticorpo "ad affinità maturata" è uno avente una o più alterazioni in una o più CDR che si traduce in un miglioramento dell'affinità dell'anticorpo per l'antigene, rispetto a un anticorpo progenitore che non possiede tali una o più alterazioni. In alcuni casi, sebbene rari, può essere desiderabile ridurre l'affinità di un anticorpo al suo antigene, ma questo generalmente non è preferito.

[00102] La maturazione dell'affinità può essere eseguita per aumentare l'affinità di legame dell'anticorpo per l'antigene da almeno circa dal 10% al 50-100-150% o più, o da 1 a 5 volte rispetto all'anticorpo "progenitore". Anticorpi ad affinità maturata preferiti avranno affinità nanomolari o anche picomolari per l'antigene target. Gli anticorpi ad affinità maturata sono prodotti con procedure note. Si veda, ad esempio, Marks et al., 1992, *Biotechnology* 10:779-783 che descrive la maturazione dell'affinità mediante il mescolamento di domini della catena pesante variabile (VH) e della catena leggera variabile (VL). La

mutagenesi casuale di CDR e/o residui cornice è descritta in: Barbas, et al. 1994, Proc. Nat. Acad. Sci, USA 91:3809-3813; Shier et al., 1995, Gene 169:147-155; Yelton et al., 1995, J. Immunol. 155:1994-2004; Jackson et al., 1995, J. Immunol. 154(7):3310-9; e Hawkins et al., 1992, J. Mol. Biol. 226:889-896, ad esempio.

[00103] In alternativa, modifiche amminoacidiche possono essere apportate in una o più CDR di anticorpi che sono "silenti", ad esempio che non alterano in modo significativo l'affinità dell'anticorpo per l'antigene. Queste possono essere apportate per una serie di motivi, tra cui l'ottimizzazione dell'espressione (come può essere fatto per gli anticorpi codificanti gli acidi nucleici).

[00104] Pertanto, inclusi nella definizione delle CDR e degli anticorpi della divulgazione sono CDR e anticorpi varianti; ovvero, gli anticorpi dell'invenzione possono includere modifiche amminoacidiche in una o più CDR di Ab79 e Ab19. Inoltre, come indicato di seguito, le modifiche amminoacidiche possono anche essere apportate indipendentemente ed opzionalmente in qualsiasi regione al di fuori delle CDR, comprese le regioni cornice e le regioni costanti.

[00105] In alcune forme di realizzazione, sono descritti anticorpi varianti di Ab79 e Ab19 specifici per CD38 umana (SEQ ID NO:1) e CD38 di cynomolgus (SEQ ID NO:2). Questo anticorpo è composto da sei CDR, in cui ogni CDR di questo anticorpo può differire da SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7 e SEQ ID NO:8 di 0, 1 o 2 sostituzioni amminoacidiche. In alcune forme di

realizzazione, l'anticorpo anti-CD38 variante è composto da sei CDR, in cui ogni CDR di questo anticorpo può differire da SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:17 e SEQ ID NO:18 di 0, 1 o 2 sostituzioni amminoacidiche.

[00106] In alcune forme di realizzazione, gli anticorpi anti-CD38 dell'invenzione sono composti da un dominio Fc variante. Come è noto nell'arte, la regione Fc di un anticorpo interagisce con diversi recettori e ligandi Fc, impartendo una serie di importanti capacità funzionali chiamate funzioni effettrici. Questi recettori Fc includono, ma non sono limitati a, (negli esseri umani) FcγRI (CD64) incluse le isoforme FcγRIa, FcγRIb e FcγRIc; FcγRII (CD32), incluse le isoforme FcγRIIa (inclusi gli allotipi H131 e R131), FcγRIIb (inclusi FcγRIIb-1 e FcγRIIb-2) e FcγRIIc; e FcγRIII (CD16), incluse le isoforme FcγRIIIa (inclusi gli allotipi V158 e F158, correlati alla citotossicità delle cellule anticorpo-dipendente (ADCC)) e FcγRIIIb (inclusi gli allotipi FcγRIIIb-NA1 e FcγRIIIb-NA2), FcRn (il recettore neonatale), C1q (proteina complemento coinvolta nella citotossicità dipendente dal complemento (CDC)) e FcRn (il recettore neonatale coinvolto nell'emivita sierica). Modifiche adatte possono essere apportate in una o più posizioni come generalmente descritto, ad esempio, nella domanda di brevetto statunitense 11/841,654 e nei riferimenti ivi citati, US 2004/013210; US 2005/0054832; US 2006/0024298; US 2006/0121032; US 2006/0235208; US 2007/0148170; USSN 12/341,769; nel brevetto statunitense n. 6,737,056; nel brevetto statunitense n. 7,670,600; e nel

brevetto statunitense n. 6,086,875, e in particolare per sostituzioni amminoacidiche specifiche che aumentano il legame ai recettori Fc.

[00107] Oltre alle modifiche sopra descritte, è possibile apportare altre modifiche. Ad esempio, le molecole possono essere stabilizzate mediante l'incorporazione di ponti disolfuro che collegano i domini VH e VL (Reiter et al., 1996, Nature Biotech. 14:1239-1245). Inoltre, ci sono una varietà di modifiche covalenti di anticorpi che possono essere apportate come descritto di seguito.

[00108] Le modifiche covalenti di anticorpi sono incluse nell'ambito della presente invenzione e sono generalmente, ma non sempre, eseguite post-traduzione. Ad esempio, diversi tipi di modifiche covalenti dell'anticorpo sono introdotti nella molecola facendo reagire specifici residui amminoacidici dell'anticorpo con un agente derivatizzante organico che è in grado di reagire con catene laterali selezionate o con residui N- o C-terminali.

[00109] I residui di cisteinile più comunemente vengono fatti reagire con α -aloacetati (e corrispondenti ammine), come acido cloroacetico o cloroacetammide, per dare derivati carbossimetilici o carbossiammidometilici. I residui di cisteinile possono anche essere derivatizzati per reazione con bromotrifluoroacetone, acido α -bromo- β -(5-immidozoi)propionico, cloroacetilfosfato, N-alchilmaleimmidi, 3-nitro-2-piridil disolfuro, metil 2-piridil disolfuro, p-cloromercuribenzoato, 2-cloromercuri-4-nitrofenolo o cloro-7-nitrobenzo-2-ossa-1,3-diazolo e simili.

[00110] Inoltre, le modifiche alle cisteine sono particolarmente utili nelle applicazioni di coniugato anticorpo-farmaco (ADC), ulteriormente descritte di seguito. In alcune forme di realizzazione, la regione costante degli anticorpi può essere ingegnerizzata per contenere una o più cisteine che sono in particolare "tiolo reattive", in modo da consentire un posizionamento più specifico e controllato della porzione di farmaco. Si veda ad esempio il brevetto statunitense n. 7,521,541, incorporato per riferimento nella sua interezza nel presente documento.

[00111] I residui di istidile sono derivatizzati per reazione con dietilpirocarbonato a pH 5,5-7,0 poiché questo agente è relativamente specifico per la catena laterale di istidile. Anche il para-bromofenacil bromuro è utile; la reazione viene preferibilmente eseguita in cacodilato di sodio 0,1 M a pH 6,0.

[00112] I residui terminali di lisinile e amminici sono fatti reagire con anidridi di acido succinico o di altro acido carbossilico. La derivatizzazione con questi agenti ha l'effetto di invertire la carica dei residui di lisinile. Altri reagenti adatti per la derivatizzazione di residui contenenti alfa-ammino includono imidoesteri come metil picolinimidato; piridossalfosfato; piridossale; cloroboroidruro; acido trinitrobenzensolfonico; O-metilisourea; 2,4-pentandione; e reazione catalizzata da transaminasi con gliossilato.

[00113] I residui di arginile vengono modificati mediante reazione con uno o più reagenti convenzionali, tra cui fenilgliossale,

2,3-butanedione, 1,2-cicloesandione e ninidrina. La derivatizzazione di residui di arginina richiede che la reazione sia eseguita in condizioni alcaline per via del pKa elevato del gruppo funzionale guanidina. Inoltre, questi reagenti possono reagire con i gruppi di lisina nonché il gruppo epsilon-ammino di arginina.

[00114] Può essere effettuata una modifica specifica di residui di tirosile, con particolare interesse nell'introdurre marcatori spettrali in residui di tirosile mediante reazione con composti di diazonio aromatico o tetranitrometano. Più comunemente, N-acetilimidizolo e tetranitrometano sono usati per formare specie O-acetil tirosile e derivati 3-nitro, rispettivamente. I residui di tirosile sono iodurati usando 1251 o 1311 per preparare proteine marcate per l'uso in radioimmunosaggio; è adatto il metodo della cloramina T sopra descritto.

[00115] I gruppi laterali carbossilici (aspartile o glutammile) sono selettivamente modificati per reazione con carbodiimmidi ($R'-N=C=N-R'$), dove R e R' sono gruppi alchilici facoltativamente differenti, come 1-cicloesil-3-(2-morfolinil-4-etil) carbodiimmide o 1-etil-3-(4-azonia-4,4-dimetilpentil)carbodiimmide. Inoltre, residui di aspartile e glutammile sono convertiti in residui di asparaginile e glutaminile per reazione con ioni di ammonio.

[00116] La derivatizzazione con agenti bifunzionali è utile per la reticolazione di anticorpi a una matrice o superficie di supporto insolubile in acqua per l'uso in una varietà di metodi, in aggiunta ai

metodi descritti di seguito. Gli agenti di reticolazione comunemente utilizzati includono, ad esempio, 1,1-bis(diazoacetil)-2-feniletano, glutaraldeide, esteri di N-idrossisuccinimide, ad esempio esteri con acido 4-azidosalicilico, immediesteri omobifunzionali, compresi esteri disuccinimidilici come 3,3' -ditiobis (succinimidilpropionato) e maleimmidi bifunzionali come bis-N-maleimmido-1,8-ottano. Gli agenti di derivatizzazione come metil-3-[(p-azidofenil) ditio]propioimmidato producono intermedi fotoattivabili in grado di formare reticoli in presenza di luce. Alternativamente, matrici insolubili in acqua reattive quali carboidrati attivati da bromuro di cionomolgusogeno e i substrati reattivi descritti nei brevetti statunitensi n. Nos. 3,969,287; 3,691,016; 4,195,128; 4,247,642; 4,229,537; e 4,330,440, sono impiegate per l'immobilizzazione proteica.

[00117] Residui glutaminilici e asparaginilici sono frequentemente deamidati rispettivamente ai corrispondenti residui di glutammina e aspartile. In alternativa, questi residui sono deamidati in condizioni leggermente acide. Entrambe le forme di questi residui rientrano nell'ambito della presente invenzione.

[00118] Altre modifiche includono idrossilazione di prolina e lisina, fosforilazione di gruppi ossidrilici di residui serilici o treonilici, metilazione dei gruppi α -ammino di catene laterali di lisina, arginina e istidina (T. E. Creighton, *Proteins: Structure and Molecular Properties*, W. H. Freeman & Co., San Francisco, pp. 79-86 [1983]), acetilazione

dell'ammina N-terminale e amidazione di qualsiasi gruppo carbossilico C-terminale.

[00119] Inoltre, come sarà apprezzato dai tecnici del ramo, marcatori (inclusi quelli fluorescenti, enzimatici, magnetici, radioattivi, ecc.) possono essere tutti aggiunti agli anticorpi (così come alle altre composizioni dell'invenzione).

[00120] Glicosilazione

[00121] Un altro tipo di modifica covalente consiste nelle alterazioni nella glicosilazione. In un'altra forma di realizzazione, gli anticorpi qui divulgati possono essere modificati per includere una o più glicoforme ingegnerizzate. Con "glicoforme ingegnerizzate" come qui usato si intende una composizione di carboidrati che è attaccata covalentemente all'anticorpo, in cui detta composizione di carboidrati differisce chimicamente da quella di un anticorpo progenitore. Le glicoforme ingegnerizzate possono essere utili per una varietà di scopi, incluso ma non limitato all'aumento o alla riduzione della funzione effettrice. Una forma preferita di glicoforma ingegnerizzata è l'afucosilazione, che ha dimostrato di essere correlata ad un aumento della funzione ADCC, presumibilmente attraverso un legame più stretto con il recettore FcγRIIIa. In questo contesto, "afucosilazione" significa che la maggior parte degli anticorpi prodotti nelle cellule ospiti è sostanzialmente priva di fucosio, ad esempio il 90-95-98% degli anticorpi generati non ha fucosio apprezzabile come componente della porzione di carboidrati dell'anticorpo (generalmente attaccata a N297

nella regione Fc). Definiti funzionalmente, gli anticorpi afucosilati generalmente esibiscono un'affinità almeno del 50% o superiore al recettore FcγRIIIa.

[00122] Le glicoforme ingegnerizzate possono essere generate da molti metodi noti nell'arte (Umaña et al., 1999, Nat Biotechnol 17:176-180; Davies et al., 2001, Biotechnol Bioeng 74:288-294; Shields et al., 2002, J. Biol. Chem. 277:26733-26740; Shinkawa et al., 2003, J. Biol. Chem. 278:3466-3473; US 6,602,684; USSN 10/277,370; USSN 10/113,929; PCT WO 00/61739A1; PCT WO 01/29246A1; PCT WO 02/31140A1; PCT WO 02/30954A1; (tecnologia Potelligent® [Biowa, Inc., Princeton, NJ]; e tecnologia di ingegneria della glicosilazione GlycoMAb® [Glycart Biotechnology AG, Zurigo, Svizzera]). Molte di queste tecniche si basano sul controllo del livello di oligosaccaridi fucosilati e/o bispecifici che sono attaccati covalentemente alla regione Fc, ad esempio esprimendo un IgG in vari organismi o linee cellulari, ingegnerizzati o meno (ad esempio cellule Lec-13 CHO o cellule YB2/0 di ibridoma di ratto, regolando gli enzimi coinvolti nella via della glicosilazione (ad esempio FUT8 [α 1,6-fucosiltransferasi] e/o β 1-4-N-acetilglucosaminiltransferasi III [GnTIII]), o modificando uno o più carboidrati dopo che l'IgG è stato espresso. Ad esempio, la tecnologia "sugar engineered antibody" o "SEA" di Seattle Genetics funziona aggiungendo saccaridi modificati che inibiscono la fucosilazione durante la produzione; si veda ad esempio 20090317869. Una glicoforma ingegnerizzata si riferisce in genere ai diversi carboidrati o

oligosaccaridi; quindi un anticorpo può includere una glicoforma ingegnerizzata.

[00123] In alternativa, una glicoforma ingegnerizzata può fare riferimento alla variante IgG che comprende i diversi carboidrati o oligosaccaridi. Come è noto nell'arte, gli schemi di glicosilazione possono dipendere sia dalla sequenza della proteina (ad esempio, la presenza o l'assenza di particolari residui amminoacidici di glicosilazione, discussi di seguito), sia dalla cellula ospite o dall'organismo in cui viene prodotta la proteina. Sistemi di espressione particolari sono discussi di seguito.

[00124] La glicosilazione dei polipeptidi è tipicamente N-legata o O-legata. N-legata si riferisce all'attacco del gruppo funzionale carboidrato alla catena laterale di un residuo di asparagina. Le sequenze tri-peptidiche asparagina-X-serina e asparagina-X-treonina, dove X è qualsiasi amminoacido tranne la prolina, sono le sequenze di riconoscimento per l'attaccamento enzimatico della porzione di carboidrati alla catena laterale dell'asparagina. Pertanto, la presenza di una di queste sequenze tri-peptidiche in un polipeptide crea un potenziale sito di glicosilazione. La glicosilazione O-legata si riferisce all'attaccamento di uno degli zuccheri N-acetilgalattosamina, galattosio o xilosio, ad un acido idrossiammino, più comunemente serina o treonina, sebbene si possa anche usare 5-idrossiprolina o 5-idrossilisina.

[00125] L'aggiunta di siti di glicosilazione all'anticorpo viene convenientemente compiuta alterando la sequenza amminoacidica in modo tale che essa contenga una o più delle sequenze triceptidiche sopra descritte (per siti di glicosilazione N-legati). L'alterazione può anche essere effettuata aggiungendo o sostituendo uno o più residui di serina o treonina alla sequenza di partenza (per siti di glicosilazione O-legati). Per facilità, la sequenza di amminoacidi anticorpali viene preferibilmente alterata attraverso modifiche al livello del DNA, in particolare mediante la mutazione del DNA che codifica il polipeptide bersaglio su basi preselezionate in modo tale che siano generati codoni che si tradurranno negli amminoacidi desiderati.

[00126] Un altro mezzo per aumentare il numero di porzioni di carboidrati sull'anticorpo è l'accoppiamento chimico o enzimatico di glicosidi con la proteina. Queste procedure sono vantaggiose in quanto non richiedono la produzione della proteina in una cellula ospite che abbia capacità di glicosilazione per la glicosilazione N ed O-legata. A seconda della modalità di accoppiamento utilizzata, uno o più zuccheri possono essere accattati a (a) arginina e istidina, (b) gruppi carbossilici liberi, (c) gruppi solfidrilici liberi come quelli della cisteina, (d) gruppi idrossilici liberi come quelli di serina, treonina o idrossiprolina, (e) residui aromatici come quelli di fenilalanina, tirosina o triptofano o (f) il gruppo ammidico di glutammina. Questi metodi sono descritti in WO 87/05330 e in Aplin e Wriston, 1981, CRC Crit. Rev. Biochem., pp. 259-306.

[00127] La rimozione delle porzioni di carboidrati presenti sull'anticorpo di partenza (ad esempio post-traduzionale) può essere eseguita chimicamente o enzimaticamente. La deglicosilazione chimica richiede l'esposizione della proteina all'acido trifluorometansolfonico composto o a un composto equivalente. Questo trattamento determina la scissione della maggior parte o di tutti gli zuccheri ad eccezione dello zucchero legante (N-acetilglucosammina o N-acetilgalattosammina), lasciando intatto il polipeptide. La deglicosilazione chimica è descritta da Hakimuddin et al., 1987, Arch. Biochem. Biophys. 259:52 e da Edge et al., 1981, Anal. Biochem. 118:131. La scissione enzimatica delle porzioni di carboidrati sui polipeptidi può essere ottenuta mediante l'uso di una varietà di endo ed eso-glicosidasi come descritto da Thotakura et al., 1987, Meth. Enzymol. 138:350, interamente incorporato per riferimento. La glicosilazione a potenziali siti di glicosilazione può essere prevenuta mediante l'uso del composto tunicamicina come descritto da Duskin et al., 1982, J. Biol. Chem. 257:3105. La tunicamicina blocca la formazione di legami proteina-N-glicoside.

[00128] Un altro tipo di modifica covalente dell'anticorpo comprende il legame dell'anticorpo a vari polimeri non proteici, inclusi, ma non limitati a, diversi polioli come polietilenglicole, polipropilenglicole o poliossialchilene, nel modo descritto, ad esempio, in 2005-2006 PEG Catalog di Nektar Therapeutics (disponibile sul sito Web Nektar) e nei brevetti statunitensi 4,640,835; 4,496,689; 4,301,144; 4,670,417; 4,791,192 o 4,179,337. Inoltre, come è noto nell'arte, si possono

effettuare sostituzioni amminoacidiche in varie posizioni all'interno dell'anticorpo per facilitare l'aggiunta di polimeri come PEG. Si veda, ad esempio, la pubblicazione statunitense n. 2005/0114037A1.

Forme di realizzazione per CDR e regioni variabili specifiche

[00129] La presente invenzione fornisce numerosi anticorpi ciascuno con un insieme specifico di CDR. Come descritto sopra, gli anticorpi possono essere definiti da insiemi di 6 CDR, da regioni variabili, o da catene pesanti e leggere a lunghezza intera, incluse le regioni costanti. Come descritto sopra, possono anche essere fatte sostituzioni amminoacidiche. Solo per riferimento, in generale, nel contesto delle modifiche all'interno delle CDR, a causa della lunghezza relativamente breve delle CDR, le modifiche amminoacidiche sono generalmente descritte in termini del numero di modifiche amminoacidiche che possono essere apportate. Sebbene ciò sia anche applicabile alla discussione del numero di modifiche amminoacidiche che possono essere introdotte in sequenze variabili, costanti o a piena lunghezza, oltre al numero di modifiche, è anche opportuno definire queste modifiche in termini di "% di identità". Pertanto, come descritto qui, gli anticorpi inclusi nella descrizione sono identici per l'80, l'85, il 90, il 95, il 98 o il 99% ai SEQ ID NO qui elencati.

[00130] Nel contesto dell'anticorpo Ab79, l'insieme delle CDR è il seguente: le tre CDR della catena pesante comprendono HCDR1 SEQ ID NO:3 (HCDR1), SEQ ID NO:4 (HCDR2) e SEQ ID NO:5

(HCDR3), e le tre CDR della catena leggera comprendono SEQ ID NO:6 (LCDR1), SEQ ID NO:7 (LCDR2) e SEQ ID NO:8 (LCDR3).

[00131] Nel contesto di Ab19, l'insieme delle CDR è il seguente: HCDR1 (SEQ ID NO:13), HCDR2 (SEQ ID NO:14), e HCDR3 (SEQ ID NO:15), e LCDR1 (SEQ ID NO:16), LCDR2 (SEQ ID NO:17), e LCDR3 (SEQ ID NO:18).

[00132] Specificamente esclusi dalla presente invenzione sono gli anticorpi di SEQ ID NO.: 24 e 25 (le catene pesante e leggera di Benchmark 1) e i SEQ ID NO.: 26 e 27 (le catene pesante e leggera di Benchmark 2). Va notato che questi anticorpi non sono cross-reattivi con CD38 di cynomolgus, discusso di seguito.

[00133] Gli anticorpi dell'invenzione sono cross-reattivi con CD38 umana e di cynomolgus e sono quindi anticorpi cross-reattivi della specie. Un "anticorpo cross-reattivo della specie" è un anticorpo che ha un'affinità di legame per un antigene di una prima specie di mammiferi che è quasi uguale all'affinità di legame per un omologo di tale antigene di una seconda specie di mammiferi. La cross-reattività di specie può essere espressa, ad esempio, come rapporto tra il KD di un anticorpo per un antigene della prima specie di mammifero e il KD dello stesso anticorpo per l'omologo di tale antigene da una seconda specie di mammifero in cui il rapporto è 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 2, 5, 10, 15, fino a 20. In alternativa o in aggiunta, un anticorpo è "cross-reattivo per la specie" quando mostra efficacia terapeutica o diagnostica quando somministrato alla seconda specie. Pertanto, nel presente caso, gli

anticorpi dell'invenzione sono cross-reattivi con CD38 di cynomolgus, mostrano efficacia preclinica quando somministrati a primati cynomolgus e quindi sono considerati cross-reattivi.

[00134] In alcune forme di realizzazione qui descritte solo a titolo di riferimento, sono forniti anticorpi che competono con gli anticorpi dell'invenzione (ad esempio, con Ab79 e/o Ab19) per il legame a CD38 umana e/o di cynomolgus, ma non sono inclusi né BM1 o BM2. La competizione per il legame alla CD38 o a una porzione della CD38 mediante due o più anticorpi anti-CD38 può essere determinata mediante qualsiasi tecnica adatta, come è noto nell'arte.

[00135] La competizione nel contesto della presente invenzione si riferisce a qualsiasi riduzione sensibilmente significativa nella propensione di un anticorpo dell'invenzione (ad esempio Ab79 o Ab19) di legarsi al suo particolare partner di legame, ad esempio CD38, in presenza del composto di prova. Tipicamente, competizione significa una riduzione di almeno circa il 10-100% nel legame di un anticorpo dell'invenzione alla CD38 in presenza del competitore, come misurato mediante tecniche standard come saggi ELISA o Biacore®. Pertanto, ad esempio, è possibile impostare criteri per la competitività in cui viene rilevata almeno un'inibizione relativa di circa il 10%; viene rilevata un'inibizione relativa di almeno il 15%; o viene rilevata un'inibizione relativa di almeno il 20% prima che un anticorpo sia considerato sufficientemente competitivo. Nei casi in cui epitopi appartenenti ad anticorpi competitivi siano localizzati vicini in un antigene, la

competizione può essere caratterizzata da un'inibizione relativa maggiore di circa il 40% del legame CD38 (ad esempio, un'inibizione di almeno il 45% circa, come ad esempio un'inibizione di almeno il 50% circa, ad esempio un'inibizione di almeno il 55% circa, ad esempio un'inibizione di almeno il 60% circa, ad esempio un'inibizione di almeno il 65% circa, ad esempio un'inibizione di almeno il 70% circa, ad esempio un'inibizione di almeno il 75% circa, ad esempio un'inibizione di almeno l'80% circa, ad esempio un'inibizione di almeno l'85% circa, ad esempio un'inibizione di almeno il 90% circa, ad esempio un'inibizione di almeno il 95% circa o un livello più alto di inibizione relativa).

[00136] In alcuni casi, uno o più componenti dei saggi di legame competitivo sono marcati, come discusso di seguito nel contesto delle applicazioni diagnostiche.

[00137] Può anche accadere che possa esistere competizione tra anticorpi anti-CD38 rispetto a più di un epitopo CD38 e/o una porzione di CD38, ad esempio in un contesto in cui le proprietà di legame degli anticorpi di una particolare regione di CD38 siano conservate in loro frammenti, come nel caso di un epitopo lineare ben presentato situato in vari frammenti testati o un epitopo conformazionale che è presentato in frammenti di CD38 sufficientemente grandi e in CD38.

[00138] La valutazione della competizione comporta in genere una valutazione del legame inibitorio relativo utilizzando un anticorpo

dell'invenzione, CD38 (umana o di cynomolgus o entrambi), e la molecola del test. Le molecole di test possono includere qualsiasi molecola, inclusi altri anticorpi, piccole molecole, peptidi, ecc. I composti sono mescolati in quantità sufficienti per effettuare un confronto che fornisce informazioni sulla selettività e/o specificità delle molecole in questione rispetto alle altre molecole presenti.

[00139] Le quantità di composto di test, CD38 e anticorpi dell'invenzione possono essere variate. Ad esempio, per le valutazioni ELISA sono necessari circa 5-50 µg (ad esempio circa 10-50 µg, circa 20-50 µg, circa 5-20 µg, circa 10-20 µg, ecc.) dell'anticorpo anti-CD38 e/o dei bersagli CD38 per valutare se esiste competizione. Anche le condizioni dovrebbero essere adatte per il legame. In genere, condizioni fisiologiche o quasi fisiologiche (ad esempio, temperature di circa 20-40 °C, pH di circa 7-8, ecc.) sono adatte per il legame anti-CD38:CD38.

[00140] Spesso la competizione è contrassegnata da un'inibizione relativa significativamente maggiore di circa il 5% come determinato da analisi ELISA e/o FACS. Può essere desiderabile impostare una soglia più alta di inibizione relativa come criterio/determinante di quale sia un adeguato livello di competizione in un particolare contesto (ad esempio, dove l'analisi della competizione viene utilizzata per selezionare o eseguire lo screening per nuovi anticorpi progettati con la funzione prevista di bloccare il legame di un altro peptide o molecola che si lega a CD38 (ad esempio, i partner di

legame naturale di CD38 come CD31, chiamato anche antigene CD31, EndoCAM, GPIIA, PECAM-1, molecola di adesione delle cellule endoteliali/piastrine o anticorpo anti-CD38 presente in natura).

[00141] In alcune forme di realizzazione, l'anticorpo anti-CD38 della presente invenzione si lega specificamente a uno o più residui o regioni in CD38 ma inoltre non cross-reagisce con altre proteine con omologia alla CD38, come BST-1 (antigene di cellula stromale di midollo osseo-1) e Mo5, chiamata anche CD157.

[00142] Tipicamente, una mancanza di cross-reattività significa meno di circa il 5% di inibizione competitiva relativa tra le molecole quando valutate mediante analisi ELISA e/o FACS utilizzando quantità sufficienti delle molecole in condizioni di saggio adeguate.

[00143] Gli anticorpi divulgati possono trovare impiego nel bloccare un'interazione ligando-recettore o un'interazione dei componenti dei recettori inibenti. Gli anticorpi anti-CD38 dell'invenzione possono essere "bloccanti" o "neutralizzanti". Un "anticorpo neutralizzante" è inteso riferirsi ad un anticorpo il cui legame alla CD38 provoca l'inibizione dell'attività biologica della CD38, ad esempio la sua capacità di interagire con ligandi, attività enzimatica e/o capacità di segnalazione. L'inibizione dell'attività biologica della CD38 può essere valutata mediante uno o più diversi test standard in vitro o in vivo noti nell'arte (si vedano esempi sotto).

[00144] "Inibisce il legame" o "blocca il legame" (ad esempio quando si fa riferimento all'inibizione/al blocco del legame di un partner

di legame CD38 alla CD38) comprende sia l'inibizione/il blocco parziale sia quello completo. L'inibizione/il blocco del legame di un partner di legame CD38 alla CD38 può ridurre o alterare il livello normale o il tipo di segnalazione cellulare che si verifica quando un partner di legame CD38 si lega alla CD38 senza inibizione o blocco. L'inibizione e il blocco sono anche intesi come includenti qualsiasi diminuzione misurabile nell'affinità di legame di un partner di legame CD38 alla CD38 quando è in contatto con un anticorpo anti-CD38, rispetto al ligando non a contatto con un anticorpo anti-CD38, ad esempio un blocco del legame di un partner di legame CD38 alla CD38 di almeno circa il 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 99% o 100%.

[00145] Gli anticorpi anti-CD38 divulgati possono anche inibire la crescita delle cellule. "Inibisce la crescita" include qualsiasi diminuzione misurabile nella crescita cellulare quando a contatto con un anticorpo anti-CD38, rispetto alla crescita delle stesse cellule non a contatto con un anticorpo anti-CD38, ad esempio un'inibizione di crescita di una coltura cellulare di almeno circa il 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 99% o 100%.

Metodi per produrre gli anticorpi dell'invenzione

[00146] La presente invenzione fornisce inoltre metodi per produrre gli anticorpi anti-CD38 divulgati. Questi metodi comprendono la coltura di una cellula ospite contenente uno o più acidi nucleici isolati codificanti gli anticorpi dell'invenzione. Come sarà compreso dai tecnici

del ramo, ciò può essere fatto in una varietà di modi, a seconda della natura dell'anticorpo. In alcune forme di realizzazione, nel caso in cui gli anticorpi dell'invenzione siano anticorpi tradizionali a lunghezza intera, ad esempio, una regione variabile della catena pesante e una regione variabile della catena leggera in condizioni tali che un anticorpo sia prodotto e possa essere isolato.

[00147] In generale, sono forniti acidi nucleici che codificano gli anticorpi dell'invenzione. Tali polinucleotidi codificano sia le regioni variabili sia quelle costanti di ciascuna delle catene pesante e leggera, sebbene siano anche contemplate dalla presente invenzione altre combinazioni in accordo con le composizioni qui descritte. La presente invenzione contempla anche frammenti di oligonucleotidi derivati dai polinucleotidi divulgati e sequenze di acido nucleico complementari a questi polinucleotidi.

[00148] I polinucleotidi possono essere sotto forma di RNA o DNA. I polinucleotidi sotto forma di DNA, cDNA, DNA genomico, analoghi dell'acido nucleico e DNA sintetico rientrano nell'ambito della presente invenzione. Il DNA può essere a doppio filamento o a singolo filamento e, se a singolo filamento, può essere il filamento codificante (senso) o non codificante (anti-senso). La sequenza codificante che codifica il polipeptide può essere identica alla sequenza codificante qui fornita o può essere una sequenza codificante diversa, la cui sequenza, come risultato della ridondanza o della degenerazione del codice genetico, codifica gli stessi polipeptidi del DNA qui fornito.

[00149] In alcune forme di realizzazione, l'acido o gli acidi nucleici che codificano gli anticorpi dell'invenzione sono incorporati in vettori di espressione, che possono essere extracromosomici o progettati per integrarsi nel genoma della cellula ospite in cui sono introdotti. I vettori di espressione possono contenere un numero qualsiasi di sequenze regolatorie appropriate (incluse, ma non limitate a, sequenze di controllo trascrizionale e traslazionale, promotori, siti di legame ribosomiale, enhancer, origini della replicazione, ecc.) o altri componenti (geni di selezione, ecc.), tutti i quali sono collegati operativamente come è ben noto nell'arte. In alcuni casi vengono utilizzati due acidi nucleici e ciascuno viene immesso in un vettore di espressione diverso (ad es. catena pesante in un primo vettore di espressione, catena leggera in un secondo vettore di espressione) o in alternativa possono essere inseriti nello stesso vettore di espressione. I tecnici del ramo comprenderanno che il design del vettore o dei vettori di espressione, compresa la selezione delle sequenze regolatorie, può dipendere da fattori quali la scelta della cellula ospite, il livello di espressione della proteina desiderata, ecc.

[00150] In generale, gli acidi nucleici e/o l'espressione possono essere introdotti in una cellula ospite adatta per creare una cellula ospite ricombinante usando qualsiasi metodo appropriato per la cellula ospite selezionata (ad esempio, trasformazione, trasfezione, elettroporazione, infezione), tale che la molecole o le molecole di acido nucleico siano collegate operativamente a uno o più elementi di

controllo dell'espressione (ad esempio, in un vettore, in un costrutto creato da processi nella cellula, integrate nel genoma della cellula ospite). La cellula ospite ricombinante risultante può essere mantenuta in condizioni adatte per l'espressione (ad esempio in presenza di un induttore, in un animale non umano adatto, in terreni di coltura integrati adatti con sali appropriati, fattori di crescita, antibiotici, supplementi nutrizionali, ecc.), per cui vengono prodotti uno o più polipeptidi codificati. In alcuni casi, le catene pesanti sono prodotte in una cellula e la catena leggera in un'altra.

[00151] Le linee cellulari di mammiferi disponibili come ospiti per l'espressione sono note nell'arte e includono molte linee di cellule immortalizzate disponibili dall'American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, VA incluse ma non limitate a cellule di ovaio di criceto cinese (CHO), cellule HEK 293, cellule NSO, cellule HeLa, cellule renali di cucciolo di criceto (BHK), cellule renali di scimmia (COS), cellule di carcinoma epatocellulare umano (ad esempio, Hep G2) e diverse altre linee cellulari. Anche le cellule non di mammiferi, comprese ma non limitate a batteri, lieviti, insetti e piante, possono essere usate per esprimere anticorpi ricombinanti. In alcune forme di realizzazione, gli anticorpi possono essere prodotti in animali transgenici come mucche o polli.

[00152] Metodi generali per la biologia molecolare anticorpale, l'espressione, la purificazione e lo screening sono descritti, ad esempio, in *Antibody Engineering*, a cura di Kontermann & Dubel, Springer,

Heidelberg, 2001 e 2010 Hayhurst & Georgiou, 2001, Curr Opin Chem Biol 5:683-689; Maynard & Georgiou, 2000, Annu Rev Biomed Eng 2:339-76; e Morrison, S. (1985) Science 229:1202.

[00153] I coniugati di farmaci anticorpali come descritti qui sono realizzati come è noto nell'arte, comprese le tecniche utilizzate da Seattle Genetics (si vedano ad esempio i brevetti statunitensi n. 8,067,546; 8,039,273; 7,989,434; 7,851,437; 7,837,980 e 7,829,531, con particolare riferimento a farmaci, linker e metodi di coniugazione), Syntarga (si vedano ad esempio 7,705,045 e 7,223,837, con particolare riferimento a farmaci, linker e metodi di coniugazione), Medarex (si vedano ad esempio 8,034,959; 8,034,787; 7,968,586, e 7,847,105, con particolare riferimento a farmaci, linker e metodi di coniugazione), e altri ben noti nell'arte.

Applicazioni e indicazioni

[00154] Una volta realizzati, gli anticorpi dell'invenzione trovano impiego in una varietà di applicazioni, compresa la diagnosi di malattie correlate alla CD38 e il loro trattamento.

Condizioni correlate alla CD38

[00155] In un aspetto, la divulgazione fornisce metodi per trattare una condizione associata alla proliferazione di cellule che esprimono la CD38, comprendente la somministrazione a un paziente di una quantità farmaceuticamente efficace di un anticorpo divulgato. In alcune forme di realizzazione, la condizione è il cancro e, in particolari forme di realizzazione, il cancro è un cancro ematologico. In altre forme

di realizzazione particolari, la condizione è mieloma multiplo, leucemia linfoblastica cronica, leucemia linfatica cronica, leucemia plasmacellulare, leucemia mieloide acuta, leucemia mieloide cronica, linfoma dei linfociti B o linfoma di Burkitt.

[00156] È noto nell'arte che determinate condizioni siano associate a cellule che esprimono la CD38 e che determinate condizioni siano associate alla sovraespressione, all'espressione ad alta densità o all'espressione sovraregolata della CD38 sulle superfici delle cellule. Se una popolazione cellulare esprima o meno CD38 può essere determinato mediante metodi noti nell'arte, ad esempio determinazione mediante citometria a flusso della percentuale di cellule in una data popolazione marcate da un anticorpo che si lega specificamente alla CD38 o saggi immunoistochimici, come generalmente descritti di seguito per le applicazioni diagnostiche. Ad esempio, una popolazione di cellule in cui viene rilevata un'espressione della CD38 in circa il 10-30% delle cellule può essere considerata come avente una debole positività per la CD38; e una popolazione di cellule in cui l'espressione della CD38 è rilevata in più del 30% circa delle cellule può essere considerata come positività definita per la CD38 (come in Jackson et al. (1988), Clin. Exp. Immunol. 72: 351-356), sebbene possano essere usati altri criteri per determinare se una popolazione di cellule esprime la CD38. La densità di espressione sulle superfici delle cellule può essere determinata utilizzando metodi noti nell'arte, come ad esempio la misurazione mediante citometria a flusso

dell'intensità di fluorescenza media delle cellule marcate in modo fluorescente usando anticorpi che si legano in modo specifico alla CD38.

[00157] In alcune forme di realizzazione, le composizioni e i metodi della divulgazione sono applicati a un cancro come un "cancro ematologico", un termine che si riferisce a neoplasie maligne di tessuti che formano il sangue e comprende leucemia, linfoma e mieloma multiplo. Esempi non limitativi di condizioni associate all'espressione della CD38 includono ma non sono limitati a mieloma multiplo (Jackson et al. (1988), Clin. Exp. Immunol. 72: 351-356), leucemia linfatica cronica a cellule B (B-CLL) Dürig et al. (2002), Leukemia 16: 30-5; Morabito et al. (2001), Leukemia Research 25: 927-32; Marinov et al. (1993), Neoplasma 40(6): 355-8; e Jelinek et al. (2001), Br. J. Haematol. 115: 854-61), leucemia linfoblastica acuta (Keyhani et al. (1999), Leukemia Research 24: 153-9; e Marinov et al. (1993), Neoplasma 40(6): 355-8), leucemia mieloide cronica (Marinov et al. (1993), Neoplasma 40(6): 355-8), leucemia mieloide acuta (Keyhani et al. (1999), Leukemia Research 24: 153-9), leucemia linfocitica cronica (CLL), leucemia mieloide cronica (CML), leucemia mieloide acuta (AML), leucemia linfocitica acuta (ALL), leucemia a cellule capellute (HCL), sindromi mielodisplastiche (MDS) o leucemia mieloide cronica (CML-BP) in fase blastica e tutti i sottotipi di queste leucemie che sono definiti da tecniche morfologiche, istochimiche e immunologiche ben note ai tecnici del ramo.

[00158] "Neoplasia" o "condizione neoplastica" si riferisce a una condizione associata alla proliferazione di cellule caratterizzata da una perdita dei normali controlli che si traduce in uno o più sintomi tra cui crescita non regolata, mancanza di differenziazione, invasione tissutale locale e metastasi.

[00159] In alcune forme di realizzazione dell'invenzione, il cancro ematologico è scelto dal gruppo di leucemia linfocitica cronica (CLL), leucemia mieloide cronica (CML), leucemia mieloide acuta (AML) e leucemia linfocitica acuta (ALL).

[00160] Inoltre, è noto nell'arte che l'espressione della CD38 sia un indicatore prognostico per pazienti con condizioni quali, ad esempio, leucemia linfocitica cronica a cellule B (Dürig et al. (2002), Leukemia 16: 30-5; e Morabito et al. (2001), Leukemia Research 25: 927-32) e leucemia mieloide acuta (Keyhani et al. (1999), Leukemia Research 24: 153-9).

[00161] La CLL è la leucemia più comune negli adulti nel mondo occidentale. La CLL comporta l'espansione clonale di linfociti apparentemente maturi che coinvolgono linfonodi e altri tessuti linfoidei con progressiva infiltrazione di midollo osseo e presenza nel sangue periferico. La forma a cellule B (B-CLL) rappresenta quasi tutti i casi.

B-CLL

[00162] La B-CLL è una malattia incurabile caratterizzata da un progressivo aumento delle cellule della linea cellulare B monoclonale anergiche che si accumulano nel midollo osseo e nel sangue periferico

in modo prolungato per molti anni. L'espressione della CD38 è considerata un fattore prognostico negativo indipendente per la B-CLL. Hamblin et al., Blood 99:1023-9 (2002).

[00163] La terapia standard odierna per la B-CLL è palliativa ed è eseguita principalmente con l'agente citostatico clorambucile o fludarabina. Quando si verificano recidive, viene spesso avviata una terapia combinata con fludarabina, ciclofosfamide in combinazione con rituximab (anticorpo monoclonale contro CD20) o campath (anticorpo monoclonale contro CD52). Pertanto, vi è una necessità medica insoddisfatta per il trattamento della B-CLL. In alcune forme di realizzazione, sono forniti metodi per trattare la B-CLL utilizzando gli anticorpi anti-CD38 divulgati (e, come descritto di seguito, ciò può essere fatto usando terapie combinate includendo opzionalmente ed indipendentemente uno qualsiasi dei suddetti farmaci).

[00164] La B-CLL è caratterizzata da due sottotipi: indolente e aggressivo. Questi fenotipi clinici sono correlati alla presenza o all'assenza di mutazioni somatiche nel gene della regione variabile della catena pesante delle immunoglobuline (IgVH). Come qui usato, la B-CLL indolente si riferisce a un disturbo in soggetti con gene IgVH mutato e/o che presentano uno o più fenotipi clinici associati alla B-CLL indolente. Come usato qui, la frase B-CLL aggressiva si riferisce a un disturbo in un soggetto con IgVH non mutato e/o che presenta uno o più fenotipi clinici associati alla B-CLL aggressiva.

Mieloma multiplo

[00165] Il mieloma multiplo è una malattia maligna della linea cellulare B caratterizzata dalla proliferazione neoplastica di plasmacellule nel midollo osseo. Gli attuali regimi di trattamento mostrano tassi di risposta moderati. Tuttavia, si osservano solo cambiamenti marginali nella sopravvivenza globale e la sopravvivenza mediana è di circa 3 anni. Pertanto, vi è una necessità medica insoddisfatta per il trattamento del mieloma multiplo. In alcune forme di realizzazione della divulgazione, sono forniti metodi per trattare il mieloma multiplo usando gli anticorpi divulgati.

[00166] La CD38 è altamente espressa su plasmacellule che sono cellule B differenziate terminalmente.

[00167] La proliferazione delle cellule di mieloma causa una varietà di effetti, tra cui lesioni litiche (fori) nell'osso, diminuzione del numero di globuli rossi, produzione di proteine anomale (con conseguente danno a reni, nervi e altri organi), riduzione della funzione del sistema immunitario e livelli elevati di calcio nel sangue (ipercalcemia).

[00168] Attualmente le opzioni di trattamento comprendono la chemioterapia, preferibilmente associata quando possibile al trapianto di cellule staminali autologhe (ASCT).

Gammopatia monoclonale di significato indeterminato e mieloma multiplo smouldering

[00169] In alcune forme di realizzazione della divulgazione, sono forniti metodi per trattare la gammopatia monoclonale usando gli

anticorpi divulgati. In altre forme di realizzazione della divulgazione, sono forniti metodi per trattare il mieloma multiplo smouldering usando gli anticorpi divulgati.

[00170] La gammopatia monoclonale di significato indeterminato (MGUS) e il mieloma multiplo smouldering (SMM) sono disturbi asintomatici, pre-maligni caratterizzati dalla proliferazione di plasmacellule monoclonali nel midollo osseo e dall'assenza di danno agli organi terminali.

[00171] Il mieloma multiplo smouldering (SMM) è un disturbo proliferativo asintomatico delle plasmacellule con un alto rischio di progressione verso il mieloma multiplo sintomatico o attivo (N. Engl. J. Med. 356(25): 2582-2590 (2007)).

[00172] I criteri di consenso internazionali che definiscono ISMM sono stati adottati nel 2003 e richiedono che un paziente abbia un livello di proteina M >30 g/L e/o plasmacellule clonali nel midollo osseo >10% (Br. J. Haematol. 121: 749-57 (2003)). Il paziente non deve presentare alterazioni dell'organo o dei tessuti correlati, comprese lesioni o sintomi ossei (Br. J. Haematol. 121: 749-57 (2003)).

[00173] Studi recenti hanno identificato due sottoinsiemi di SMM; i) pazienti con malattia in evoluzione e ii) pazienti con malattia non in evoluzione (Br. J. Haematol. 121: 631-636 (2003)). I criteri di consenso internazionali che definiscono l'MGUS richiedono che il paziente abbia un livello di proteina M <30 g/L, plasmacellule del midollo osseo <10% e assenza di disfunzioni dell'organo o dei tessuti

correlati, incluse lesioni o sintomi ossei (Br. J. Haematol. 121: 749-57 (2003)).

[00174] L'SMM assomiglia alla gammopatia monoclonale di significato indeterminato (MGUS) poiché il danno degli organi terminali è assente (N. Engl. J. Med. 356(25): 2582-2590 (2007)). Clinicamente, tuttavia, la SMM ha molte più probabilità di progredire verso il mieloma multiplo attivo o l'amiloidosi a 20 anni (78% di probabilità per la SMM vs. 21% per la MGUS) (N. Engl. J. Med. 356(25): 2582-2590 (2007)).

[00175] La Figura 11 illustra diverse forme di realizzazione di ADC. Come descritto qui, le porzioni linker possono cambiare, inclusa la composizione degli amminoacidi, i linker autoimmolativi, ecc.

Coniugati anticorpo-farmaco

[00176] Gli anticorpi anti-CD38 dell'invenzione sono coniugati con farmaci per formare coniugati anticorpo-farmaco (ADC). In generale, gli ADC sono utilizzati in applicazioni oncologiche, dove l'uso di coniugati anticorpo-farmaco per l'erogazione locale di agenti citotossici o citostatici consente l'erogazione mirata della porzione di farmaco ai tumori, che può consentire maggiore efficacia, minore tossicità, ecc. Una panoramica di questa tecnologia è fornita in Ducry et al., Bioconjugate Chem., 21:5-13 (2010), Carter et al., Cancer J. 14(3):154 (2008) e Senter, Current Opin. Chem. Biol. 13:235-244 (2009).

[00177] Pertanto l'invenzione fornisce anticorpi anti-CD38 coniugati a farmaci. Generalmente, la coniugazione viene effettuata

mediante attacco covalente all'anticorpo, come ulteriormente descritto di seguito, e generalmente si basa su un linker, spesso un legame peptidico (che, come descritto di seguito, può essere progettato per essere sensibile alla scissione ad opera delle proteasi nel sito bersaglio o meno). Inoltre, come descritto sopra, il legame dell'unità linker-farmaco (LU-D) può essere effettuato mediante attacco alle cisteine all'interno dell'anticorpo. Come sarà compreso dai tecnici del ramo, il numero di porzioni di farmaco per anticorpo può variare, a seconda delle condizioni della reazione, e può variare da 1:1 a 10:1 farmaco:anticorpo. Come sarà compreso dai tecnici del ramo, il numero effettivo è una media.

[00178] Pertanto l'invenzione fornisce anticorpi anti-CD38 coniugati a farmaci. Come descritto di seguito, il farmaco dell'ADC può essere un numero qualsiasi di agenti, inclusi ma non limitati ad agenti citotossici quali agenti chemioterapici, agenti inibitori della crescita, tossine (ad esempio, una tossina enzimaticamente attiva di origine batterica, fungina, vegetale o animale o suoi frammenti) o un isotopo radioattivo (ovvero, un radioconjugato). In altre forme di realizzazione, la divulgazione fornisce inoltre metodi di utilizzo degli ADC.

[00179] I farmaci per l'uso nella presente invenzione includono farmaci citotossici, in particolare quelli che sono usati per la terapia antitumorale. Tali farmaci comprendono, in generale, agenti dannosi per il DNA, anti-metaboliti, prodotti naturali e loro analoghi. Classi esemplificative di agenti citotossici includono gli inibitori enzimatici

come inibitori della diidrofolato reduttasi e inibitori della timidilato sintasi, intercalatori del DNA, agenti di scissione del DNA, inibitori della topoisomerasi, la famiglia di farmaci antracicline, i farmaci della vinca, le mitomicine, le bleomicine, i nucleosidi citotossici, la famiglia di farmaci di pteridine, diineni, podofillotossine, dolastatine, maitansinoidi, induttori di differenziazione e taxoli.

[00180] Membri di queste classi includono, ad esempio, metotrexato, metopterina, diclorometotrexato, 5-fluorouracile, 6-mercaptapurina, citosina arabinoside, melfalan, leurosina, leurosideina, actinomicina, daunorubicina, doxorubicina, mitomicina C, mitomicina A, caminomicina, aminopterina, tallisomicina, podofillotossina e derivati della podofillotossina come etoposide o etoposide fosfato, vinblastina, vincristina, vindesina, taxani incluso taxolo, acido retinoico taxotere, acido butirrico, N8-acetil spermidina, camptotecina, calicheamicina, esperamicina, ene-diine, duocarmicina A, duocarmicina SA, calicheamicina, camptotecina, maitansinoidi (compreso DM1), monometilauristatina E (MMAE), monometilauristatina F (MMAF) e maitansinoidi (DM4) e loro analoghi.

[00181] Le tossine possono essere usate come coniugati anticorpo-tossina e includono tossine batteriche come la tossina della difterite, tossine vegetali come la ricina, tossine a piccole molecole come la geldanamicina (Mandler et al. (2000) J. Nat. Cancer Inst. 92(19):1573-1581; Mandler et al. (2000) Bioorganic & Med. Chem. Letters 10:1025-1028; Mandler et al. (2002) Bioconjugate Chem.

13:786-791), maitansinoidi (EP 1391213; Liu et al., (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:8618-8623) e calicheamicina (Lode et al. (1998) Cancer Res. 58:2928; Hinman et al. (1993) Cancer Res. 53:3336-3342). Le tossine possono esercitare i loro effetti citotossici e citostatici mediante meccanismi che includono il legame alla tubulina, il legame del DNA o l'inibizione della topoisomerasi.

[00182] Sono contemplati coniugati di un anticorpo anti-CD38 e una o più tossine a piccole molecole, come un maitansinoide, dolastatine, auristatine, un tricotecene, calicheamicina e CC1065, e i derivati di queste tossine che hanno attività tossinica.

[00183] Maitansinoidi

[00184] I composti di maitansina adatti all'uso come porzioni di farmaco maitansinoide sono ben noti nell'arte e possono essere isolati da sorgenti naturali secondo metodi noti, prodotti usando tecniche di ingegneria genetica (si veda Yu et al. (2002) PNAS 99:7968-7973) o maitansinolo e analoghi di maitansinolo preparati sinteticamente secondo metodi noti. Come descritto di seguito, i farmaci possono essere modificati mediante l'incorporazione di un gruppo funzionalmente attivo come un tiolo o un gruppo amminico per la coniugazione con l'anticorpo.

[00185] Porzioni di farmaco maitansinoide esemplificative includono quelle aventi un anello aromatico modificato, come ad esempio: C-19-decloro (brevetto statunitense n. 4,256,746) (preparato mediante riduzione di litio alluminio idruro di ansamitocina P2); C-20-

idrossi (o C-20-demetil) +/-C-19-decloro (brevetto statunitense n. 4,361,650 e 4,307,016) (preparato mediante demetilazione usando Streptomyces o Actinomyces o dechlorinazione con LAH); e C-20-demetossi, C-20-acilossi (--OCOR), +/-decloro (brevetto statunitense n. 4,294,757) (preparato mediante acilazione usando acil cloruri) e quelli che hanno modifiche in altre posizioni.

[00186] Porzioni di farmaco maitansinoide esemplificative includono anche quelle aventi modifiche quali: C-9-SH (brevetto statunitense n. 4,424,219) (preparate dalla reazione di maitansinolo con H₂S o P₂S₅); C-14-alcossimetil(demetossi/CH₂OR) (brevetto statunitense n. 4,331,598); C-14-idrossimetile o acilossimetile (CH₂OH o CH₂OAc) (brevetto statunitense n. 4,450,254) (preparate da Nocardia); C-15-idrossi/acilossi (brevetto statunitense n. 4,364,866) (preparate dalla conversione di maitansinolo ad opera di Streptomyces); C-15-metossi (brevetto statunitense n. 4,313,946 e 4,315,929) (isolata da Trewia nudiflora); C-18-N-demetile (brevetto statunitense n. 4,362,663 e 4,322,348) (preparata dalla demetilazione di maitansinolo ad opera di Streptomyces); e 4,5-deossi (brevetto statunitense n. 4,371,533) (preparata da riduzione di tricloruro di titanio/LAH di maitansinolo).

[00187] Di particolare uso sono DM1 (divulgati nel brevetto statunitense n. 5,208,020, incorporato per riferimento) e DM4 (divulgato nel brevetto statunitense n. 7,276,497, incorporato per riferimento). Si vedano anche diversi derivati e metodi di maitansinoidi aggiuntivi in

5,416,064; WO/01/24763; 7,303,749; 7,601,354; USSN 12/631,508; WO02/098883; 6,441,163; 7,368,565; WO02/16368 e WO04/1033272.

[00188] Gli ADC contenenti maitansinoidi, i metodi di produzione degli stessi e il loro uso terapeutico sono divulgati, ad esempio, nel brevetto statunitense n. 5,208,020; 5,416,064; 6,441,163 e nel brevetto europeo EP 0 425 235 B1, Liu et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:8618-8623 (1996) descrivono ADC comprendenti un DM1 designato maitansinoide legato all'anticorpo monoclonale C242 diretto contro il cancro del colon-retto umano. Il coniugato è risultato essere altamente citotossico verso cellule di cancro del colon in coltura e ha mostrato attività antitumorale in un test di crescita tumorale in vivo.

[00189] Chari et al., Cancer Research 52:127-131 (1992) descrivono ADC in cui un maitansinoide è stato coniugato tramite un linker disolfuro all'anticorpo murino A7 che si lega ad un antigene su linee cellulari di cancro del colon umano, o ad un altro murino anticorpo monoclonale TA.1 che si lega all'oncogene HER-2/neu. La citotossicità del coniugato TA.1-maitansinoide è stata testata in vitro sulla linea di cellule di cancro al seno umano SK-BR-3, che esprime 3×10^5 antigeni di superficie HER-2 per cellula. Il coniugato del farmaco ha raggiunto un grado di citotossicità simile al farmaco maitansinoide libero, che potrebbe essere aumentato aumentando il numero di molecole di maitansinoide per molecola di anticorpo. Il coniugato A7-maitansinoide ha mostrato una bassa citotossicità sistemica nei topi.

[00190] Auristatine e dolastatine

[00191] In alcune forme di realizzazione, l'ADC comprende un anticorpo anti-CD38 coniugato con dolastatine o analoghi peptidici di dolostatina e derivati, le auristatine (brevetto statunitense n. 5,635,483; e 5,780,588). È stato dimostrato che dolastatine e auristatine interferiscono con la dinamica dei microtubuli, l'idrolisi GTP e la divisione nucleare e cellulare (Woyke et al. (2001) *Antimicrob. Agents and Chemother.* 45(12):3580-3584) e hanno attività antitumorale (brevetto statunitense n. 5,663,149) e antifungina (Pettit et al. (1998) *Antimicrob. Agents Chemother.* 42:2961-2965). La porzione di farmaco dolostatina o auristatina può essere attaccata all'anticorpo attraverso il terminale N (amminico) o il terminale C (carbossilico) della porzione di farmaco peptidico (WO 02/088172).

[00192] Forme di realizzazione di auristatina esemplificative includono porzioni di farmaco monometilauristatina legate all'N-terminale DE e DF, divulgate in "Senter et al, Proceedings of the American Association for Cancer Research, Volume 45, Abstract Number 623, presented Mar. 28, 2004 e descritte nella pubblicazione di brevetto degli Stati Uniti n. 2005/0238648.

[00193] Una forma di realizzazione di auristatina esemplificativa è MMAE (mostrata nella Figura 10 in cui la linea ondulata indica l'attacco covalente a un linker (L) di un coniugato farmaco-anticorpo (si veda il brevetto statunitense n. 6,884,869).

[00194] Un'altra forma di realizzazione esemplificativa di auristatina è MMAF, mostrata in Figura 10 in cui la linea ondulata indica

l'attacco covalente a un linker (L) di un coniugato anticorpo-farmaco (US 2005/0238649; 5,767,237 e 6,124,431.

[00195] Ulteriori forme di realizzazione esemplificative comprendenti MMAE o MMAF e vari componenti di linker (descritti più avanti nel presente documento) hanno le seguenti strutture e abbreviazioni (in cui Ab significa anticorpo e p è da 1 a circa 8):

[00196] Tipicamente, porzioni di farmaco a base di peptidi possono essere preparate formando un legame peptidico tra due o più amminoacidi e/o frammenti peptidici. Tali legami peptidici possono essere preparati, ad esempio, secondo il metodo di sintesi in fase liquida (si veda E. Schroder e K. Lubke, "The Peptides", volume 1, pp 76-136, 1965, Academic Press) ben noto nel campo della chimica dei peptidi. Le porzioni di farmaco auristatina/dolastatina possono essere preparate secondo i metodi di: Brevetto statunitense n. 5,635,483; brevetto statunitense n. 5,780,588; Pettit et al. (1989) J. Am. Chem. Soc. 111:5463-5465; Pettit et al. (1998) Anti-Cancer Drug Design 13:243-277; Pettit et al. Synthesis, 1996, 719-725; Pettit et al. (1996) J. Chem. Soc. *Perkin Trans. 1* 5:859-863; e Doronina (2003) Nat Biotechnol 21(7):778-784.

[00197] Calicheamicina

[00198] In altre forme di realizzazione, l'ADC comprende un anticorpo dell'invenzione coniugato con una o più molecole di calicheamicina. Ad esempio, Mylotarg è il primo farmaco ADC commerciale e utilizza calicheamicina γ 1 come carico utile (si veda il

brevetto statunitense n. 4,970,198. Ulteriori derivati calicheamicinici sono descritti nei brevetti statunitensi n. 5,264,586; 5,384,412; 5,550,246; 5,739,116; 5,773,001; 5,767,285 e 5,877,296, tutti espressamente incorporati per riferimento. La famiglia di antibiotici calicheamicinici è in grado di produrre rotture del DNA a doppio filamento a concentrazioni sub-picomolari. Per la preparazione di coniugati della famiglia di calicheamicina, si veda brevetto statunitense n. 5,712,374; 5,714,586; 5,739,116; 5,767,285; 5,770,701; 5,770,710; 5,773,001; e 5,877,296 (tutti di American Cyanamid Company). Gli analoghi strutturali della calicheamicina che possono essere usati includono, ma non sono limitati a, γ 1I, α 2I, α 2I, N-acetil- γ 1I, PSAG e θ 1I (Hinman et al., Cancer Research 53:3336-3342 (1993), Lode et al., Cancer Research 58:2925-2928 (1998) e i summenzionati brevetti statunitensi di American Cyanamid). Un altro farmaco antitumorale a cui può essere coniugato l'anticorpo è QFA, un antifolato. Sia la calicheamicina sia QFA hanno siti di azione intracellulari e non attraversano prontamente la membrana plasmatica. Pertanto, l'assorbimento cellulare di questi agenti attraverso l'internalizzazione mediata da anticorpi aumenta notevolmente i loro effetti citotossici.

Duocarmicine

[00199] CC-1065 (si veda 4,169,888) e duocarmicine sono membri di una famiglia di antibiotici antitumorali utilizzati negli ADC. Questi antibiotici sembrano operare attraverso il DNA alchilante

selettivamente per sequenza all'N3 di adenina nel solco minore, che avvia una cascata di eventi che provocano l'apoptosi.

[00200] Membri importanti delle duocarmicine includono la duocarmicina A (brevetto statunitense n. 4,923,990) e la duocarmicina SA (brevetto statunitense n. 5,101,038), e un gran numero di analoghi come descritto nei brevetti statunitensi n. 7,517,903; 7,691,962; 5,101,038; 5,641,780; 5,187,186; 5,070,092; 5,070,092; 5,641,780; 5,101,038; 5,084,468; 5,475,092; 5,585,499; 5,846,545; WO2007/089149; WO2009/017394A1; 5,703,080; 6,989,452; 7,087,600; 7,129,261; 7,498,302; e 7,507,420.

Altri agenti citotossici

[00201] Altri agenti antitumorali che possono essere coniugati agli anticorpi dell'invenzione includono BCNU, streptozocina, vincristina e 5-fluorouracile, la famiglia di agenti noti collettivamente come complesso LL-E33288 descritto nel brevetto statunitense n. 5,053,394 e 5,770,710, ed esperamicine (brevetto statunitense n. 5,877,296).

[00202] Le tossine e i frammenti enzimaticamente attivi che possono essere utilizzati includono la catena di difterite A, frammenti attivi non leganti della tossina difterica, la catena di esotossina A (da *Pseudomonas aeruginosa*), la catena di ricina A, la catena di abrina A, la catena di modeccina A, alfa-sarcina, proteine *Aleurites fordii*, proteine diantine, proteine *Phytolacca americana* (PAPI, PAPII e PAP-S), inibitore di *momordica charantia*, curcina, crotina, inibitore di *sapaonaria officinalis*, gelonina, mitogellina, restrictocina, fenomicina, enomicina e i

tricoteceni. Si veda, ad esempio, WO 93/21232 pubblicato il 28 ottobre 1993.

[00203] La presente invenzione contempla inoltre un ADC formato tra un anticorpo e un composto con attività nucleolitica (ad esempio, una ribonucleasi o una endonucleasi del DNA come una desossiribonucleasi, DNasi).

[00204] Per la distruzione selettiva del tumore, l'anticorpo può comprendere un atomo altamente radioattivo. Sono disponibili diversi isotopi radioattivi per la produzione di anticorpi radioconiugati. Gli esempi includono At211, 1131, 1125, Y90, Re186, Re188, Sm153, Bi212, P32, Pb212 e isotopi radioattivi di Lu.

[00205] I radiomarcatori o i marcatori di altro tipo possono essere incorporati nel coniugato in modi noti. Ad esempio, il peptide può essere biosintetizzato o può essere sintetizzato mediante sintesi chimica degli amminoacidi usando precursori idonei degli amminoacidi che implicano, ad esempio, fluorina-19 al posto di idrogeno. Marcatori come Tc99m o 1123, Re186, Re188 e In111 possono essere attaccati tramite un residuo di cisteina nel peptide. Ittrio-90 può essere attaccati mediante un residuo di lisina. Il metodo IODOGEN (Fraker et al (1978) Biochem. Biophys. Res. Commun. 80: 49-57 può essere usato per incorporare Iodio-123. "Monoclonal Antibodies in Immunoscintigraphy" (Chatal, CRC Press 1989) descrive altri metodi in dettaglio.

[00206] Per composizioni comprendenti una pluralità di anticorpi, il carico del farmaco è rappresentato da p , il numero medio di

molecole di farmaco per anticorpo. Il carico del farmaco può variare da 1 a 20 farmaci (D) per anticorpo. Il numero medio di farmaci per anticorpo in preparazione delle reazioni di coniugazione può essere caratterizzato mediante mezzi convenzionali come la spettrometria di massa, il saggio ELISA e HPLC. Può anche essere determinata la distribuzione quantitativa di coniugati anticorpo-farmaco in termini di p.

[00207] In alcuni casi, separazione, purificazione e caratterizzazione di coniugati anticorpo-farmaco omogenei in cui p è un valore certo da coniugati anticorpo-farmaco con altri carichi di farmaci possono essere ottenute mediante mezzi come HPLC in fase inversa o elettroforesi. In forme di realizzazione esemplificative, p è 2, 3, 4, 5, 6, 7 o 8 o una sua frazione.

[00208] La generazione di composti coniugati anticorpo-farmaco può essere ottenuta con qualsiasi tecnica nota ai tecnici del ramo. In breve, i composti coniugati anticorpo-farmaco possono includere un anticorpo anti-CD38 come unità anticorpale, un farmaco e opzionalmente un linker che unisce il farmaco e l'agente legante.

[00209] Sono disponibili numerose reazioni per il legame covalente di farmaci e/o linker ad agenti leganti. Ciò può essere ottenuto mediante reazione dei residui amminoacidici dell'agente legante, ad esempio, la molecola anticorpale, compresi i gruppi amminici di lisina, i gruppi acidi carbossilici liberi dell'acido glutammico e aspartico, i gruppi solfidrilici di cisteina e le varie porzioni degli amminoacidi aromatici. Un metodo non specifico comunemente usato

di attacco covalente è la reazione carbodiimmide per legare un gruppo carbossilico (o amminico) di un composto a gruppi amminici (o carbossilici) dell'anticorpo. Inoltre, agenti bifunzionali come dialdeidi o imidoesteri sono stati usati per legare il gruppo amminico di un composto a gruppi amminici di una molecola anticorpale.

[00210] È inoltre disponibile per l'attacco di farmaci ad agenti leganti la reazione di base di Schiff. Questo metodo comporta l'ossidazione con periodato di un farmaco che contiene gruppi glicole o idrossi, formando in tal modo un'aldeide che è quindi fatta reagire con l'agente legante. L'attacco avviene tramite la formazione di una base di Schiff con gruppi amminici dell'agente legante. Gli isotiocianati possono anche essere usati come agenti di accoppiamento per attaccare in modo covalente farmaci ad agenti leganti. Altre tecniche sono note al tecnico del ramo esperto e rientrano nella portata della presente invenzione.

[00211] In alcune forme di realizzazione, un intermedio, che è il precursore del linker, viene fatto reagire con il farmaco in condizioni appropriate. In altre forme di realizzazione, gruppi reattivi sono usati sul farmaco e/o sull'intermedio. Il prodotto della reazione tra il farmaco e l'intermedio, o il farmaco derivatizzato, viene successivamente fatto reagire con un anticorpo anti-CD38 dell'invenzione in condizioni appropriate.

[00212] Si comprenderà che possono essere apportate anche modifiche chimiche al composto desiderato al fine di rendere le reazioni

di quel composto più convenienti ai fini della preparazione dei coniugati dell'invenzione. Ad esempio, un gruppo funzionale, ad esempio ammina, idrossile o solfidrile, può essere aggiunto al farmaco in una posizione che ha un effetto minimo o accettabile sull'attività o altre proprietà del farmaco.

Unità linker

[00213] Tipicamente, i composti coniugati anticorpo-farmaco comprendono una unità Linker tra l'unità di farmaco e l'unità di anticorpo. In alcune forme di realizzazione, il linker è scindibile in condizioni intracellulari o extracellulari, in modo tale che la scissione del linker liberi l'unità di farmaco dall'anticorpo nell'ambiente appropriato. Per esempio, i tumori solidi che secernono determinate proteasi possono servire come bersaglio del linker scindibile; in altre forme di realizzazione, sono le proteasi intracellulari a essere utilizzate. In ancora altre forme di realizzazione, l'unità linker non è scindibile e il farmaco viene rilasciato, ad esempio, dalla degradazione degli anticorpi nei lisosomi.

[00214] In alcune forme di realizzazione, il linker è scindibile da un agente di scissione presente nell'ambiente intracellulare (per esempio, all'interno di un lisosoma o endosoma o caveolea). Il linker può essere, ad esempio, un linker peptidile che viene scisso da una peptidasi intracellulare o da un enzima della proteasi, inclusa, ma non limitata a, una proteasi lisosomiale o endosomiale. In alcune forme di

realizzazione, il linker peptidile è lungo almeno due amminoacidi o lungo almeno tre amminoacidi o più.

[00215] Gli agenti di scissione possono includere, senza limitazione, le catepsine B e D e la plasmina, tutti noti per idrolizzare derivati di farmaco dipeptidici con conseguente rilascio di farmaco attivo all'interno delle cellule bersaglio (si veda, ad esempio, Dubowchik e Walker, 1999, Pharm. Therapeutics 83:67-123). I linker peptidile sono scindibili dagli enzimi presenti nelle cellule che esprimono CD38. Ad esempio, può essere utilizzato un linker peptidile scindibile dalla proteasi tiolo-dipendente catepsina-B, che è altamente espressa nel tessuto canceroso (ad esempio, un linker Phe-Leu o Gly-Phe-Leu-Gly (SEQ ID NO: X)). Altri esempi di tali linker sono descritti, ad esempio, nel brevetto statunitense n. 6,214,345.

[00216] In alcune forme di realizzazione, il linker peptidile scindibile da una proteasi intracellulare è un linker Val-Cit o un linker Phe-Lys (si veda, ad esempio, brevetto statunitense No. 6,214,345, che descrive la sintesi di doxorubicina con il linker val-cit).

[00217] In altre forme di realizzazione, il linker scindibile è sensibile al pH, ovvero sensibile all'idrolisi a determinati valori di pH. Tipicamente, il linker pH-sensibile è idrolizzabile in condizioni acide. Ad esempio, può essere usato un linker acido-labile idrolizzabile nel lisosoma (ad esempio, un idrazone, semicarbazone, tiosemicarbazone, ammido cis-acetonico, ortoestere, acetale, chetale o simili). (Si vedano, ad esempio, i brevetti statunitensi n. 5,122,368; 5,824,805; 5,622,929;

Dubowchik e Walker, 1999, *Pharm. Therapeutics* 83:67-123; Neville et al., 1989, *Biol. Chem.* 264:14653-14661.) Tali linker sono relativamente stabili in condizioni di pH neutro, come quelle nel sangue, ma sono instabili a pH inferiore a 5,5 o 5,0, il pH approssimativo del lisosoma. In alcune forme di realizzazione, il linker idrolizzabile è un linker tioetere (come, ad esempio, un tioetere attaccato all'agente terapeutico attraverso un legame acilidrazione (si veda, ad esempio, il brevetto statunitense n. 5,622,929).

[00218] In ancora altre forme di realizzazione, il linker è scindibile in condizioni riducenti (ad esempio, un linker disolfuro). Nell'arte sono noti diversi linker disolfuro, inclusi, ad esempio, quelli che possono essere formati usando SATA (N-succinimidil-5-acetiltioacetato), SPDP (N-succinimidil-3-(2-piridilditio)propionato), SPDB (N-succinimidil-3-(2-piridilditio)butirrato) e SMPT (N-succinimidil-ossicarbonil-alfa-metil-alfa-(2-piridil-ditio)toluene)-, SPDB e SMPT. (Si veda, ad esempio, Thorpe et al., 1987, *Cancer Res.* 47:5924-5931; Wawrzynczak et al., In *Immunoconjugates: Antibody Conjugates in Radioimagery and Therapy of Cancer* (C. W. Vogel ed., Oxford U. Press, 1987. Si veda anche il brevetto statunitense n. 4,880,935.)

[00219] In altre forme di realizzazione, il linker è un linker malonato (Johnson et al., 1995, *Anticancer Res.* 15:1387-93), un linker maleimidobenzoile (Lau et al., 1995, *Bioorg-Med-Chem.* 3(10):1299-

1304) o un analogo 3'-N-ammido (Lau et al., 1995, Bioorg-Med-Chem. 3(10):1305-12).

[00220] In ancora altre forme di realizzazione, l'unità linker non è scindibile e il farmaco viene rilasciato dalla degradazione degli anticorpi. (Si veda la pubblicazione statunitense n. 2005/0238649).

[00221] In molte forme di realizzazione, il linker è autoimmolativo. Come qui usato, il termine "distanziatore autoimmolativo" si riferisce a una porzione chimica bifunzionale che è in grado di legare covalentemente due porzioni chimiche distanziate in una molecola tripartita stabile. Si separerà spontaneamente dal secondo gruppo funzionale chimico se il suo legame al primo gruppo funzionale è scisso. Si vedano, ad esempio, WO 2007059404A2; WO06110476A2; WO05112919A2; WO2010/062171; WO09/017394; WO07/089149; WO 07/018431; WO04/043493 e WO02/083180, che sono diretti contro coniugati farmaco-substrati scindibili, dove il farmaco e il substrato scindibile sono opzionalmente legati attraverso un linker autoimmolativo.

[00222] Spesso il linker non è sostanzialmente sensibile all'ambiente extracellulare. Come qui usato, "non sostanzialmente sensibile all'ambiente extracellulare", nel contesto di un linker, significa che non più del 20%, 15%, 10%, 5%, 3% o non più dell'1% circa dei linker, in un campione di composto coniugato anticorpo-farmaco, viene scisso quando il composto coniugato anticorpo-farmaco si presenta in un ambiente extracellulare (ad esempio, nel plasma).

[00223] Se un linker non è sostanzialmente sensibile all'ambiente extracellulare può essere determinato, ad esempio, incubando con plasma il composto coniugato anticorpo-farmaco per un periodo di tempo predeterminato (ad esempio, 2, 4, 8, 16 o 24 ore) e quindi quantificando la quantità di farmaco libero presente nel plasma.

[00224] In altre forme di realizzazione non mutuamente esclusive, il linker promuove l'internalizzazione cellulare. In determinate forme di realizzazione, il linker promuove l'internalizzazione cellulare quando coniugato all'agente terapeutico (ovvero, nell'ambiente della porzione linker-agente terapeutico del composto coniugato anticorpo-farmaco come descritto qui). In ancora altre forme di realizzazione, il linker promuove l'internalizzazione cellulare quando coniugato sia al composto auristatina sia agli anticorpi anti-CD38 dell'invenzione.

[00225] Una varietà di linker esemplificativi che possono essere utilizzati con le presenti composizioni e metodi sono descritti in WO 2004-010957, pubblicazione statunitense n. 2006/0074008, pubblicazione statunitense n. 20050238649 e pubblicazione statunitense n. 2006/0024317.

Carico del farmaco

[00226] Il carico del farmaco è rappresentato da p ed è il numero medio di porzioni di farmaco per anticorpo in una molecola. Il carico di farmaco ("p") può essere 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o più porzioni (D) per anticorpo, sebbene frequentemente il numero medio sia una frazione o un decimale.

Generalmente, il carico di farmaco da 1 a 4 è spesso utile, ed è utile anche da 1 a 2. Gli ADC dell'invenzione includono raccolte di anticorpi coniugati con una gamma di porzioni di farmaco, da 1 a 20. Il numero medio di porzioni di farmaco per anticorpo in preparati di ADC da reazioni di coniugazione può essere caratterizzato da mezzi convenzionali come spettroscopia di massa e saggio ELISA.

[00227] Può anche essere determinata la distribuzione quantitativa di ADC in termini di p . In alcuni casi, separazione, purificazione e caratterizzazione di ADC omogenei in cui p è un valore certo da ADC con altri carichi di farmaci possono essere ottenute mediante mezzi come l'elettroforesi.

[00228] Per alcuni coniugati anticorpo-farmaco, p può essere limitato dal numero di siti di attacco sull'anticorpo. Ad esempio, quando l'attacco è un tiolo cisteina, come nelle forme di realizzazione sopra riportate, un anticorpo può avere solo uno o più gruppi tiolo cisteina, oppure può avere solo uno o più gruppi tiolici sufficientemente reattivi attraverso i quali può essere attaccato un linker. In alcune forme di realizzazione, un più elevato carico di farmaco, ad esempio $p > 5$, può causare aggregazione, insolubilità, tossicità o perdita di permeabilità cellulare di alcuni coniugati farmaco-anticorpo. In certe forme di realizzazione, il carico di farmaco per un ADC dell'invenzione varia da 1 a circa 8; da circa 2 a circa 6; da circa 3 a circa 5; da circa 3 a circa 4; da circa 3,1 a circa 3,9; da circa 3,2 a circa 3,8; da circa 3,2 a circa 3,7; da circa 3,2 a circa 3,6; da circa 3,3 a circa 3,8; o da circa 3,3 a circa

3,7. In effetti, è stato dimostrato che per alcuni ADC il rapporto ottimale tra le porzioni di farmaco per anticorpo può essere inferiore a 8 e può essere da circa 2 a circa 5. Si veda US 2005-0238649 A1.

[00229] In alcune forme di realizzazione, meno del massimo teorico di porzioni di farmaco è coniugato ad un anticorpo durante una reazione di coniugazione. Un anticorpo può contenere, ad esempio, residui di lisina che non reagiscono con l'intermedio farmaco-linker o con il reagente del linker, come discusso di seguito. Generalmente, gli anticorpi non contengono molti gruppi tiolo cisteina liberi e reattivi che possono essere legati a una porzione di farmaco; infatti la maggior parte dei residui di tiolo cisteina negli anticorpi esistono come ponti disolfuro. In alcune forme di realizzazione, un anticorpo può essere ridotto con un agente riducente come ditionitrosolo (DTT) o tricarbonilettilfosfina (TCEP), in condizioni di riduzione parziale o totale, per generare gruppi reattivi di tiolo cisteina. In alcune forme di realizzazione, un anticorpo viene sottoposto a condizioni denaturanti per rivelare gruppi nucleofili reattivi come lisina o cisteina.

[00230] Il carico (rapporto farmaco/anticorpo) di un ADC può essere controllato in diversi modi, ad esempio: (i) limitando l'eccesso molare dell'intermedio farmaco-linker o del reagente linker rispetto all'anticorpo, (ii) limitando il tempo o della temperatura di reazione di coniugazione, (iii) condizioni riduttive parziali o limitative per la modifica del tiolo cisteina, (iv) ingegnerizzando mediante tecniche ricombinanti la sequenza amminoacidica dell'anticorpo in modo tale che il numero e la

posizione dei residui di cisteina siano modificati per il controllo del numero e/o della posizione degli attacchi farmaco-linker (come thioMab o thioFab preparati come divulgato qui e in WO2006/034488).

[00231] Si deve comprendere che laddove più di un gruppo nucleofilo reagisca con un reagente intermedio farmaco-linker o linker seguito da un reagente della porzione di farmaco, il prodotto risultante è una miscela di composti ADC con una distribuzione di una o più porzioni di farmaco attaccate ad un anticorpo. Il numero medio di farmaci per anticorpo può essere calcolato dalla miscela mediante un saggio anticorpale ELISA doppio, specifico per l'anticorpo e specifico per il farmaco. Singole molecole di ADC possono essere identificate nella miscela mediante spettroscopia di massa e separate mediante HPLC, ad esempio cromatografia di interazione idrofoba.

[00232] In alcune forme di realizzazione, un ADC omogeneo con un singolo valore di carico può essere isolato dalla miscela di coniugazione mediante elettroforesi o cromatografia.

Metodi di determinazione dell'effetto citotossico degli ADC

[00233] I metodi per determinare se un farmaco o un coniugato anticorpo-farmaco eserciti un effetto citostatico e/o citotossico su una cellula sono noti. In generale, l'attività citotossica o citostatica di un coniugato anticorpo-farmaco può essere misurata mediante: esposizione di cellule di mammifero che esprimono una proteina bersaglio del coniugato anticorpo-farmaco in un terreno di coltura cellulare; coltura delle cellule per un periodo da circa 6 ore a circa 5

giorni; e misurazione della vitalità cellulare. Saggi in vitro basati su cellule possono essere utilizzati per misurare la vitalità (proliferazione), la citotossicità e l'induzione dell'apoptosi (attivazione della caspasi) del coniugato farmaco-anticorpo.

[00234] Per determinare se un coniugato farmaco-anticorpo eserciti un effetto citostatico, può essere usato un dosaggio per incorporazione di timidina. Ad esempio, le cellule tumorali che esprimono un antigene bersaglio a una densità di 5.000 cellule/pozzetto di una piastra da 96 pozzetti possono essere coltivate per un periodo di 72 ore ed esposte a 0,5 µCi di ³H-timidina durante le ultime 8 ore del periodo di 72 ore. L'incorporazione di ³H-timidina in cellule della coltura viene misurata in presenza e assenza del coniugato farmaco-anticorpo.

[00235] Per determinare la citotossicità, possono essere misurati necrosi o apoptosi (morte cellulare programmata). La necrosi è tipicamente accompagnata da una maggiore permeabilità della membrana plasmatica; gonfiore della cellula e rottura della membrana plasmatica. L'apoptosi è tipicamente caratterizzata da blebbing della membrana, condensazione del citoplasma e attivazione delle endonucleasi endogene. La determinazione di uno qualsiasi di questi effetti sulle cellule tumorali indica che un coniugato farmaco-anticorpo è utile nel trattamento del cancro.

[00236] La vitalità cellulare può essere misurata determinando in una cellula l'assorbimento di un colorante come rosso neutro, blu triptano o blu ALAMAR™ (si veda, ad esempio, Page et al., 1993, Intl.

J. Oncology 3:473-476). In tale saggio, le cellule vengono incubate in un terreno contenente il colorante, le cellule vengono lavate e il colorante rimanente, riflettente l'assorbimento cellulare del colorante, viene misurato spettrofotometricamente. Il colorante legante le proteine sulfurodamina B (SRB) può anche essere usato per misurare la citotossicità (Skehan et al., 1990, J. Natl. Cancer Inst. 82:1107-12).

[00237] In alternativa, un sale di tetrazolio, come MTT, viene usato in un saggio colorimetrico quantitativo per la sopravvivenza e la proliferazione di cellule di mammiferi rilevando cellule viventi, ma non morte (si veda, ad esempio, Mosmann, 1983, J. Immunol. Methods 65:55-63).

[00238] L'apoptosi può essere quantificata misurando, ad esempio, la frammentazione del DNA. Sono disponibili metodi fotometrici commerciali per la determinazione quantitativa in vitro della frammentazione del DNA. Esempi di tali saggi, incluso TUNEL (che rileva l'incorporazione di nucleotidi marcati in DNA frammentato) e saggi basati su ELISA, sono descritti in Biochemica, 1999, no. 2, pp. 34-37 (Roche Molecular Biochemicals).

[00239] L'apoptosi può anche essere determinata misurando i cambiamenti morfologici in una cellula. Ad esempio, come con la necrosi, la perdita dell'integrità della membrana plasmatica può essere determinata misurando l'assorbimento di alcuni coloranti (ad esempio, un colorante fluorescente come, ad esempio, l'arancio di acridina o il bromuro di etidio). Un metodo per misurare il numero di cellule

apoptotiche è stato descritto da Duke e Cohen, *Current Protocols in Immunology* (Coligan et al. eds., 1992, pp. 3.17.1-3.17.16). Le cellule possono anche essere marcate con un colorante di DNA (ad es. arancio di acridina, bromuro di etidio o ioduro di propidio) e le cellule osservate per la condensazione e la marginazione della cromatina lungo la membrana nucleare interna. Altri cambiamenti morfologici che possono essere misurati per determinare l'apoptosi includono, ad esempio, condensazione citoplasmatica, aumento del blebbing della membrana e restringimento cellulare.

[00240] La presenza di cellule apoptotiche può essere misurata sia nei compartimenti attaccati sia "fluttuanti" delle colture. Per esempio, entrambi i compartimenti possono essere raccolti rimuovendo il surnatante, tripsinizzando le cellule attaccate, combinando i preparati dopo una fase di lavaggio per centrifugazione (ad esempio, 10 minuti a 2000 rpm) e rilevando l'apoptosi (ad esempio, misurando la frammentazione del DNA). (Si veda, ad esempio, Piazza et al., 1995, *Cancer Research* 55:3110-16).

[00241] *In vivo*, l'effetto di una composizione terapeutica dell'anticorpo anti-CD38 dell'invenzione può essere valutato in un modello animale adatto. Ad esempio, possono essere utilizzati modelli di cancro xenogenico, in cui espianti di cancro o tessuti di xenotrapianti sottoposti a passaggi sono introdotti in animali immunocompromessi, come topi nudi o SCID (Klein et al., 1997, *Nature Medicine* 3: 402-408). L'efficacia può essere misurata usando saggi che misurano l'inibizione

della formazione del tumore, la regressione del tumore o le metastasi e simili.

[00242] Le composizioni terapeutiche usate nella pratica dei metodi precedenti possono essere formulate in composizioni farmaceutiche comprendenti un trasportatore adatto per il metodo di somministrazione desiderato. Supporti adatti includono qualsiasi materiale che, quando combinato con la composizione terapeutica, mantiene la funzione antitumorale della composizione terapeutica ed è generalmente non reattivo con il sistema immunitario del paziente. Gli esempi includono, ma non sono limitati a, diversi trasportatori farmaceutici standard come soluzioni saline tampone fosfato sterili, acqua batteriostatica e simili (si veda, in generale, Remington's Pharmaceutical Sciences 16a edizione, A. Osal., Ed., 1980).

Composizioni anticorpali per la somministrazione in vivo

[00243] Le formulazioni degli anticorpi utilizzati secondo la presente invenzione sono preparate per la conservazione miscelando un anticorpo avente il grado di purezza desiderato con trasportatori, eccipienti o stabilizzatori farmaceuticamente accettabili facoltativi (Remington's Pharmaceutical Sciences 16a edizione, Osol, A. Ed. [1980]), sotto forma di formulazioni liofilizzate o soluzioni acquose. I vettori, gli eccipienti o gli stabilizzatori accettabili non sono tossici per i riceventi ai dosaggi e alle concentrazioni impiegati e includono tamponi come fosfato, citrato e altri acidi organici; antiossidanti incluso acido ascorbico e metionina; conservanti (come cloruro di

ottadecildimetilbenzilammonio, esametonio cloruro, benzalconio cloruro, benzetonio cloruro, fenolo, butile o alcool benzilico, alchil parabeni come metil o propil parabene, catecolo, resorcinolo, cicloesano, 3-pentanol e m-cresolo); polipeptidi a basso peso molecolare (meno di circa 10 residui); proteine, come albumina di siero, gelatina o immunoglobuline; polimeri idrofili come polivinilpirrolidone; amminoacidi come glicina, glutammina, asparagina, istidina, arginina o lisina; monosaccaridi, disaccaridi e altri carboidrati inclusi glucosio, mannosio o destrine; agenti chelanti come EDTA; zuccheri come saccarosio, mannitolo, trealosio o sorbitolo; contro-ioni che formano sale come il sodio; complessi metallici (ad esempio, complessi Zn-proteina); e/o tensioattivi non ionici come TWEEN™, PLURONICS™ o polietilenglicole (PEG).

[00244] La formulazione nel presente documento può anche contenere più di un composto attivo come necessario per la particolare indicazione da trattare, preferibilmente quelli con attività complementari che non si influenzano negativamente l'un l'altro. Ad esempio, potrebbe essere desiderabile fornire anticorpi con altre specificità. In alternativa, o in aggiunta, la composizione può comprendere un agente citotossico, una citochina, un agente inibitore della crescita e/o un antagonista a piccole molecole. Tali molecole sono opportunamente presenti in combinazione in quantità efficaci per lo scopo inteso.

[00245] I principi attivi possono anche essere intrappolati in microcapsule preparate, ad esempio mediante tecniche di

coacervazione o mediante polimerizzazione interfacciale, ad esempio, microcapsule di idrossimetilcellulosa o gelatina e microcapsule di poli(metilmetacilato), rispettivamente, in sistemi di rilascio di farmaci colloidali (ad esempio, liposomi, microsfele di albumina, microemulsioni, nanoparticelle e nanocapsule) o in macroemulsioni. Tali tecniche sono divulgate in Remington's Pharmaceutical Sciences 16a edizione, Osol, A. Ed. (1980).

[00246] Le formulazioni da usare per la somministrazione in vivo dovrebbero essere sterili o quasi. Ciò è facilmente ottenibile mediante filtrazione attraverso membrane di filtrazione sterili.

[00247] Possono essere preparate preparazioni a rilascio prolungato. Esempi adatti di preparazioni a rilascio prolungato comprendono matrici semipermeabili di polimeri idrofobi solidi contenenti l'anticorpo, le quali matrici sono sotto forma di articoli modellati, ad esempio film o microcapsule. Esempi di matrici a rilascio prolungato includono poliesteri, idrogel (ad esempio, poli(2-idrossietilmetacrilato) o poli(vinilalcol)), polilattidi (brevetto statunitense n. 3,773,919), copolimeri di acido L-glutammico e gamma etil-L-glutammato, etilene-vinil acetato non degradabile, copolimeri dell'acido lattico-acido glicolico degradabili come LUPRON DEPOT™ (microsfele iniettabili composte da copolimero acido lattico-acido glicolico e acetato di leuprolide) e acido poli-D-(-)-3-idrossibutirrico. Mentre polimeri come etilene-vinilacetato e acido lattico-acido glicolico permettono il rilascio di

molecole per oltre 100 giorni, alcuni idrogel rilasciano proteine per periodi di tempo più brevi.

[00248] Quando gli anticorpi incapsulati rimangono nel corpo per un lungo periodo, possono denaturare o aggregarsi a seguito di esposizione a umidità a 37 °C, con conseguente perdita di attività biologica e possibili cambiamenti nell'immunogenicità. Strategie razionali possono essere ideate per la stabilizzazione a seconda del meccanismo coinvolto. Ad esempio, se si scopre che il meccanismo di aggregazione è la formazione di legami S--S intermolecolari attraverso l'interscambio tio-disolfuro, la stabilizzazione può essere ottenuta modificando i residui solfidrilici, liofilizzando da soluzioni acide, controllando il contenuto di umidità, utilizzando additivi appropriati e sviluppando composizioni a matrice polimerica specifiche.

Modalità di somministrazione

[00249] Gli anticorpi e gli agenti chemioterapici dell'invenzione sono somministrati a un soggetto, in accordo con metodi noti, come la somministrazione endovenosa come un bolo o mediante infusione continua per un periodo di tempo, per via intramuscolare, intraperitoneale, intracerebrospinale, sottocutanea, intra-articolare, intrasinoviale, intratecale, orale, topica o inalatoria. È preferita la somministrazione endovenosa o sottocutanea dell'anticorpo.

Modalità di trattamento

[00250] Nei metodi della divulgazione, la terapia viene utilizzata per fornire una risposta terapeutica positiva rispetto a una malattia o

condizione. Per "risposta terapeutica positiva" si intende un miglioramento della malattia o condizione e/o un miglioramento dei sintomi associati alla malattia o condizione. Ad esempio, una risposta terapeutica positiva farebbe riferimento a uno o più dei seguenti miglioramenti nella malattia: (1) una riduzione del numero di cellule neoplastiche; (2) un aumento della morte delle cellule neoplastiche; (3) inibizione della sopravvivenza delle cellule neoplastiche; (5) inibizione (cioè, rallentamento in una certa misura, preferibilmente arresto) della crescita del tumore; (6) un aumento del tasso di sopravvivenza del paziente; e (7) un certo sollievo da uno o più sintomi associati alla malattia o condizione.

[00251] Le risposte terapeutiche positive in ogni malattia o condizione determinata possono essere determinate da criteri di risposta standardizzati specifici per tale malattia o condizione. La risposta tumorale può essere valutata in relazione ai cambiamenti nella morfologia del tumore (ad esempio, carico tumorale complessivo, dimensioni del tumore e simili) utilizzando tecniche di screening come risonanza magnetica (MRI), imaging radiografico, tomografia computerizzata (TC), scintigrafia ossea, endoscopia e biopsia tumorale tra cui l'aspirazione del midollo osseo (BMA) e il conteggio delle cellule tumorali in circolazione.

[00252] Oltre a queste risposte terapeutiche positive, il soggetto sottoposto a terapia può sperimentare l'effetto benefico di un miglioramento dei sintomi associati alla malattia.

[00253] Quindi, per i tumori a cellule B, il soggetto può sperimentare una diminuzione dei cosiddetti sintomi B, cioè sudorazione notturna, febbre, perdita di peso e/o orticaria. Per le condizioni pre-maligne, la terapia con un agente terapeutico anti-CD38 può bloccare e/o prolungare il tempo prima dello sviluppo di una condizione maligna correlata, ad esempio lo sviluppo di mieloma multiplo in soggetti affetti da gammopatia monoclonale di significato indeterminato (MGUS).

[00254] Un miglioramento della malattia può essere caratterizzato come una risposta completa. Per "risposta completa" si intende un'assenza di malattia clinicamente rilevabile con la normalizzazione di eventuali studi radiografici, midollo osseo e liquido cerebrospinale (CSF) precedentemente anomali o proteina monoclonale precedentemente anomala nel caso di mieloma.

[00255] Tale risposta può persistere per almeno da 4 a 8 settimane, o talvolta da 6 a 8 settimane, dopo il trattamento secondo i metodi della divulgazione. In alternativa, un miglioramento della malattia può essere caratterizzato come risposta parziale. Per "risposta parziale" si intende almeno una riduzione del 50% di tutto il carico tumorale misurabile (ovvero, il numero di cellule maligne presenti nel soggetto, o la quantità misurata di masse tumorali o la quantità di proteina monoclonale anomala) in assenza di nuove lesioni, che possono persistere per 4-8 settimane o 6-8 settimane.

[00256] Il trattamento secondo la presente invenzione include una "quantità terapeuticamente efficace" dei medicinali usati. Una "quantità terapeuticamente efficace" si riferisce ad una quantità efficace, a dosaggi e per periodi di tempo necessari, per ottenere un risultato terapeutico desiderato.

[00257] Una quantità terapeuticamente efficace può variare in base a fattori come lo stato della malattia, l'età, il sesso e il peso dell'individuo, e la capacità dei farmaci di suscitare una risposta desiderata nell'individuo. Una quantità terapeuticamente efficace è anche quella in cui qualsiasi effetto tossico o dannoso della porzione di anticorpo o dell'anticorpo è controbilanciato dagli effetti terapeuticamente benefici.

[00258] Una "quantità terapeuticamente efficace" per la terapia antitumorale può anche essere misurata dalla sua capacità di stabilizzare la progressione della malattia. La capacità di un composto di inibire il cancro può essere valutata in un sistema di modello animale predittivo di efficacia nei tumori umani.

[00259] In alternativa, questa proprietà di una composizione può essere valutata esaminando la capacità del composto di inibire la crescita cellulare o di indurre l'apoptosi mediante saggi in vitro noti ai tecnici del ramo. Una quantità terapeuticamente efficace di un composto terapeutico può ridurre la dimensione del tumore, o altrimenti migliorare i sintomi in un soggetto. Un tecnico del ramo sarebbe in grado di determinare tali quantità sulla base di fattori quali la

corporatura del soggetto, la gravità dei sintomi del soggetto e la particolare composizione o via di somministrazione selezionata.

[00260] I regimi di dosaggio vengono regolati per fornire la risposta ottimale desiderata (ad esempio, una risposta terapeutica). Ad esempio, può essere somministrato un singolo bolo, possono essere somministrate diverse dosi divise nel tempo o la dose può essere proporzionalmente ridotta o aumentata come indicato dalle esigenze della situazione terapeutica. Le composizioni parenterali possono essere formulate sotto forma di unità di dosaggio per facilitare la somministrazione e l'uniformità del dosaggio. La forma di dosaggio unitaria come qui usata si riferisce a unità fisicamente distinte adatte come dosaggi unitari per i soggetti da trattare; ogni unità contiene una quantità predeterminata di principio attivo calcolata per produrre l'effetto terapeutico desiderato in associazione con il trasportatore farmaceutico richiesto.

[00261] Le specifiche per le forme di unità di dosaggio della presente invenzione sono dettate e direttamente dipendenti da (a) le caratteristiche uniche del principio attivo e il particolare effetto terapeutico da raggiungere, e (b) le limitazioni inerenti la tecnica di preparazione di un composto con tale principio attivo per il trattamento della sensibilità negli individui.

[00262] I dosaggi efficienti e i regimi di dosaggio per gli anticorpi anti-CD38 usati nella presente invenzione dipendono dalla

malattia o condizione da trattare e possono essere determinati dai tecnici del ramo.

[00263] Un intervallo esemplificativo e non limitante per una quantità terapeuticamente efficace di un anticorpo anti-CD38 usato nella presente invenzione è di circa 0,1-100 mg/kg, ad esempio circa 0,1-50 mg/kg, ad esempio circa 0,1-20 mg/kg, ad esempio circa 0,1-10 mg/kg, ad esempio circa 0,5, ad esempio circa 0,3, circa 1 o circa 3 mg/kg. In un'altra forma di realizzazione, l'anticorpo viene somministrato in una dose di 1 mg/kg o più, come una dose da 1 a 20 mg/kg, ad esempio una dose da 5 a 20 mg/kg, ad esempio una dose di 8 mg/kg.

[00264] Un professionista del settore medico di ordinaria esperienza può facilmente determinare e prescrivere la quantità efficace della composizione farmaceutica richiesta. Ad esempio, un medico o un veterinario potrebbe iniziare a dosare il medicinale impiegato nella composizione farmaceutica a livelli inferiori a quelli richiesti per ottenere l'effetto terapeutico desiderato e aumentare gradualmente il dosaggio fino a ottenere l'effetto desiderato.

[00265] In una forma di realizzazione, l'anticorpo anti-CD38 viene somministrato per infusione in un dosaggio settimanale da 10 a 500 mg/kg, come ad esempio da 200 a 400 mg/kg. Tale somministrazione può essere ripetuta, ad es. da 1 a 8 volte, ad esempio da 3 a 5 volte. La somministrazione può essere eseguita

mediante infusione continua per un periodo da 2 a 24 ore, ad esempio da 2 a 12 ore.

[00266] In una forma di realizzazione, l'anticorpo anti-CD38 viene somministrato mediante infusione continua lenta per un lungo periodo, ad esempio più di 24 ore, se necessario per ridurre gli effetti indesiderati inclusa la tossicità.

[00267] In una forma di realizzazione l'anticorpo anti-CD38 viene somministrato in un dosaggio settimanale da 250 mg a 2000 mg, come ad esempio 300 mg, 500 mg, 700 mg, 1000 mg, 1500 mg o 2000 mg, fino a 8 volte, ad esempio da 4 a 6 volte. La somministrazione può essere eseguita mediante infusione continua per un periodo da 2 a 24 ore, ad esempio da 2 a 12 ore. Tale regime può essere ripetuto una o più volte se necessario, ad esempio dopo 6 mesi o 12 mesi. Il dosaggio può essere determinato o regolato misurando la quantità di composto della presente invenzione nel sangue dopo la somministrazione, ad esempio prelevando un campione biologico e usando anticorpi anti-idiotipici che mirano la regione legante antigene dell'anticorpo anti-CD38.

[00268] In un'ulteriore forma di realizzazione, l'anticorpo anti-CD38 viene somministrato una volta alla settimana per 2-12 settimane, ad esempio da 3 a 10 settimane, ad esempio da 4 a 8 settimane.

[00269] In una forma di realizzazione, l'anticorpo anti-CD38 viene somministrato mediante terapia di mantenimento, come, ad esempio, una volta alla settimana per un periodo di 6 mesi o più.

[00270] In una forma di realizzazione, l'anticorpo anti-CD38 viene somministrato mediante un regime che include un'infusione di un anticorpo anti-CD38 seguita da un'infusione di un anticorpo anti-CD38 coniugato a un radioisotopo. Il regime può essere ripetuto, ad esempio da 7 a 9 giorni dopo.

[00271] Come esempi non limitativi, il trattamento secondo la presente invenzione può essere fornito come dosaggio giornaliero di un anticorpo in una quantità di circa 0,1-100 mg/kg, come ad esempio 0,5, 0,9, 1,0, 1,1, 1,5, 2. , 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27 , 28, 29, 30, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90 o 100 mg/kg, al giorno, in almeno uno dei giorni 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 , 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33 , 34, 35, 36, 37, 38, 39, o 40, o in alternativa, almeno uno della settimana 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 dopo l'inizio del trattamento, o qualsiasi loro combinazione, usando dosi singole o divise di ogni 24, 12, 8, 6, 4 o 2 ore, o qualsiasi combinazione di queste.

[00272] In alcune forme di realizzazione la molecola anticorpale anti-CD38 è usata in combinazione con uno o più agenti terapeutici aggiuntivi, ad esempio un agente chemioterapico. Esempi non limitativi di agenti chemioterapici che danneggiano il DNA includono inibitori della topoisomerasi I (ad esempio irinotecan, topotecan, camptotecina e loro analoghi o metaboliti e doxorubicina); inibitori della topoisomerasi II (ad esempio, etoposide, teniposide e daunorubicina); agenti alchilanti

(ad esempio, melfalan, clorambucile, busulfan, tiotepa, ifosfamide, carmustina, lomustina, semustina, streptozocina, decarbazina, metotrexato, mitomicina C e ciclofosfamide); intercalatori di DNA (ad esempio, cisplatino, oxaliplatino e carboplatino); intercalatori di DNA e generatori di radicali liberi come bleomicina; e mimetici nucleosidici (ad esempio, 5-fluorouracile, capecitabina, gemcitabina, fludarabina, citarabina, mercaptopurina, tioguanina, pentostatina e idrossiurea).

[00273] Gli agenti chemioterapici che interrompono la replicazione cellulare includono: paclitaxel, docetaxel e analoghi correlati; vincristina, vinblastina e analoghi correlati; talidomide, lenalidomide e analoghi correlati (ad esempio, CC-5013 e CC-4047); inibitori della tirosin-chinasi proteica (ad esempio, imatinib mesilato e gefitinib); inibitori dei proteasomi (ad esempio, bortezomib); inibitori di NF-KB, inclusi inibitori della I κ B chinasi; anticorpi che si legano a proteine sovraesprese nel cancro e che quindi sottoregolano la replicazione cellulare (ad esempio, trastuzumab, rituximab, cetuximab e bevacizumab); e altri inibitori di proteine o enzimi noti per essere sovraregolati, sovraespressi o attivati nei tumori, la cui inibizione sottoregola la replicazione cellulare.

[00274] In alcune forme di realizzazione, gli anticorpi dell'invenzione possono essere usati prima, in concomitanza con o dopo il trattamento con Velcade® (bortezomib).

[00275] *Usi diagnostici*

[00276] Gli anticorpi anti-CD38 forniti trovano anche impiego nell'imaging *in vitro* o *in vivo* di tumori o altri stati patologici associati alla CD38. In alcune forme di realizzazione, gli anticorpi descritti qui sono usati sia per la diagnosi e il trattamento sia per la sola diagnosi. Quando gli anticorpi anti-CD38 sono utilizzati sia per la diagnosi sia per il trattamento, alcune forme di realizzazione si basano su due diversi anticorpi anti-CD38 su due epitopi diversi, in modo tale che l'anticorpo diagnostico non sia in competizione per il legame con l'anticorpo terapeutico, sebbene in alcuni casi lo stesso anticorpo possa essere usato per entrambi. Ad esempio, in alcuni casi, l'anticorpo Ab19 viene usato diagnosticamente (generalmente marcato come discusso di seguito), mentre Ab79 viene usato terapeuticamente, o viceversa. Pertanto, sono incluse nell'invenzione composizioni comprendenti un anticorpo diagnostico e un anticorpo terapeutico, e in alcune forme di realizzazione, l'anticorpo diagnostico è marcato come descritto qui. Inoltre, la composizione degli anticorpi terapeutici e diagnostici può anche essere co-somministrata con altri farmaci come delineato nel presente documento.

[00277] In molte forme di realizzazione, un anticorpo diagnostico è marcato. Con "marcato" qui si intende che gli anticorpi qui divulgati hanno uno o più elementi, isotopi o composti chimici attaccati per consentire il rilevamento durante una procedura di screening o diagnostica. In generale, i marcatori rientrano in diverse classi: a) marcatori immunitari, che possono essere un epitopo incorporato come

partner di fusione riconosciuto da un anticorpo, b) marcatori isotopici, che possono essere isotopi radioattivi o pesanti, c) marcatori di piccole molecole, che possono includere coloranti fluorescenti e colorimetrici, o molecole come la biotina che consentono altri metodi di marcatura, e d) marcatori come particelle (comprese bolle per la marcatura ad ultrasuoni) o marcatori paramagnetici che consentono l'acquisizione di imaging del corpo. I marcatori possono essere incorporati negli anticorpi in qualsiasi posizione e possono essere incorporati in vitro o in vivo durante l'espressione della proteina, come è noto nell'arte.

[00278] La diagnosi può essere eseguita sia in vivo, mediante la somministrazione di un anticorpo diagnostico che consente l'imaging total body come descritto di seguito, sia in vitro, su campioni prelevati da un paziente. "Campione" in questo contesto include un numero qualsiasi di elementi, inclusi, ma non limitati a, fluidi corporei (inclusi, ma non limitati a, sangue, urina, siero, linfonodo, saliva, secrezioni anali e vaginali, sudore e sperma), così come campioni di tessuto come risultato di biopsie di tessuti rilevanti.

[00279] In alcune forme di realizzazione, viene eseguita l'imaging *in vivo*, inclusi ma non limitati a ultrasuoni, scansioni TC, radiografie, risonanze magnetiche e PET, nonché tecniche ottiche, come quelle che utilizzano marcatori ottici per tumori vicino alla superficie del corpo.

[00280] L'imaging *in vivo* di tumori associati alla CD38 può essere eseguito con qualsiasi tecnica adatta. Ad esempio, la marcatura

^{99}Tc o con un altro isotopo emettitore di raggi beta può essere utilizzata per marcare gli anticorpi anti-CD38. Variazioni di questa tecnica possono includere l'uso della risonanza magnetica (MRI) per migliorare l'imaging rispetto alle tecniche con raggi gamma. Metodi e principi di immunoscintigrafia simili sono descritti, ad esempio, in Srivastava (ed.), *Radiolabeled Monoclonal Antibodies For Imaging And Therapy* (Plenum Press 1988), Chase, "Medical Applications of Radioisotopes," in *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 18a edizione, Gennaro et al., (eds.), pp. 624-652 (Mack Publishing Co., 1990) e Brown, "Clinical Use of Monoclonal Antibodies," in *Biotechnology And Pharmacy* 227-49, Pezzuto et al., (eds.) (Chapman & Hall 1993).

[00281] In una forma di realizzazione, la presente divulgazione fornisce un metodo di imaging *in vivo* in cui un anticorpo anti-CD38 è coniugato ad un agente promotore del rilevamento, l'anticorpo coniugato è somministrato ad un ospite, come ad esempio per iniezione nel flusso sanguigno, e vengono analizzate la presenza e la posizione dell'anticorpo marcato nell'ospite. Attraverso questa tecnica e qualsiasi altro metodo diagnostico qui fornito, la presente invenzione fornisce un metodo per lo screening per la presenza di cellule correlate alla malattia in un paziente umano o un campione biologico prelevato da un paziente umano.

[00282] Per l'imaging diagnostico, i radioisotopi possono essere legati a un anticorpo anti-CD38 direttamente o indirettamente utilizzando un gruppo funzionale intermedio. Gruppi funzionali intermedi

utili includono chelanti, come acido etilendiamminotetraacetico e acido dietilentriamminopentaacetico (si veda ad esempio il brevetto statunitense n. 5,057,313). In tali saggi diagnostici che coinvolgono anticorpi anti-CD38 coniugati con radioisotopi, il dosaggio dell'anticorpo anti-CD38 coniugato somministrato al paziente è tipicamente mantenuto al livello più basso possibile attraverso la scelta dell'isotopo per la migliore combinazione di emivita minima, ritenzione minima nel corpo e quantità minima di isotopo, che consentirà il rilevamento e la misurazione accurata.

[00283] Oltre ai radioisotopi e agli agenti radiopachi, i metodi diagnostici possono essere eseguiti utilizzando anticorpi anti-CD38 coniugati a coloranti (come nel complesso biotina-streptavidina), mezzi di contrasto, composti o molecole fluorescenti e agenti enhancer (ad esempio, ioni paramagnetici) per la risonanza magnetica (MRI) (si veda, ad esempio, il brevetto statunitense n. 6,331,175, che descrive le tecniche di MRI e la preparazione di anticorpi coniugati con un agente enhancer per MRI). Tali agenti diagnostici/rivelatori possono essere scelti dagli agenti per l'uso nella risonanza magnetica e composti fluorescenti.

[00284] Per caricare un anticorpo anti-CD38 con metalli radioattivi o ioni paramagnetici, può essere necessario farlo reagire con un reagente con una coda lunga a cui sono attaccati diversi gruppi chelanti per legare gli ioni. Tale coda può essere un polimero come polilisina, polisaccaride o altra catena derivatizzata o derivatizzabile

avente gruppi pendenti a cui possono essere legati gruppi chelanti quali, ad esempio, porfirine, poliammine, eteri corona, bistiososemicarbazoni, poliolessimi e gruppi simili noti essere utili per questo scopo.

[00285] I chelati possono essere accoppiati ad anticorpi anti-CD38 usando sostanze chimiche standard. Un chelato è normalmente collegato a un anticorpo anti-CD38 da un gruppo che consente la formazione di un legame con la molecola con una perdita minima di immunoreattività e aggregazione e/o reticolazione interna minime.

[00286] Esempi di combinazioni metallo-chelato potenzialmente utili includono 2-benzil-DTPA e i suoi analoghi monometilici e cicloesilici, usati con isotopi diagnostici nell'intervallo di energia generale da 60 a 4.000 keV, come ^{125}I , ^{123}I , ^{124}I , ^{62}Cu , ^{64}Cu , ^{18}F , ^{111}In , ^{67}Ga , ^{99}Tc , ^{94}Tc , ^{11}C , ^{13}N , ^5O e ^{76}Br , per il radio-imaging.

[00287] I marcatori includono un radionuclide, un mezzo di contrasto radiologico, uno ione paramagnetico, un metallo, un marcatore fluorescente, un marcatore chemiluminescente, un mezzo di contrasto ecografico e un agente fotoattivo. Tali agenti diagnostici sono ben noti e può essere usato qualsiasi agente diagnostico noto. Esempi non limitativi di agenti diagnostici possono includere un radionuclide come ^{110}In , ^{111}In , ^{177}Lu , ^{18}F , ^{52}Fe , ^{62}Cu , ^{64}Cu , ^{67}Cu , ^{67}Ga , ^{68}Ga , ^{86}Y , ^{90}Y , ^{89}Zr , $^{94\text{m}}\text{Tc}$, ^{94}Tc , $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{120}I , ^{123}I , ^{124}I , ^{125}I , ^{131}I , $^{154-158}\text{Gd}$, ^{32}P , ^{11}C , ^{13}N , ^{15}O , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{51}Mn , $^{52\text{m}}\text{Mn}$, ^{55}Co , ^{72}As , ^{75}Br , ^{76}Br , $^{82\text{m}}\text{Rb}$, ^{83}Sr , o altri emettitori di γ , β o positroni.

[00288] Ioni paramagnetici di utilizzo possono includere cromo (III), manganese (II), ferro (III), ferro (II), cobalto (II), nichel (II), rame (II), neodimio (III), samario (III), itterbio (III), gadolinio (III), vanadio (II), terbio (III), disprosio (III), olmio (III) o erbio (III). Agenti di contrasto metallici possono includere lantanio (III), oro (III), piombo (II) o bismuto (III).

[00289] Gli agenti di contrasto ecografici possono comprendere liposomi, come liposomi riempiti di gas. Gli agenti diagnostici radiopachi possono essere scelti tra composti, composti di bario, composti di gallio e composti di tallio.

[00290] Questi e simili chelati, quando complessati con metalli non radioattivi, come manganese, ferro e gadolinio, possono essere utili per i metodi diagnostici della MRI in relazione agli anticorpi anti-CD38. I chelati macrociclici come NOTA, DOTA e TETA sono utili con una varietà di metalli e radiometalli, in particolare con radionuclidi di gallio, ittrio e rame, rispettivamente. Tali complessi metallo-chelato possono essere resi molto stabili adattando la dimensione dell'anello al metallo di interesse. Possono anche essere adatti in metodi diagnostici altri chelati ad anello come polieteri macrociclici, che sono di interesse per nuclidi stabilmente leganti, come ^{223}Ra .

[00291] Pertanto, la presente invenzione fornisce coniugati diagnostici anticorpali anti-CD38, in cui il coniugato anticorpale anti-CD38 è coniugato con un agente di contrasto (come ad esempio agente per risonanza magnetica, tomografia computerizzata o

enhancer per ecografica) o un radionuclide che può essere, ad esempio, un isotopo emettitore di γ , β , α , elettroni Auger o positroni.

[00292] Gli anticorpi anti-CD38 possono anche essere utili, ad esempio, per rilevare l'espressione di un antigene di interesse in cellule, tessuti o siero specifici. Per le applicazioni diagnostiche, l'anticorpo tipicamente sarà marcato con una porzione rilevabile per saggi in vitro. Come sarà compreso dai tecnici del ramo, vi è un'ampia varietà di marcatori adatti per l'uso in test in vitro. Coloranti adatti per l'uso in questo aspetto dell'invenzione includono, ma non sono limitati a complessi di lantanidi fluorescenti, compresi quelli di Europio e Terbio, fluoresceina, rodamina, tetrametil-rodamina, eosina, eritrosina, cumarina, metil-cumarina, punti quantici (anche indicati come "nanocristalli", si veda U.S. Ser. n. 09/315,584, qui incorporato per riferimento), pirene, verde malacite, stilbene, giallo Lucifero, Cascade Blue™, rosso Texas, coloranti Cy (Cy3, Cy5, ecc.), coloranti alexa (tra cui Alexa, ficoeritina, bodipy e altri descritti nella 6a Edizione of the Molecular Probes Handbook by Richard P. Haugland, qui espressamente incorporato per riferimento).

[00293] I tessuti colorati possono quindi essere valutati per il conteggio della radioattività come indicatore della quantità di peptidi associati alla CD38 nel tumore. Le immagini ottenute mediante l'uso di tali tecniche possono essere utilizzate per valutare la biodistribuzione della CD38 in un paziente, mammifero o tessuto, ad esempio nel

contesto dell'utilizzo della CD38 come biomarcatore per la presenza di cellule tumorali invasive.

Articoli di produzione

[00294] In altre forme di realizzazione, è fornito un articolo di produzione contenente materiali utili per il trattamento dei disturbi descritti sopra. L'articolo di produzione comprende un contenitore e un'etichetta. Contenitori adatti includono, ad esempio, flaconi, fiale, siringhe e provette. I contenitori possono essere di una varietà di materiali quali vetro o plastica. Il contenitore contiene una composizione efficace per il trattamento della condizione che può avere una valvola di accesso sterile (ad esempio, il contenitore può essere una sacca per soluzione endovenosa o una fiala con un tappo perforabile con un ago per iniezione ipodermica). L'agente attivo nella composizione è l'anticorpo. L'etichetta su o associata al contenitore indica che la composizione è utilizzata per il trattamento della condizione di scelta. L'articolo di produzione può inoltre comprendere un secondo contenitore comprendente un tampone farmaceuticamente accettabile, come soluzione salina tamponata con fosfato, soluzione di Ringer e soluzione di destrosio. Può inoltre includere altri materiali auspicabili da un punto di vista commerciale e dell'utilizzatore, inclusi altri tamponi, diluenti, filtri, aghi, siringhe e foglietti illustrativi con le istruzioni per l'uso.

ESEMPI

[00295] I seguenti esempi sono proposti per illustrare ma non limitare l'invenzione.

ESEMPIO 1: Costruzione di vettori di espressione comprendenti polinucleotidi codificanti CD38 umana, di scimmia cynomolgus e di topo

[00296] Per costruire un vettore che esprima la CD38 umana (huCD38), un polinucleotide codificante huCD38 è stato isolato dal cDNA ottenuto da Origene Technologies Trueclone® umano. L'huCD38 isolato è stato clonato in un vettore di espressione stabile (XOMA, Inc.) contenente il gene di resistenza alla neomicina (neo^R), che ha consentito la selezione di transfettanti resistenti a G418 (geneticina). Il gene huCD38 presente nei transfettanti selezionati è stato sequenziato per identificare eventuali errori di sequenza. Gli errori nella sequenza che deviavano dall'accesso a Genbank NM_001775 sono stati corretti mediante mutagenesi sito-diretta PCR. Il DNA vettoriale finale è stato confermato mediante sequenziamento 5'.

[00297] Per costruire un vettore che esprimesse la CD38 di scimmia cynomolgus (cyCD38), un polinucleotide codificante cyCD38 è stato isolato dal DNA ottenuto da cDNA - tessuto di milza normale - scimmia (cynomolgus) - di Biochain Institute. Il cyCD38 isolato è stato clonato in un vettore di espressione stabile (XOMA, Inc.) contenente il gene neo^R, che ha consentito la selezione di transfettanti resistenti a G418 (geneticina). Il gene cyCD38 presente nei transfettanti selezionati è stato sequenziato per identificare eventuali errori di sequenza. Gli

errori nella sequenza che deviavano dall'accesso a Genbank AY555148 sono stati corretti mediante mutagenesi sito-diretta PCR. Il DNA vettoriale finale è stato confermato mediante sequenziamento.

[00298] Per costruire un vettore che esprima la CD38 di topo (moCD38), un polinucleotide codificante moCD38 è stato isolato dal DNA ottenuto da raccolta TrueORF di Origene. Il moCD38 isolato è stato clonato in un vettore di espressione stabile (XOMA, Inc.) contenente il gene neo^R, che ha consentito la selezione di transfettanti resistenti a G418 (geneticina). Il gene moCD38 presente nei transfettanti selezionati è stato sequenziato per identificare eventuali errori di sequenza. Gli errori nella sequenza che deviavano dall'accesso a Genbank NM_007646 sono stati corretti mediante mutagenesi sito-diretta PCR. Il DNA vettoriale finale è stato confermato mediante sequenziamento.

Esempio 2: Sviluppo di cellule CD38 ovariche di criceto cinese (CHO) che esprimono CD38

[00299] Per lo sviluppo di cellule CHO che esprimono huCD38, muCD38 e cyCD38, cellule CHO sono state trasfettate con DNA linearizzato. Dopo una settimana in selezione, le cellule sono state ordinate mediante citometria a flusso e le cellule esprimenti huCD38, muCD38 o cyCD38 in quantità maggiore (superiore al 15%) sono state piastrate in piastre da 96 pozzetti per generare singole colonie. Anche le cellule restanti sono state piastrate sotto selezione per generare colonie di backup. Approssimativamente 12-14 giorni dopo la coltura,

sono state identificate singole colonie e trasferite su piastre a 96 pozzetti profondi. I cloni sono stati analizzati mediante analisi FACS dopo il secondo passaggio. I cloni maggiori produttori sono stati passati ed espansi in palloni. I primi 2 cloni sono stati congelati e/o coltivati per il test e il ridimensionamento dell'AVA micoplasmatico.

[00300] Per costruire un reporter di luciferasi per i modelli di xenotrapianto disseminati, un vettore commerciale contenente il marcatore selezionabile neomicina/gene luciferasi/promotore CMV (Promega, Madison, WI) è stato utilizzato per generare una linea transfettante stabile nelle cellule di linfoma di Daudi Burkitt.

ESEMPIO 3: Librerie di visualizzazione dei fagi e screening di agenti che legano la CD38

[00301] La selezione di anticorpo specifico bersaglio da una libreria di visualizzazione dei fagi è stata effettuata secondo metodi descritti da Marks et al. (2004, Methods Mol. Biol. 248:161-76). In breve, la libreria di visualizzazione dei fagi è stata incubata con 100 pmoli di CD38 biotinilata a temperatura ambiente per 1 ora e il complesso formato è stato quindi catturato usando 100 µL di sospensione di microsfere di Streptavidina (DYNABEADS® M-280 Streptavidin, Invitrogen). I fagi non specifici sono stati rimossi lavando le microsfere con tampone di lavaggio (5% di latte in PBS). I fagi legati sono stati eluiti con 0,5 ml di 100 nM di trietilammina (TEA) e immediatamente neutralizzati mediante aggiunta di un uguale volume di 1 M di TRIS-Cl, pH 7,4. Il pool di fagi eluito è stato utilizzato per

infettare cellule di E. coli TG1 che crescevano in fase logaritmica e il fagemide è stato salvato come descritto in Marks et al., Id. La selezione è stata ripetuta per un totale di tre cicli.

[00302] In alternativa, le librerie di visualizzazione dei fagi sono state posizionate su CD38 immobilizzata (R&D Systems) per identificare un pannello di frammenti anticorpali con la capacità di legare la CD38. Il panning è stato eseguito utilizzando protocolli standard (si veda, ad esempio, *Methods in Molecular Biology*, vol. 178: *Antibody Phage Display: Methods and Protocols* a cura di: P.M. O'Brien e R. Aitken, Humana Press; "Panning of Antibody Phage-Display Libraries," Coomber, D.W.J., pp. 133-145, e "Selection of Antibodies Against Biotinylated Antigens," Chames et al., pp. 147-157). In breve, tre pozzetti di una piastra NUNC® MAXISORP sono stati rivestiti con 50 µL di CD38 ricombinante (R&D Systems) ad una concentrazione di 10 µg/ml in PBS. Dopo incubazione notturna a 4 °C, i siti di legame liberi sono stati bloccati con latte al 5% in PBS per un'ora a temperatura ambiente. Circa 200 µl di libreria fagica in 5% di latte/PBS sono stati quindi aggiunti ai pozzetti bloccati e incubati a temperatura ambiente per circa da una a due ore. I pozzetti sono stati lavati e il fago legato è stato eluito usando metodi standard (si veda, ad esempio, Sambrook e Russell, *Molecule Cloning: A Laboratory Manual*, 3a edizione, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001). Il fago eluito è stato amplificato infettando cellule ospiti di E. coli TG 1 nella fase di crescita logaritmica. Le cellule TG 1 infette sono state recuperate mediante centrifugazione

a 2.500 RPM per cinque minuti, posizionate su piastre da 15 cm di agar glucosio al 2%-ampicillina-2YT e incubate a 30 °C durante la notte. Il processo di panning è stato quindi ripetuto utilizzando il fago amplificato. Il ciclo di panning, eluizione e amplificazione è stato ripetuto per tre cicli.

[00303] Dopo il completamento del panning, sono state utilizzate singole colonie delle cellule TG1 piastrate per inoculare il terreno in piastre a 96 pozzetti. Le microcolture sono state coltivate a un OD600 di 0,6, quindi l'espressione di scFv solubile è stata indotta mediante aggiunta di 1 mM IPTG e incubazione durante la notte in uno shaker a 30 °C. I batteri sono stati pellettati mediante centrifugazione e l'estratto periplasmatico è stato usato per testare il legame scFv alla CD38 immobilizzata usando un saggio standard ELISA e un saggio di legame FACS.

[00304] Per lo screening del legame FACS, le cellule CHO che esprimono stabilmente la CD38 sono state utilizzate per lo screening della scFvs in estratto periplasmatico (PPE) per la loro capacità di legare CD38 nativa legata alla membrana. Trasmittenti progenitori e CHO (linee cellulari esprimenti CD38 umana o CD38 cyno o CD38 di topo) sono stati risospesi separatamente a 2×10^6 cellule/ml in PBS (Life Technologies), 0,5% BSA (SigmaAldrich) e 0,1% NaN₃ (SigmaAldrich) (tampone FACS). Le cellule CHO progenitori che non esprimevano la CD38 sono state usate come controllo negativo. Venticinque aliquote μ L delle cellule sono state piastrate in piastre a 96 pozzetti con fondo a

V (Costar Cat # 3897) e 25 μ L di estratto periplasmatico contenente frammento anticorpale scFv marcato con myc sono stati aggiunti alle cellule, quindi la miscela è stata incubata a 4 °C per 30 minuti. Le cellule sono state quindi lavate due volte, quindi il pellet è stato risospeso in 25 μ L di anti c-myc di topo (1/1000 in tampone FACS) (Roche) e nuovamente incubate a 4 °C per 30 minuti. Le cellule sono state quindi lavate due volte e risospese in 25 μ L di IgG-PE anti-topo con diluizione 1/200 in tampone FACS (Jackson labs) e nuovamente incubate a 4 °C per 30 minuti. Le cellule sono state quindi lavate due volte per rimuovere l'eccesso di anticorpo non legato, risospese in 70 μ L di tampone FACS e analizzate su un FACScan® BD. I dati acquisiti sono stati valutati utilizzando il software FlowJo (TreeStar, Inc.). I campioni positivi sono stati identificati confrontando l'intensità di fluorescenza mediana della cellula CHO trasfettata con CD38 rispetto all'intensità di fluorescenza mediana della linea cellulare CHO progenitrice (CD38⁻).

[00305] I cloni di anticorpi che legavano la CD38 umana sono stati sequenziati per identificare cloni unici. I cloni scFV unici sono stati quindi classificati in base a off rate determinati dall'analisi Biacore®. Da 200RU a 500RU di CD38 ricombinante umana (Cat # 2404-AC o equivalente di R&D Systems) sono stati immobilizzati mediante chimica di accoppiamento amminico standard (Biacore®) a un chip CM5 o equivalente. È stato anche preparato un punto di riferimento attivato e quindi bloccato senza l'immobilizzazione della proteina. Ciò è stato

eseguito diluendo l'antigene a 1-3 µg/ml in tampone acetato, pH 5,0, e iniettando sulla superficie attivata fino a quando il livello richiesto è stato immobilizzato (3-5) minuti. La superficie è stata quindi bloccata con etanolamina. Gli estratti periplasmatici sono stati diluiti uno a uno con il tampone di analisi 10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA (acido etilendiamminotetracetico) e 0,05% polisorbato 20 a pH 7,4 con 2 mg/ml di BSA (albumina di siero bovino)). L'estratto periplasmatico diluito è stato iniettato sulle superfici di risonanza plasmonica (SPR) a 30 minuti per 300 secondi con altri 900 secondi di tempo di dissociazione monitorato. La rigenerazione è avvenuta con una singola iniezione di 8 secondi di 100 mM di HCl. I dati dai punti di riferimento sono stati sottratti dai dati dalla superficie attiva, quindi le curve di dissociazione sono state adattate usando il modello di dissociazione 1:1 nel software Biacore® T100.

[00306] I cloni scFv nelle prime posizioni sono stati convertiti in anticorpi IgG1. Lo screening del legame FACS è stato ripetuto sui cloni riformattati in IgG1 usando cellule CHO progenitrici e cellule CHO che esprimevano CD38 umana, murina e di cynomolgus per garantire che le proprietà leganti fossero mantenute e per valutare la cross-reattività delle specie. La caratterizzazione FACS di cloni riformattati in IgG è stata condotta come descritto sopra, ma le fasi consistenti nell'aggiunta di anticorpo anti-c-myc e anti-IgG-PE di topo sono stati sostituiti da una singola fase in cui il legame di IgG umana a piena lunghezza è stato

rilevato dall'aggiunta di IgG anti-umano coniugato con ficoeritrina (Jackson Labs).

ESEMPIO 4: Saggi *in vitro* basati su cellule di cloni riformattati in IgG

[00307] Circa 150 cloni sono stati riformattati come anticorpi IgG1 umani e cinque (Ab19, Ab43, Ab72, Ab79 e Ab110) sono stati completamente valutati utilizzando un pannello di saggi, come descritto di seguito. Le prestazioni dei cloni riformattati in IgG in saggi *in vitro* e *in vivo* sono state confrontate con due anticorpi, BMTK4-1 (chiamato anche benchmark-1, BM-1 o BMTK-1) (SEQ ID NO:24 e 25; regioni variabili della catena pesante e leggera) e BMTK4-2 (chiamato anche benchmark-2, BM-2 o BMTK-2) (SEQ ID NO: 26 e 27; regioni variabili della catena pesante e leggera), le cui sequenze amminoacidiche sono derivate dalle sequenze di anticorpi anti-CD38 noti daratumumab (chiamato anche HuMax-CD38, divulgato nella Pubblicazione Internazionale n. WO 06/099875) e SAR650984 (divulgato nella Pubblicazione Internazionale n. WO 08/047242), rispettivamente. Palivizumab (SYNAGIS®) (MedImmune), un anticorpo clinicamente approvato che riconosce il virus respiratorio sinciziale, è servito da controllo negativo per il legame alla CD38.

ESEMPIO 5: Rilevamento del legame Ab79 mediante immunofluorescenza

[00308] Ab79 marcato con colorante Alex79 Fluor®-488 è stato applicato su sezioni congelate di tessuto coloretale, prostatico e

linfonodale umano normale. Palivizumab marcato con Alexa Fluor®-488 (Synagis®) è stato utilizzato come controllo negativo della colorazione. Le immagini immunofluorescenti risultanti sono mostrate in Figura 4. Il pattern di colorazione osservato per Ab79 era identico a quello osservato con un anticorpo policlonale anti-CD38 disponibile in commercio su tessuto coloretale, prostatico e linfonodale umano normale (dati non mostrati).

[00309] Ab79 marcato con colorante Alex79 Fluor®-488 è stato anche applicato a campioni di midollo osseo da mieloma normale e multiplo (Figura 5). Mentre Ab79 si è legato a circa il 10% delle cellule da midollo osseo normale, >90% delle cellule del midollo osseo da mieloma multiplo, in 4 su 4 campioni testati, ha mostrato legame dell'Ab79.

[00310] È stata esaminata anche la capacità di Ab79 di legarsi a più linee cellulari (MOLP-8, DAUDI, RPMI e MCF7). Le cellule MOLP-8 (mieloma multiplo umano), DAUDI (linfoblasto derivato da un paziente con linfoma di Burkitt) e RPMI (linea cellulare stabilita da pazienti con leucemia mieloide cronica) hanno mostrato tutte il legame di Ab79. La linea del cancro al seno, MCF7, è risultata in gran parte negativa per il legame di Ab79 (Figura 6).

[00311] Gli anticorpi coniugati con Alexa Fluor® 488 sono stati colorati su sezioni congelate da 8 µm, fissate in una miscela di etanolo/acetone per 5 minuti, seguita da incubazione con gli anticorpi per 1 ora a temperatura ambiente in una camera a umidità controllata.

Le sezioni sono state quindi lavate, è stato aggiunto un montante contenente DAPI (Vector Laboratories, cat # H1500) ed è stato applicato un coprivetrino.

ESEMPIO 6: Valutazione dell'espressione di Ab79 su mieloma multiplo (MM) e leucemia linfocitica cronica (CLL)

[00312] Il legame di Ab79 ai campioni di midollo osseo da pazienti affetti da mieloma multiplo è stato analizzato mediante citometria a flusso sia dopo l'arricchimento con cellule CD138⁺ sia mediante gating su cellule CD138⁺CD45^{-/lo} (Figura 7A). Ab79 è stato trovato espresso su >95% delle cellule in quattro-sei campioni di mieloma multiplo. Il pattern di legame di Ab79 appariva in gran parte simile a quello di un anticorpo anti-CD38 usato nei laboratori clinici. Inoltre, Ab79 si è legato a cellule di pazienti con leucemia linfocitica cronica (Figura 7B).

[00314] Per misurare il legame di Ab79 a MM e CLL mediante FACS, i campioni dei pazienti sono stati processati entro 24 ore. Le cellule mononucleate del sangue periferico sono state isolate mediante Ficoll-Paque™ (GE Healthcare) secondo le istruzioni del produttore. L'analisi dell'espressione è stata eseguita utilizzando i seguenti pannelli di anticorpi con cloni tra parentesi. Pannello MM: Ab79-Alexa Fluor®-488, CD45-PerCP(2D1), CD138-APC (MI15). Pannello CLL: Ab79-Alexa Fluor®-488; CD5-PE (UCHT2), CD45-PerCP(2D1), CD19-APC (SJ25C1). 5 µL di anticorpo marcato con PE, PerCP o APC o 10 µL di anticorpo marcato con Alexa Fluor®-488 o controllo isotipo sono stati

aggiunti a ciascun pozzetto o provetta contenente 100 μ L di $0,2 \times 10^6$ PBMC o cellule arricchite con CD138 da aspirato di midollo osseo. I campioni sono stati incubati per 30 minuti a temperatura ambiente a seguito dei quali i globuli rossi sono stati lisati usando BD Pharmlyse, secondo le istruzioni del produttore. Tutti i campioni sono stati lavati tre volte in tampone FACS. I campioni sono stati fissati in paraformaldeide all'1% e analizzati su un BD FACSCanto™ II o BD FACSCaliber™.

ESEMPIO 7: Saggi di CDC indotta da anti-CD38

[00315] I cloni cross-reattivi di cynomolgus sono stati testati per la capacità di indurre citotossicità dipendente dal complemento (CDC). Cellule MOLP-8 sono state piastrate a una densità di 10.000 cellule per pozzetto in una piastra di coltura del tessuto a fondo piatto da 96 pozzetti neri in 50 μ L di terreno completo (RPMI integrato con siero bovino fetale al 10%). 50 μ L di anticorpo anti-CD38 2x, anticorpo IgG di controllo o solo terreno sono stati aggiunti a ciascun pozzetto e lasciati a incubare a temperatura ambiente per 10 minuti. Quantità diverse (2-15 μ L) di complemento di coniglio purificato (cat #CL 3441 Cedarlane Laboratories, Canada), a seconda della linea cellulare, sono state aggiunte a ciascun pozzetto eccetto i pozzetti di controllo. Dopo un'ora di incubazione a 37 °C, le piastre sono state portate a temperatura ambiente, 100 μ L di reagente CytoTox Glo™ di titolo della cella (Promega G7571/G7573) sono stati aggiunti per pozzetto, la piastra è stata agitata per 5-7 minuti e la luminescenza letta su un lettore di piastre luminescenti EnVision® (Perkin Elmer). Condizioni testate: solo

cellule; cellule + complemento; cellule + controllo IgG + complemento; cellule + anticorpo + complemento. Il CDC % è stato calcolato utilizzando la seguente equazione:

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

[00316] dove RLU_T rappresenta le unità di luminescenza relativa del campione di prova e RLU_C rappresenta le unità di luminescenza relativa del campione con il complemento da solo. L'analisi statistica è stata eseguita utilizzando il software PRISM. I valori EC_{50} , determinati dai grafici di CDC % rispetto alla concentrazione di anticorpo, sono riportati nella Tabella 1.

ESEMPIO 8: Saggi di ADCC indotta da anti-CD38

[00317] La citotossicità cellulo-mediata anticorpo-dipendente (ADCC) è stata valutata utilizzando linee cellulari Daudi, MOLP-8 e RPMI-8226 come cellule bersaglio. Le PBMC sono state isolate come cellule effettrici mediante separazione Ficoll-Plaque™ da buffy coat o LRS ottenuto dallo Stanford Blood Center (Palo Alto, CA). I campioni sono stati diluiti 1:3 con FBS al 2% in PBS. 15 ml di Ficoll-Plaque™ (GE Healthcare) sono stati delicatamente stratificati sotto 35 ml di campione diluito e centrifugati a 1800 giri al minuto (freno off) per 25 minuti. L'interfase torbida contenente PBMC è stata raccolta, lavata 3 volte in FBS al 2% in PBS e aliquote congelate di 50×10^6 cellule/mL per aliquota in DMSO/FBS al 10%. Aliquote congelate di PBMC sono state scongelate e coltivate per una notte in FBS al 10%/RPMI + 5 ng/ml di

IL2 umana ricombinante (R&D Systems n. 202-IL) a 2×10^6 per ml, quando necessario.

[00318] Per il saggio ADCC, tutte le fasi sono state eseguite su un terreno completo. 5000 cellule bersaglio sono state piastrate per pozzetto in una piastra da 96 pozzetti in 50 μ L di 3x anti-CD38, controllo IgG o solo terreno è stato aggiunto seguito da 50 μ L di PBMC effettrici umane con una proporzione tra 1:25 e 1:50 cellule bersaglio:cellule effettrici (T:E). Le piastre sono state centrifugate brevemente per circa 30 secondi a 800 giri al minuto per portare tutte le cellule nelle immediate vicinanze. Dopo 4 ore a 37 °C, le piastre sono state centrifugate a 1100 rpm per 5 minuti e 100 μ L di surnatante sono stati trasferiti su una piastra bianca. 100 μ L di reagente CytoTox Glo™ (Promega cat # G9292) sono stati aggiunti al surnatante e le piastre sono state agitate per 20-30 minuti a temperatura ambiente. La luminescenza è stata letta su un lettore di lastre di luminescenza EnVision® (Perkin Elmer) e la lisi percentuale specifica è stata calcolata utilizzando la seguente equazione:

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

[00319] dove RLU_T rappresenta le unità di luminescenza relativa del campione di prova e $RLU_{E/T}$ rappresenta le unità di luminescenza relative del campione contenente solo le cellule bersaglio e le cellule effettrici e RLU_L rappresenta le unità di luminescenza relative per le cellule lisate con Triton X-100. L'analisi statistica è stata eseguita utilizzando il software PRISM. I valori EC_{50} , determinati dai

grafici di lisi specifica % rispetto alla concentrazione di anticorpo, sono riportati nella Tabella 1.

TABELLA 1 CDC, ADCC e attività agonista per anticorpi riformattati in IgG

Anticorpo	CDC EC50 nM (MOLP-8)	ADCC EC50 nM (DAUDI)	ADCC EC50 nM (MOLP-8)	ADCC EC50 nM (RPMI- 8226)	Apoptosi EC50 nM (DAUDI)
BM-1	0,48 ± 0,16	0,03 ± 0,02	0,036 ± 0,013	0,13 ± 0,03	0,057
BM-2	0,65 ± 0,18	0,04 ± 0,02	0,024 ± 0,005	0,15 ± 0,04	0,062
Ab19	0,98 ± 0,26	0,08 ± 0,03	0,038 ± 0,008	0,46 ± 0,15	0,032
Ab43	2,2	0,12 ± 0,09	0,027 ± 0,018	3,84 ± 1,34	1,56
Ab72	0,66 ± 0,49	0,14 ± 0,12	0,193 ± 0,037	2,35 ± 0,99	0,35
Ab79	1,1 ± 0,39	0,03 ± 0,02	0,047 ± 0,012	0,46 ± 0,19	0,048
Ab110	1,99 ± 0,71	0,24 ± 0,17	0,874 ± 0,804	2,98 ± 0,91	0,40
Ab164	2,00 ± 0,83	ND	0,165 ± 0,154	1,2 ± 0,24	0,31

ESEMPIO 9: Determinazione dell'affinità mediante FACS

[00320] Cellule MOLP-8 esprimenti CD38 sono state sospese in tampone FBS all'1% ad una concentrazione di cellule vitali di circa 2 milioni di cellule/ml. Gli mAb da testare sono stati diluiti in serie (2 volte) sui pozzetti su due piastre da 96 pozzetti in 1x PBS. L'ultimo pozzetto di ogni titolazione conteneva solo tampone. PBS e sospensioni cellulari aggiuntive sono state aggiunte a ciascun pozzetto in modo che il volume finale fosse di 300 µL/pozzetto e ogni pozzetto contenesse circa 100.000 cellule. Gli mAb sono elencati di seguito con il corrispondente intervallo di concentrazione finale del sito di legame mAb (concentrazione molecolare 2X) utilizzato per le titolazioni:

[00321] Benchmark 1, [mAb]sito di legame = 50,8 nM -49,7 pM

[00322] Benchmark 2, [mAb]sito di legame = 49,5 nM -48,3 pM

[00323] Ab 43, [mAb]sito di legame = 49,3 nM -48,2 pM

[00324] Ab 110, [mAb]sito di legame = 204 nM -49,9 pM

[00325] Ab 79, [mAb]sito di legame = 103 nM -25,3 pM

[00326] Ab 72, [mAb]sito di legame = 103 nM -25,2 pM

[00326] Ab 19, [mAb]sito di legame = 100 nM -12,2 pM •

[00327] Le piastre sono state poste in uno shaker per piastre per 5 ore a 4 °C, quindi le piastre sono state lavate 3 volte a 4 °C con 1X PBS. 200 µl di anticorpo policlonale specifico Fc anti-IgG umano di capra Cy5 99 nM (Jackson ImmunoResearch Laboratories, n. 109-175-008) è stato quindi aggiunto a ciascun pozzetto e le piastre sono state agitate per 30 minuti a 4 °C. Le piastre sono state nuovamente lavate

2x a 4 °C con IX PBS, quindi è stato utilizzato un citometro a flusso HAC FSCSCanto™ II per registrare l'intensità media della fluorescenza (MFI) di 5000 eventi per ciascun pozzetto contenente una concentrazione di sito di legame mAb unica. Un grafico dell'intensità di fluorescenza media in funzione della concentrazione del sito di legame anticorporeale è stato adattato in modo non lineare con il software Scientist 3.0 usando l'equazione seguente per stimare KD:

$$\text{[00328]} \quad F = p[(KD + LT + n(M)) - \{(KD + LT + n(M))^2 - 4n(M)(LT)\}^{1/2}] / 2 + B$$

[00329] dove F (intensità media della fluorescenza), LT (concentrazione totale del sito di legame mAb), p (costante di proporzionalità che collega le unità arbitrarie di fluorescenza al mAb legato), M (concentrazione cellulare in molarità; 0,553 fM basato su 100.000 cellule in 300 µl), n (numero di recettori per cellula), B (segnale di fondo) e KD = costante di dissociazione di equilibrio.

[00330] Per ogni curva di titolazione dell'anticorpo, è stata ottenuta una stima della KD mentre P, n, B e KD sono stati fatti fluttuare liberamente nell'analisi non lineare. Per una derivazione dettagliata dell'equazione di cui sopra, si veda Drake e Klakamp (2007), "A rigorous multiple independent binding site model for determining cell-based equilibrium dissociation constants," J. Immunol. Methods 318: 157 -62, qui incorporato per riferimento. La Tabella 3 elenca le KD risultanti per tutti gli anticorpi in ordine di affinità decrescente insieme all'intervallo di confidenza al 95% di ogni adattamento tra parentesi. La

concentrazione del sito di legame anticorpale (2X la concentrazione molecolare) è stata utilizzata per l'adattamento della curva non lineare.

ESEMPIO 10: Determinazione dell'affinità mediante Biacore®

[00331] L'affinità degli anticorpi IgG contro l'ectodominio di CD38 solubile (ECD) è stata determinata mediante analisi di risonanza plasmonica di superficie (SPR) su un A100 Biacore™ a 22 °C. L'anticorpo policlonale IgG anti-umano di capra (Caltag H10500) è stato immobilizzato su un chip di biosensore CM5 utilizzando l'accoppiamento amminico standard ai punti 1, 2, 4 e 5 all'interno di tutte e quattro le celle di flusso del chip. I livelli di immobilizzazione su ciascun punto variavano da 5865 RU a 6899 RU. La CD38 umana è stata ottenuta da R&D Systems (Cat # 2404-AC, lotto n. PEH020812A). La concentrazione in stock per la CD38 è stata determinata utilizzando metodi dettagliati in Pace et al. (1995) "How to measure and predict molar absorption coefficient of a protein" Protein Science 4(11):2411-23 e Pace e Grimsley (2004) "Spectrophotometric determination of protein concentration," in Current Protocols in Protein Science, Capitolo 3: Unità 3.1, l'insegnamento di ciascun riferimento essendo incorporato per riferimento in questo documento.

[00332] Il tampone di corsa è stato preparato degassando soluzione salina tamponata con HEPES, polisorbato 20 allo 0,005% e aggiungendo BSA filtrata ad una concentrazione finale di 100 µg/mL. Tutti gli otto mAb purificati sono stati diluiti a circa 2 µg/mL con tampone. Esperimenti preliminari hanno stimato la quantità di ciascun

mAb da catturare in modo da mantenere una capacità superficie (R_{max}) non superiore a circa 100 RU. Per ciascun ciclo di iniezione di antigene/cattura mAb, un mAb è stato catturato sui punti 1 e 5 all'interno di ogni cella di flusso con i punti 2 e 4 giustapposti utilizzati come rispettive superfici di riferimento. Ogni mAb diluito è stato catturato per 1 minuto a una portata di 10 μ L/min seguito da tre minuti di tampone di flusso per la stabilizzazione della superficie. HuCD38 è stato iniettato su tutte e quattro le celle di flusso per 120 secondi a 30 μ L/min su un intervallo di concentrazione di 193,7 nM-3,0 nM (2x diluizione seriale) seguito da una fase di dissociazione di 15 minuti. I campioni sono stati tutti preparati nel tampone e sono stati iniettati in modo casuale in triplicato con sette iniezioni di tampone intervallate per doppio riferimento. Le superfici sono state rigenerate con due iniezioni da 20 secondi di 10 mM di glicina, pH 1,7.

[00333] Tutti i dati del sensorgramma sono stati elaborati con il software Scrubber 2.0c e globalmente adattati a un modello di interazione 1:1 in Scrubber 2.0c. Le costanti di legame risultanti sono mostrate nella Tabella 2.

TABELLA 2

Anticorpo	FACS KD (nM) MOLP-8	FACS KD (pM) RPMI- 8226	Biacore Ka (M ⁻¹ s ⁻¹)	Biacore Kd (s ⁻¹)	Biacore KD (nM)
BM-1	1,1 (0,9)	802	4,49 x 10 ⁴	2,46 x 10 ⁻³	54,8

BM-2	1,6 (0,6)	428	4,24 x 10 ⁵	2,27 x 10 ⁻³	5,4
Ab19	0,4 (0,3)	-	1,54 x 10 ⁵	8,10 x 10 ⁻⁴	5,3
Ab79	1,2 (1,1)	508	1,22 x 10 ⁵	6,75 x 10 ⁻⁴	5,5
Ab72	0,6 (0,4)	-	1,44 x 10 ⁴	1,82 x 10 ⁻³	126
Ab110	1,0 (0,1)	-	1,22 x 10 ⁵	1,71 x 10 ⁻¹	1400
Ab43	1,1 (0,3)	-	2,72 x 10 ⁵	1,46 x 10 ⁻¹	537
Ab164	1,4 (0,7)	-	1,99 x 10 ⁵	7,15 x 10 ⁻²	359

ESEMPIO 11: Saggi di internalizzazione per immunofluorescenza

[00334] Tecniche di immunofluorescenza sono state utilizzate per valutare l'internalizzazione di anticorpi anti-CD38 in cellule MOLP-8. Sono state raccolte cellule MOLP-8 e 5×10^6 cellule sono state colorate per 10 minuti a 4 °C in RPMI-1640 con 1 µg di ciascun anticorpo anti-CD38 direttamente coniugato ad Alexa Fluor® 488. Le cellule sono state lavate in PBS contenente BSA all'1% e 1×10^6 cellule sono state incubate per 3 o 6 ore a 4 °C o 37 °C. La colorazione superficiale è stata sottoposta a quenching per 30 minuti a 4 °C utilizzando 2 µg di anticorpo anti-Alexa Fluor®-488 di coniglio (Invitrogen). Le cellule sono

state lavate e fissate in PBS con PFA all'1%, trasferite su una piastra Microtest a 96 pozzetti (BD Biosciences) e valutate mediante citometria a flusso utilizzando un citometro a flusso FACSCanto™ II (BD Biosciences) o sottoposte a imaging utilizzando un ImageXpress® Micro (Molecular Devices) con ingrandimento 20x.

ESEMPIO 12: Binning degli epitopi con Biacore®

[00335] La strumentazione Biacore® A100 è stata utilizzata per eseguire il binning dei due anticorpi di riferimento e di Ab19 e Ab79. Gli anticorpi sono stati prima immobilizzati a densità alta e bassa su un chip CM5 usando la chimica di accoppiamento NHS/EDC. Per ogni ciclo dell'esperimento di binning degli epitopi, la CD38 è stata prima iniettata su queste superfici. Analogamente a un saggio sandwich in un formato ELISA, un anticorpo unico (prelevato dall'insieme di anticorpi immobilizzati) è stato quindi iniettato su superfici contenenti complessi CD38/anticorpo. Le superfici sono state rigenerate utilizzando iniezioni di acido fosforico alla fine di ogni ciclo. I dati sono stati raccolti a 22 °C utilizzando HBS-P (10 mM 10 HEPES pH 7,4, 150 mM NaCl, 0,005% P-20) integrato con BSA. I sensorgrammi risultanti sono stati elaborati utilizzando il modulo "Epitope Mapping" nel pacchetto software Biacore® A100 Evaluation e una versione di prova di Scrubber per i set di dati A100. I dati replicati sono stati utilizzati per generare una matrice 4 x 4 binaria per i 4 mAb di cui sopra da due esperimenti separati, come mostrato nella Tabella 3.

TABELLA 3

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

ESEMPIO 13: Analisi *in vivo*

[00336] L'efficacia *in vivo* di Ab19 e Ab79 è stata testata in un modello disseminato di Daudi-luciferasi di linfoma umano. Topi femmina CB.17 SCID di 6-8 settimane di Taconic Laboratories sono stati iniettati per via endovenosa con 1×10^6 cellule tumorali Daudi-Luc. Al giorno 7 dello studio, i topi sono stati trattati per via intraperitoneale con: palivizumab, Ab 79, Ab19, Benchmark 1 e Benchmark 2. L'imaging bioluminescente è stata eseguita settimanalmente a partire dal giorno 21 utilizzando un sistema IVIS Xenogen (Caliper Life Sciences) per monitorare il carico tumorale. Per l'imaging, gli animali sono stati iniettati per via intraperitoneale con substrato di luciferasi (150 mg/kg) 10 minuti prima dell'imaging, quindi gli animali sono stati anestetizzati con isoflurano e sottoposti a imaging. I risultati sono mostrati nelle Figure 8 e 9.

ELENCO DELLE SEQUENZE

SEQ ID NO:1 (CD38 *Homo sapiens*; NP_001766.2)
MANCFSPVSGDKPCCRLSRRAQLCLGVLSILVLILVVVLA VVVPRWRQQWSG
PGTTKRFPETVLARCVKYTEIHPEMRHVDCQSVWDAFKGAFISKHPCNITEED
YQPLMKLGTQTVPCNKILLWSRIKDLAQFTQVQRDMFTLEDTLGLYADDL
TWCGEFNTSKINYQSCPDWRKDCSNNPVS VFWKT VSRRF AEAACDVVHVML
NGRSKIFDKNSTFGSVEVHNLQPEKVQTLEAWVIHGGREDSRDLCQDPTIKE
LESI SKRNIQF SCKNIYRPDKFLQCVKNPEDSSCTSEI

SEQ ID NO:2 (CD38 *Macaca fascicularis*; AAT36330.1)
MANCEFSPVSGDKPCCRLSRRAQVCLGVCLLVLLILVVVVAVVLPRWRQQW
SGSGTTSRFPETVLARCVKYTEVHPEMRHVDCQSVWDAFKGAFISKYPCNIT
EEDYQPLVKLGTQTVPCNKTLWSRIKDLAHQFTQVQRDMFTLEDMLLGYL
ADDLTWCGEFNTFEINYQSCPDRKDCSNNPVSVFWKTVSRRFAETACGVV
HVMLNGSRSKIFDKNSTFGSVEVHNLQPEKVQALEA WVIHGGREDSRDLCQD
PTIKELESIISKRNIRFFCKNIYRPDKFLQCVKNPEDSSCLSGI

SEQ ID NO:3 (HCDR1 Ab79)

GFTFDDYG

SEQ ID NO:4 (HCDR2 Ab79)

ISWNGGKT

SEQ ID NO:5 (HCDR3 Ab79)

ARGSLFHDSSGFYFGH

SEQ ID NO:6 (LCDR1 Ab79)

SSNIGDNY

SEQ ID NO:7 (LCDR2 Ab79)

RDS

SEQ ID NO:8 (LCDR3 Ab79)

QSYDSSLSGS

SEQ ID NO:9 (Ab79 catena pesante)
EVQLLESGGGLVQPGSLRLSCAASGFTFDDYGMSWVRQAPGKGLEWVSDI
SWNGGKTHYVDSVKGQFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGSLF
HDSSGFYFGHWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLA

SEQ ID NO:10 (Ab79 catena leggera)
QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGDNYVSWYQQLPGTAPKLLIYRDSQ
RPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCQSYDSSLSGSVFSGGKLT
VLGQPKANPTVTLFPPSSEEL

SEQ ID NO:11 (Ab19 catena pesante)
EVQLLESGGGLVQPGSLRLSCAASGFTFNNDMTWVRQAPGKGLEWVAVI
SYDGSDKDYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVYYY
GFSGPSMDVWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLA

SEQ ID NO:12 (Ab19 catena leggera)

QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSNSNIGSNTVNWYQQLPGTAPKLLIYSDSN
RPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYQCQSYDSSLSGSRVFGGGTK
LTVLGQPKANPTVTLFPPSSEEL

SEQ ID NO:13 (HCDR1 AbI9)

GFTFNNG

SEQ ID NO:14 (HCDR2 Ab19)

ISYDGSDK

SEQ ID NO:15 (HCDR3 Ab19)

ARVYYYGFSGPSMDV

SEQ ID NO:16 (LCDR1 Ab19)

NSNIGSNT

SEQ ID NO:17 (LCDR2 Ab19)

SDS

SEQ ID NO:18 (LCDR3 Ab79)

QSYDSSLSGSR

SEQ ID NO:19 (Ab19 catena pesante) con costante
EVQLLESQGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNNDMTWVRQAPGKGLEWVAVI
SYDGSDDYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVYYY
GFGSPMDVWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDY
FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNV
NHKPSNTKVDKRVKPKSCKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR
TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL
TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEM
TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLT
VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO:20 (Ab19 catena leggera) con costante
QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSNSNIGSNTVNWYQQLPGTAPKLLIYSDSN
RPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYQCQSYDSSLSGSRVFGGGTK
LTVLGQPKANPTVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADGSP
VKAGVETTKPSKQSNKYAAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTV
APTECS

SEQ ID NO:21 (Ab79 catena pesante)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFDDYGMSSWVRQAPGKGLEWVSDI
SWNGGKTHYVDSVKGQFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGSLF
HDSSGFYFGHWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD
YFPEPVTVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICN
VNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS
RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV
LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE
MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSK
LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO:22 (Ab79 catena leggera)

QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGDNYVSWYQQLPGTAPKLLIYRDSQ
RPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYCYCQSYDSSLGSGVFGGKLT
VLGQPKANPTVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADGSPVK
AGVETTKPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSQRSYSCQVTHEGSTVEKTVAP
TECS

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

MAAQGCAASRLQLLLQLLLLLLLLAAGGARARWRGEGTSAHLRDIFLGRCA
AEYRALLSPEQRNKNCTAIWEAFKVALDKDPCSVLPSDYDLFINLSRHSIPRD
KSLFWENSHLLVNSFADNTRRFMPLSDVLYGRVADFLSWCRQKND SGLDYQ
SCPTS
EDCENNPVDSFWKRASIQYSKDSGVIHVMLNGSEPTGAYPIKGFADYEIPN
LQKEKITRIEIWVMHEIGGNVESCGEGSMKVLEKRLKDMGFQYSCINDYRP
VKLLQCVDHSTHPDCALKSAAAATQRKAPSLYTEQRAGLIPLFLVLASRTQL

SEQ ID NO:24 (Benchmark 1; regione variabile della catena

pesante)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFTFNSFAMSWVRQAPGKGLEWVSAIS
GSGGGTYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYFCAKDKILWF
GEPVFDYWGQGLTVTVSS

SEQ ID NO:25 (Benchmark 1; regione variabile della catena

leggera)

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASN
RATGIPARFSGSGGTDFLTITISSLEPEDFAVYYCQQRSNWPPTFGQGTKVEIK
R

SEQ ID NO:26 (Benchmark 2; regione variabile della catena

pesante)

QVQLVQSGAEVAKPGTSVKLSCKASGYTFTDYWMQWVKQRPGQGLEWIGTI
YPGDGDGTGYAQKFQGGKATLTADKSSKTVYMHLSLASEDSAVYYCARGDY
YGSNSLDYWGQGTSVTVSS

SEQ ID NO:27 (Benchmark 2; regione variabile della catena

leggera)

DIVMTQSHLSMSTSLGDPVSITCKASQDVSTVVAWYQQKPGQSPRRLIYSASY
RYIGVPDRFTGSGAGTDFFTISSVQAEDLAVYYCQQHYSPPYTFGGGKLEI
KR

SEQ ID NO:28 (Ab43 catena pesante)

EVQLLES GGGLVQPGSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVSRI
NSDGSSTSYADSMKGQFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGGY
YYAMDVWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE
PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHK
PSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV
TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL
HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN
QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDK
SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO:29 (Ab43 catena leggera)

QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSNIGYKTVN WYQQLPGTAPKLLIYDNN
KRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADY YCAA WDDSLNGLVFGGTT
KLTVLGQPKANPTVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADGS
PVKAGVETTKPSKQSNKYAASSYLSLTPEQWKS HRYSYSCQVTHEGSTVEKT
VAPECS

SEQ ID NO:30 (Ab72 catena pesante)

EVQLLES GGGLVQPGSLRLSCAASGFTFSSYGMNWVRQAPGKGLEWVSGIS
GSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDSNYD
FWSGYYYGMDVWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV
KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYI
CNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLM
ISRTPPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE
EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYS
KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO:31 (Ab72 catena leggera)

QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSNIGSKTVSWYQQLPGTAPKLLIYDNNK
RPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADY YCSSY AARSTNIIFGGGKLT
VLGQPKANPTVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADGSPVK
AGVETTKPSKQSNKYAASSYLSLTPEQWKS HRYSYSCQVTHEGSTVEKTVA
TECS

SEQ ID NO:32 (Ab110 catena pesante)

EVQLLES GGGLVQPGSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVSIY
SGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARRATWGG
ATHDYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP
VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHK
SNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV
TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH
QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ
VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS
RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO:33 (Ab110 catena leggera)

QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNTVNWYQQLPGTAPKLLIYRNNQ
RPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCATWDDSLNGVLFGGGTK
LTVLGQPKANPTVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADGSP
VKAGVETTKPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTV
APTECS

SEQ ID NO:34 (Ab19 catena pesante) con costante

EVQLESGGGLVQPGSLRLSCAASGFTFNNDMTWVRQAPGKLEWVAVI
SYDGSDDYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCARVYYY
GFGSPMDVWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY
FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNV
NPKPSNTKVDKRVKPKSCDKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMISR
TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL
TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEM
TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT
VDKSRWQQGNVDFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO:35 (Ab19 catena leggera) con costante

QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNTVNWYQQLPGTAPKLLIYSDSN
RPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCQSYDSSLGSRVFGGGTK
LTVLGQPKANPTVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADGSP
VKAGVETTKPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTV
APTECS

ELENCO DELLE SEQUENZE

<110> Takeda Pharmaceutical Company Limited Elias,
Kathleen A. Landes, Gregory Singh, Shweta Korver, Wouter Drake,
Andrew W. Haak-Frendscho, Mary Snell, Gyorgy P. Bhaskar, vinay

<120> ANTICORPI ANTI-CD38 CONIUGATI

<130> 101588-5008-WO

<140> N. di domanda di brevetto PCT da assegnare

<141> 2011-12-30

<150> 61/428,699

<151> 30/12/2010

<150> 61/470,382

<151> 31/03/2011

<150> 61/470,406

<151> 31/03/2011

<150> 61/485,104

<151> 11/05/2011

<160> 35

<170> PatentIn versione 3.5

<210> 1

<211> 300

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Ala Asn Cys Glu Phe Ser Pro Val Ser Gly Asp Lys Pro Cys Cys
1 5 10 15

Arg Leu Ser Arg Arg Ala Gln Leu Cys Leu Gly Val Ser Ile Leu Val
20 25 30

Leu Ile Leu Val Val Val Leu Ala Val Val Val Pro Arg Trp Arg Gln
35 40 45

Gln Trp Ser Gly Pro Gly Thr Thr Lys Arg Phe Pro Glu Thr Val Leu
50 55 60

Ala Arg Cys Val Lys Tyr Thr Glu Ile His Pro Glu Met Arg His Val
65 70 75 80

Asp Cys Gln Ser Val Trp Asp Ala Phe Lys Gly Ala Phe Ile Ser Lys
85 90 95

His Pro Cys Asn Ile Thr Glu Glu Asp Tyr Gln Pro Leu Met Lys Leu
100 105 110

Gly Thr Gln Thr Val Pro Cys Asn Lys Ile Leu Leu Trp Ser Arg Ile
 115 120 125
 Lys Asp Leu Ala His Gln Phe Thr Gln Val Gln Arg Asp Met Phe Thr
 130 135 140
 Leu Glu Asp Thr Leu Leu Gly Tyr Leu Ala Asp Asp Leu Thr Trp Cys
 145 150 155 160
 Gly Glu Phe Asn Thr Ser Lys Ile Asn Tyr Gln Ser Cys Pro Asp Trp
 165 170 175
 Arg Lys Asp Cys Ser Asn Asn Pro Val Ser Val Phe Trp Lys Thr Val
 180 185 190
 Ser Arg Arg Phe Ala Glu Ala Ala Cys Asp Val Val His Val Met Leu
 195 200 205
 Asn Gly Ser Arg Ser Lys Ile Phe Asp Lys Asn Ser Thr Phe Gly Ser
 210 215 220
 Val Glu Val His Asn Leu Gln Pro Glu Lys Val Gln Thr Leu Glu Ala
 225 230 235 240
 Trp Val Ile His Gly Gly Arg Glu Asp Ser Arg Asp Leu Cys Gln Asp
 245 250 255
 Pro Thr Ile Lys Glu Leu Glu Ser Ile Ile Ser Lys Arg Asn Ile Gln
 260 265 270
 Phe Ser Cys Lys Asn Ile Tyr Arg Pro Asp Lys Phe Leu Gln Cys Val
 275 280 285
 Lys Asn Pro Glu Asp Ser Ser Cys Thr Ser Glu Ile
 290 295 300

<210> 2

<211> 301

<212> PRT

<213> *Macaca fascicularis*

<400> 2

Met Ala Asn Cys Glu Phe Ser Pro Val Ser Gly Asp Lys Pro Cys Cys
 1 5 10 15
 Arg Leu Ser Arg Arg Ala Gln Val Cys Leu Gly Val Cys Leu Leu Val
 20 25 30
 Leu Leu Ile Leu Val Val Val Val Ala Val Val Leu Pro Arg Trp Arg
 35 40 45

Gln Gln Trp Ser Gly Ser Gly Thr Thr Ser Arg Phe Pro Glu Thr Val
 50 55 60
 Leu Ala Arg Cys Val Lys Tyr Thr Glu Val His Pro Glu Met Arg His
 65 70 75 80
 Val Asp Cys Gln Ser Val Trp Asp Ala Phe Lys Gly Ala Phe Ile Ser
 85 90 95
 Lys Tyr Pro Cys Asn Ile Thr Glu Glu Asp Tyr Gln Pro Leu Val Lys
 100 105 110
 Leu Gly Thr Gln Thr Val Pro Cys Asn Lys Thr Leu Leu Trp Ser Arg
 115 120 125
 Ile Lys Asp Leu Ala His Gln Phe Thr Gln Val Gln Arg Asp Met Phe
 130 135 140
 Thr Leu Glu Asp Met Leu Leu Gly Tyr Leu Ala Asp Asp Leu Thr Trp
 145 150 155 160
 Cys Gly Glu Phe Asn Thr Phe Glu Ile Asn Tyr Gln Ser Cys Pro Asp
 165 170 175
 Trp Arg Lys Asp Cys Ser Asn Asn Pro Val Ser Val Phe Trp Lys Thr
 180 185 190
 Val Ser Arg Arg Phe Ala Glu Thr Ala Cys Gly Val Val His Val Met
 195 200 205
 Leu Asn Gly Ser Arg Ser Lys Ile Phe Asp Lys Asn Ser Thr Phe Gly
 210 215 220
 Ser Val Glu Val His Asn Leu Gln Pro Glu Lys Val Gln Ala Leu Glu
 225 230 235 240
 Ala Trp Val Ile His Gly Gly Arg Glu Asp Ser Arg Asp Leu Cys Gln
 245 250 255
 Asp Pro Thr Ile Lys Glu Leu Glu Ser Ile Ile Ser Lys Arg Asn Ile
 260 265 270
 Arg Phe Phe Cys Lys Asn Ile Tyr Arg Pro Asp Lys Phe Leu Gln Cys
 275 280 285
 Val Lys Asn Pro Glu Asp Ser Ser Cys Leu Ser Gly Ile
 290 295 300

<210> 3

<211> 8

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> CDR1 catena pesante di Ab79

<400> 3

Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr Gly
1 5

<210> 4

<211> 8

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> CDR2 catena pesante di Ab79

<400> 4

Ile Ser Trp Asn Gly Gly Lys Thr
1 5

<210> 5

<211> 16

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> CDR3 catena pesante di Ab79

<400> 5

Ala Arg Gly Ser Leu Phe His Asp Ser Ser Gly Phe Tyr Phe Gly His
1 5 10 15

<210> 6

<211> 8

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> CDR1 catena leggera di Ab79

<400> 6

Ser Ser Asn Ile Gly Asp Asn Tyr
1 5

<210> 7

<211> 3

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> CDR2 catena leggera di Ab79

<400> 7

Arg Asp Ser
1

<210> 8

<211> 10

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> CDR3 catena leggera di Ab79

<400> 8

Gln Ser Tyr Asp Ser Ser Leu Ser Gly Ser
1 5 10

<210> 9

<211> 135

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> Regione variabile catena pesante di Ab79

<400> 9

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr
20 25 30

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

Ser Asp Ile Ser Trp Asn Gly Gly Lys Thr His Tyr Val Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Gln Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Gly Ser Leu Phe His Asp Ser Ser Gly Phe Tyr Phe Gly His
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
115 120 125

Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
130 135

<210> 10

<211> 129

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> Regione variabile catena leggera di Ab79

<400> 10

Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln
 1 5 10 15
 Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Asp Asn
 20 25 30
 Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
 35 40 45
 Ile Tyr Arg Asp Ser Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60
 Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Arg
 65 70 75 80
 Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Ser Leu
 85 90 95
 Ser Gly Ser Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln
 100 105 110
 Pro Lys Ala Asn Pro Thr Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu
 115 120 125

Leu

<210> 11

<211> 134

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> Catena pesante di Ab19

<400> 11

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Asn Tyr
 20 25 30
 Asp Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asp Lys Asp Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Val Tyr Tyr Tyr Gly Phe Ser Gly Pro Ser Met Asp Val Trp
 100 105 110
 Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
 115 120 125
 Ser Val Phe Pro Leu Ala
 130

<210> 12

<211> 130

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> Catena leggera di Ab19

<400> 12

Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln
 1 5 10 15
 Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Asn Ser Asn Ile Gly Ser Asn
 20 25 30
 Thr Val Asn Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
 35 40 45
 Ile Tyr Ser Asp Ser Asn Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60
 Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Arg
 65 70 75 80
 Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Ser Leu
 85 90 95
 Ser Gly Ser Arg Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
 100 105 110
 Gln Pro Lys Ala Asn Pro Thr Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu
 115 120 125
 Glu Leu
 130

<210> 13

<211> 8

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> CDR1 catena pesante di Ab19

<400> 13

Gly Phe Thr Phe Asn Asn Tyr Gly
 1 5

<210> 14

<211> 8

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> CDR2 catena pesante di Ab19

<400> 14

Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asp Lys
1 5

<210> 15

<211> 15

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> CDR3 catena pesante di Ab19

<400> 15

Ala Arg Val Tyr Tyr Tyr Gly Phe Ser Gly Pro Ser Met Asp Val
1 5 10 15

<210> 16

<211> 8

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> CDR1 catena leggera di Ab19

<400> 16

Asn Ser Asn Ile Gly Ser Asn Thr
1 5

<210> 17

<211> 3

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> CDR2 catena leggera di Ab19

<400> 17

Ser Asp Ser
1

<210> 18

<211> 11

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> CDR3 catena leggera di Ab19

<400> 18

Gln Ser Tyr Asp Ser Ser Leu Ser Gly Ser Arg
1 5 10

<210> 19

<211> 452

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> Catena pesante di Ab19

<400> 19

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

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> Catena leggera di Ab19

<400> 20

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

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Asn Ser Asn Ile Gly Ser Asn
20 25 30

Thr Val Asn Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Ser Asp Ser Asn Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Arg
65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Ser Leu
85 90 95

Ser Gly Ser Arg Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
100 105 110

Gln Pro Lys Ala Asn Pro Thr Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu
115 120 125

Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe
130 135 140

Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Gly Ser Pro Val
145 150 155 160

Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Lys Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys
165 170 175

Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser
180 185 190

His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu
195 200 205

Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
210 215

<210> 21

<211> 453

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> Catena pesante di Ab79

<400> 21

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr
 20 25 30
 Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Asp Ile Ser Trp Asn Gly Gly Lys Thr His Tyr Val Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Gln Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gly Ser Leu Phe His Asp Ser Ser Gly Phe Tyr Phe Gly His
 100 105 110
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
 115 120 125
 Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly
 130 135 140
 Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
 145 150 155 160
 Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
 165 170 175
 Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
 180 185 190
 Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val
 195 200 205
 Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys
 210 215 220
 Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu
 225 230 235 240
 Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr

<400> 22

Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln
1 5 10 15
Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Asn Ile Gly Asp Asn
20 25 30
Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
35 40 45
Ile Tyr Arg Asp Ser Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60
Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Arg
65 70 75 80
Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Ser Leu
85 90 95
Ser Gly Ser Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln
100 105 110
Pro Lys Ala Asn Pro Thr Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu
115 120 125
Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr
130 135 140
Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Gly Ser Pro Val Lys
145 150 155 160
Ala Gly Val Glu Thr Thr Lys Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr
165 170 175
Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His
180 185 190
Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys
195 200 205
Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
210 215

<210> 23

<211> 318

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 23

Met Ala Ala Gln Gly Cys Ala Ala Ser Arg Leu Leu Gln Leu Leu Leu
1 5 10 15

Gln Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Ala Ala Gly Gly Ala Arg Ala
20 25 30

Arg Trp Arg Gly Glu Gly Thr Ser Ala His Leu Arg Asp Ile Phe Leu
 35 40 45
 Gly Arg Cys Ala Glu Tyr Arg Ala Leu Leu Ser Pro Glu Gln Arg Asn
 50 55 60
 Lys Asn Cys Thr Ala Ile Trp Glu Ala Phe Lys Val Ala Leu Asp Lys
 65 70 75 80
 Asp Pro Cys Ser Val Leu Pro Ser Asp Tyr Asp Leu Phe Ile Asn Leu
 85 90 95
 Ser Arg His Ser Ile Pro Arg Asp Lys Ser Leu Phe Trp Glu Asn Ser
 100 105 110
 His Leu Leu Val Asn Ser Phe Ala Asp Asn Thr Arg Arg Phe Met Pro
 115 120 125
 Leu Ser Asp Val Leu Tyr Gly Arg Val Ala Asp Phe Leu Ser Trp Cys
 130 135 140
 Arg Gln Lys Asn Asp Ser Gly Leu Asp Tyr Gln Ser Cys Pro Thr Ser
 145 150 155 160
 Glu Asp Cys Glu Asn Asn Pro Val Asp Ser Phe Trp Lys Arg Ala Ser
 165 170 175
 Ile Gln Tyr Ser Lys Asp Ser Ser Gly Val Ile His Val Met Leu Asn
 180 185 190
 Gly Ser Glu Pro Thr Gly Ala Tyr Pro Ile Lys Gly Phe Phe Ala Asp
 195 200 205
 Tyr Glu Ile Pro Asn Leu Gln Lys Glu Lys Ile Thr Arg Ile Glu Ile
 210 215 220
 Trp Val Met His Glu Ile Gly Gly Pro Asn Val Glu Ser Cys Gly Glu
 225 230 235 240
 Gly Ser Met Lys Val Leu Glu Lys Arg Leu Lys Asp Met Gly Phe Gln
 245 250 255
 Tyr Ser Cys Ile Asn Asp Tyr Arg Pro Val Lys Leu Leu Gln Cys Val
 260 265 270
 Asp His Ser Thr His Pro Asp Cys Ala Leu Lys Ser Ala Ala Ala Ala
 275 280 285
 Thr Gln Arg Lys Ala Pro Ser Leu Tyr Thr Glu Gln Arg Ala Gly Leu
 290 295 300
 Ile Ile Pro Leu Phe Leu Val Leu Ala Ser Arg Thr Gln Leu
 305 310 315

<210> 24

<211> 122

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> Catena pesante Benchmark 1

<400> 24

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Phe Thr Phe Asn Ser Phe
20 25 30

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

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Gly Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

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

Ala Lys Asp Lys Ile Leu Trp Phe Gly Glu Pro Val Phe Asp Tyr Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 25

<211> 108

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> Catena leggera Benchmark 1

<400> 25

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Pro
85 90 95

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

<210> 26

<211> 120

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> Catena pesante Benchmark 2

<400> 26

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Ala Lys Pro Gly Thr
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30
 Trp Met Gln Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Thr Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Gly Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Lys Thr Val Tyr
 65 70 75 80
 Met His Leu Ser Ser Leu Ala Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gly Asp Tyr Tyr Gly Ser Asn Ser Leu Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 27

<211> 108

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> Catena leggera Benchmark 2

<400> 27

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

Asp Pro Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Val
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Arg Arg Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ile Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
50 55 60

Ser Gly Ala Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala
65 70 75 80

Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Ser Pro Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 28

<211> 449

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> Catena pesante di Ab43

<400> 28

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Arg Ile Asn Ser Asp Gly Ser Ser Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Met
 50 55 60
 Lys Gly Gln Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gly Gly Tyr Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp Val Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
 115 120 125

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
 130 135 140

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
 145 150 155 160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
 165 170 175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
 180 185 190

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
 195 200 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
 210 215 220

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
 225 230 235 240

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
 245 250 255

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
 260 265 270

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
 275 280 285

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
 290 295 300

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
 305 310 315 320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
 325 330 335

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
 340 345 350

Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
 355 360 365

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
 370 375 380

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
 385 390 395 400

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
405 410 415

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
420 425 430

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
435 440 445

Lys

<210> 29

<211> 216

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> Catena leggera di Ab43

<400> 29

Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln
 1 5 10 15
 Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Gly Ser Ser Asn Ile Gly Tyr Lys
 20 25 30
 Thr Val Asn Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
 35 40 45
 Ile Tyr Asp Asn Asn Lys Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60
 Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Arg
 65 70 75 80
 Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu
 85 90 95
 Asn Gly Leu Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln
 100 105 110
 Pro Lys Ala Asn Pro Thr Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu
 115 120 125
 Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr
 130 135 140
 Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Gly Ser Pro Val Lys
 145 150 155 160
 Ala Gly Val Glu Thr Thr Lys Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr
 165 170 175
 Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His
 180 185 190
 Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys
 195 200 205
 Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
 210 215

<210> 30

<211> 455

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> Catena pesante di Ab72

<400> 30

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

Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser
 180 185 190
 Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys
 195 200 205
 Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu
 210 215 220
 Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 225 230 235 240
 Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 245 250 255
 Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 260 265 270
 Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 275 280 285
 Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
 290 295 300
 Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 305 310 315 320
 Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
 325 330 335
 Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
 340 345 350
 Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys
 355 360 365
 Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 370 375 380
 Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 385 390 395 400
 Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
 405 410 415
 Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
 420 425 430
 Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 435 440 445
 Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 450 455

<210> 31

<211> 216

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> Catena leggera di Ab72

<400> 31

Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln
1 5 10 15
Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Lys
20 25 30
Thr Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
35 40 45
Ile Tyr Asp Asn Asn Lys Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60
Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Arg
65 70 75 80
Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser Tyr Ala Ala Arg Ser
85 90 95
Thr Asn Ile Ile Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln
100 105 110
Pro Lys Ala Asn Pro Thr Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu
115 120 125
Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr
130 135 140
Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Gly Ser Pro Val Lys
145 150 155
Ala Gly Val Glu Thr Thr Lys Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr
165 170 175
Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His
180 185 190
Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys
195 200 205

Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
210 215

<210> 32

<211> 449

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> Catena pesante di Ab110

<400> 32

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Ile Ile Tyr Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 50 55 60
 Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
 65 70 75 80
 Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95
 Arg Arg Ala Thr Trp Gly Gly Ala Thr His Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
 115 120 125
 Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
 130 135 140
 Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
 145 150 155 160
 Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
 165 170 175
 Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
 180 185 190
 Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
 195 200 205
 Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
 210 215 220

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
 225 230 235 240
 Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
 245 250 255
 Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
 260 265 270
 Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
 275 280 285
 Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
 290 300
 Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
 305 310 315 320
 Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
 325 330 335
 Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
 340 345 350
 Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
 355 360 365
 Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
 370 375 380
 Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
 385 390 395 400
 Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
 405 410 415
 Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 420 425 430
 Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 435 440 445

Lys

<210> 33

<211> 216

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> Catena leggera di Ab110

<400> 33

Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln
1 5 10 15
Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn
20 25 30
Thr Val Asn Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
35 40 45
Ile Tyr Arg Asn Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60
Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Arg
65 70 75 80
Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Thr Trp Asp Asp Ser Leu
85 90 95
Asn Gly Val Leu Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln
100 105 110
Pro Lys Ala Asn Pro Thr Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu
115 120 125
Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr
130 135 140
Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Gly Ser Pro Val Lys
145 150 155 160
Ala Gly Val Glu Thr Thr Lys Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr
165 170 175
Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His
180 185 190
Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys
195 200 205
Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
210 215

<210> 34

<211> 452

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> Catena pesante di Ab119

<400> 34

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Asn Tyr
 20 25 30
 Asp Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asp Lys Asp Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Val Tyr Tyr Tyr Gly Phe Ser Gly Pro Ser Met Asp Val Trp
 100 105 110
 Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
 115 120 125
 Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr
 130 135 140
 Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
 145 150 155 160
 Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
 165 170 175
 Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
 180 185 190
 Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn
 195 200 205
 His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser
 210 215 220
 Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
 225 230 235
 Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
 240 245 250 255
 Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
 260 265 270

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
 275 280 285
 Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
 290 295 300
 Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
 305 310 315 320
 Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
 325 330 335
 Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
 340 345 350
 Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val
 355 360 365
 Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
 370 375 380
 Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
 385 390 395 400
 Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
 405 410 415
 Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
 420 425 430
 Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
 435 440 445
 Ser Pro Gly Lys
 450

<210> 35

<211> 217

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> Catena leggera di Ab19

<400> 35

Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln
 1 5 10 15
 Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Asn Ser Asn Ile Gly Ser Asn
 20 25 30
 Thr Val Asn Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
 35 40 45
 Ile Tyr Ser Asp Ser Asn Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60
 Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Arg
 65 70 75 80
 Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Ser Leu
 85 90 95
 Ser Gly Ser Arg Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
 100 105 110
 Gln Pro Lys Ala Asn Pro Thr Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu
 115 120 125
 Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe
 130 135 140
 Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Gly Ser Pro Val
 145 150 155 160
 Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Lys Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys
 165 170 175
 Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser
 180 185 190
 His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu
 195 200 205
 Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
 210 215

RIVENDICAZIONI

1. Anticorpo isolato che si lega specificamente alla CD38 umana (SEQ ID NO: 1) e alla CD38 di cynomolgus (SEQ ID NO: 2) comprendente:

a) una regione variabile della catena pesante comprendente SEQ ID NO:9;

b) una regione variabile della catena leggera comprendente SEQ ID NO:10; e

c) una porzione di farmaco attaccata covalentemente.

2. Anticorpo isolato secondo la rivendicazione 1 in cui la catena pesante comprende SEQ ID NO:21 e la catena leggera comprende SEQ ID NO:22.

3. Anticorpo isolato secondo la rivendicazione 1 comprendente inoltre un dominio Fc.

4. Anticorpo isolato secondo la rivendicazione 3 in cui detto dominio Fc è un dominio Fc umano o variante.

5. Anticorpo isolato secondo qualsiasi delle precedenti rivendicazioni in cui detta porzione di farmaco è attaccata a detto anticorpo usando un linker.

6. Anticorpo isolato secondo la rivendicazione 5 in cui detta porzione di farmaco è selezionata dal gruppo costituito da una auristatina, un maitansinoide e calicemicina, una dolstatina e un tricotecene.

7. Cellula ospite comprendente un acido nucleico isolato codificante la catena pesante della rivendicazione 1 e un acido nucleico isolato codificante la catena leggera della rivendicazione 1.

8. Metodo per produrre l'anticorpo della rivendicazione 1 comprendente la coltivazione della cellula ospite della rivendicazione 7 in condizioni in cui viene prodotto detto anticorpo.

9. Anticorpo isolato secondo la rivendicazione 1 per l'uso nel trattamento del cancro.

10. Anticorpo isolato per l'uso nel trattamento del cancro secondo la rivendicazione 9 in cui detto cancro è un cancro ematologico ed è scelto dal gruppo costituito da mieloma multiplo, leucemia linfoblastica cronica, leucemia linfocitica cronica, leucemia plasmacellulare, leucemia mieloide acuta, leucemia mieloide cronica, linfoma a cellule B e linfoma di Burkitt.

11. Anticorpo isolato per l'uso nel trattamento del cancro secondo la rivendicazione 10 in cui detto cancro ematologico è mieloma multiplo.

12. Anticorpo isolato secondo la rivendicazione 1 per l'uso come medicamento.

*** **

Si attesta la perfetta conformità della traduzione che precede.

LEGENDA DELLE TAVOLE DEI DISEGNI

TAVOLA 1/20

Figura 1

“FIGURE” = FIGURA

“Pro B cell” = Cellula pro-B

“Pre B cell” = Cellula pre-B

“Immature B cell” = Cellula B immatura

“Mature B cell” = Cellula B matura

“Activated B cell” = Cellula B attivata

“Plasma cell” = Plasmacellula

“Lymphoid stem cell” = Cellula staminale linfoide

“Lymphoid progenitor” = Progenitore linfoide

“Thymocyte” = Timocita

“Naïve CD4⁺ T cell” = Cellula T naïve CD4⁺

“Naïve CD8⁺ T cell” = Cellula T naïve CD8⁺

“Activated CD4⁺ T cell” = Cellula T CD4⁺ attivata

“Activated CD8⁺ T cell” = Cellula T CD8⁺ attivata

“NKT cell” = Cellula NKT

TAVOLA 2/20

Figura 2

“FIGURE” = FIGURA

“Ab79 Heavy Chain” = Catena pesante di Ab79

“Ab79 Light Chain” = Catena leggera di Ab79

“Ab19 Heavy Chain” = Catena pesante di Ab19

“Ab19 Light Chain” = Catena leggera di Ab19

TAVOLA 3/20

Figura 3

“FIGURE” = FIGURA

“Accession” = Accesso

TAVOLE 4-6/20

Figura 4-6

“FIGURE” = FIGURA

TAVOLA 7/20

Figura 7

“FIGURE” = FIGURA

“Count” = Conteggio

TAVOLA 8/20

Figura 8

“FIGURE” = FIGURA

“Saline” = Soluzione salina

“Vincristine” = Vincristina

“Photons/sec” = Fotoni/sec

“Days post-impiant” = Giorni post-impianto

TAVOLA 9/20

Figura 9

“FIGURE” = FIGURA

“Saline” = Soluzione salina

TAVOLA 10/20

Figura 10

“FIGURE” = FIGURA

“Antigen” = Antigene

“LIGHT CHAIN” = CATENA LEGGERA

“HEAVY CHAIN” = CATENA PESANTE

“Variable region” = Regione variabile

“Constant region” = Regione costante

“Glu-226 catalytic res” = Res catalitico Glu-226

TAVOLE 11-17/20

Figura 11-12

“FIGURE” = FIGURA

TAVOLA 18/20

Figura 13

“FIGURE” = FIGURA

“Antibody” = Anticorpo

“Drug” = Farmaco

“Attachment group” = Gruppo di attacco

“Protease-cleavable linker” = Linker scindibile con proteasi

“MMA cytotoxic drug” = Farmaco citotossico MMA

“Caproic acid” = Acido caproico

“Maleimidocaproyl” = Maleimidocaproile

“Valine” = Valina

“Citrulline” = Citrullina

“Spacer” = Spaziatore

“Methyl valine” = Metil valina

“Dolaleucine” = Dolaleucina

“Dolaprolina” = Dolaprolina

“Norephedrine” = Norefedrina

“mono-methyl Auristatin” = mono-metil Auristatina

TAVOLA 19/20

Figura 14

“FIGURE” = FIGURA

“Vehicle” = Veicolo

“Lymphocytes” = Linfociti

“% B cells” = % cellule B

“T cells” = Cellule T

“NK cells” = Cellule NK

TAVOLA 20/20

Figura 15

“FIGURE” = FIGURA

“Single dose TSF79” = Dose singola di TSF79

“Lymphocytes” = Linfociti

“Control” = Controllo

“Day” = Giorno

“Single dose” = Dose singola

*** **

Si attesta la perfetta conformità della traduzione che precede.

FIGURE 1

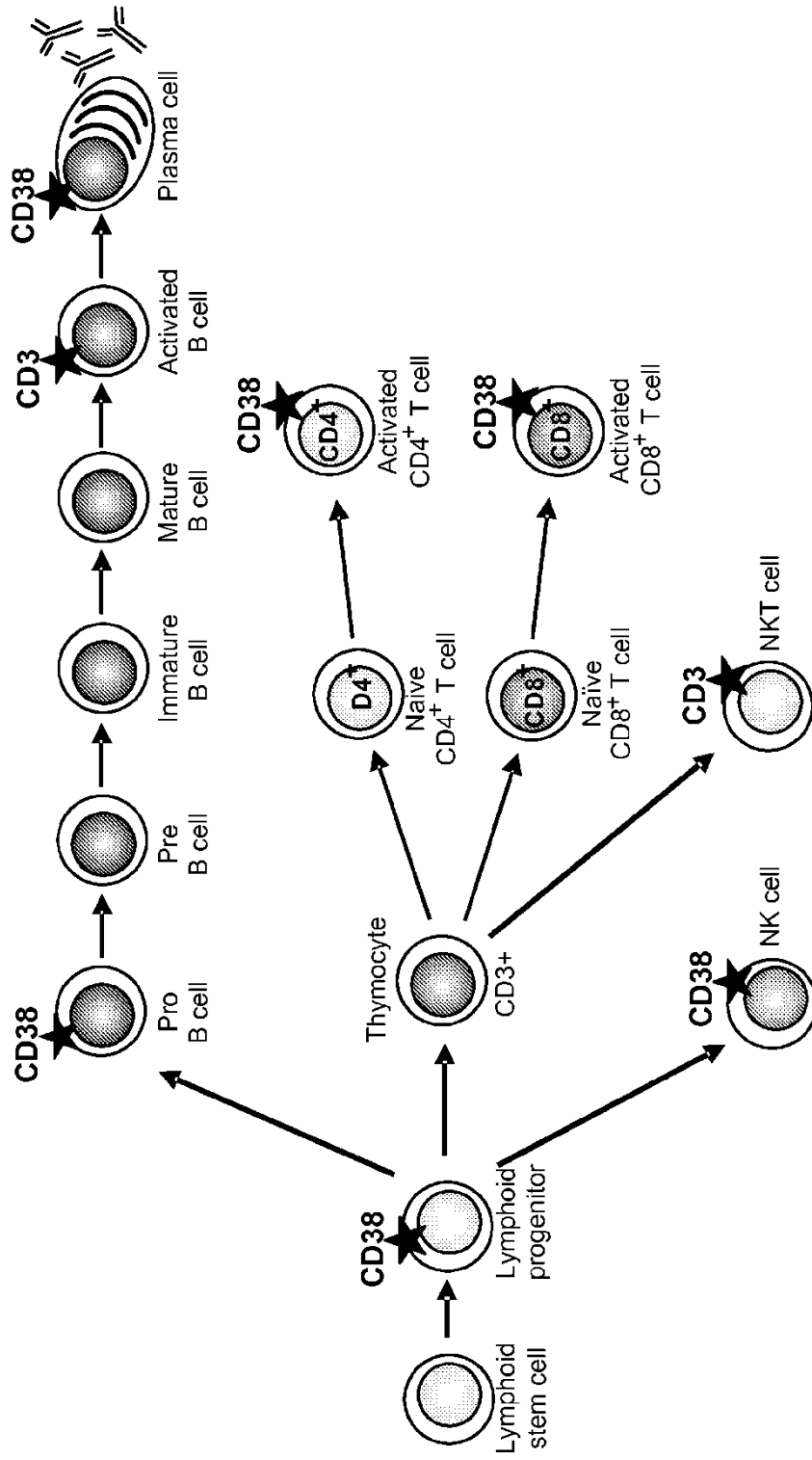


FIGURE 2**Ab79 Heavy Chain (SEQ ID NO:21)**

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFDDYGMSWVRQAPGKGLEWVSDIS
 WNGGKTHYVDSVKGQFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGSLFH
 DSSGFYFGHWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF
 PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN
 HKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP
 EVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV
 LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTK
 NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDG SFFLYSKLTVD
 KSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Ab79 Light Chain (SEQ ID NO:22)

QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGDNYVSWYQQLPGTAPKLLIYRDSQ
 RPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCQSYDSSLSGSVFVGGGTKLT
 VLGQPKANPTVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADGSPVK
 AGVETTKPSKQSN NKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAP
 TECS

Ab19 Heavy Chain (SEQ ID NO:11)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNNYDMTWVRQAPGKGLEWVAVI
 SYDGS DKDYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVYYY
 GFSGPSMDVWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY
 FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN
 HKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP
 EVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV
 LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTK
 NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDG SFFLYSKLTVD
 KSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Ab19 Light Chain (SEQ ID NO:12)

QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSNSNIGSNTVNWYQQLPGTAPKLLIYSDSN
 RPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCQSYDSSLSGSRVFGGGTKL
 TVLGQPKANPTVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADGSPV
 KAGVETTKPSKQSN NKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAP
 TECS

FIGURE 3**CD38 *Homo sapiens* (Accession NP_001766.2; SEQ ID NO:1)**

MANCEFSPVSGDKPCCRLSRRAQLCLGVSILVLILVVVLAVVVPRWRQQWSGPGTTKR
FPETVLARCVKYTEIHPEMRHVDCQSVWDAFKGAFISKHPCNITEEDYQPLMKLGTQT
VPCNKILLWSRIKDLAQFTQVQRDMFTLEDTLGLYLADDLTWCGEFNTSKINYQSCP
DWRKDCSNNPVSVFWKTVSRRFAEAACDVVHVMLNGSRSKIFDKNSTFGSVEVHNLQ
PEKVQTLAEWVIHGGREDSRDLCQDPTIKELESIISKRNIFSCKNIYRPDKFLQCVKNPE
DSSCTSEI

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

MANCEFSPVSGDKPCCRLSRRAQVCLGVCLLVLLILVVVVAVVLPWRWRQQWSGSGTTS
RFPETVLARCVKYTEVHPEMRHVDCQSVWDAFKGAFISKYPCNITEEDYQPLVKLGTQ
TVPCNKTLTWSRIKDLAQFTQVQRDMFTLEDMLLGLYLADDLTWCGEFNTFEINYQSC
PDWRKDCSNNPVSVFWKTVSRRFAETACGVVHVMLNGSRSKIFDKNSTFGSVEVHNL
QPEKVQALEAWVIHGGREDSRDLCQDPTIKELESIISKRNIRFFCKNIYRPDKFLQCVKN
PEDSSCLSGI

FIGURE 4

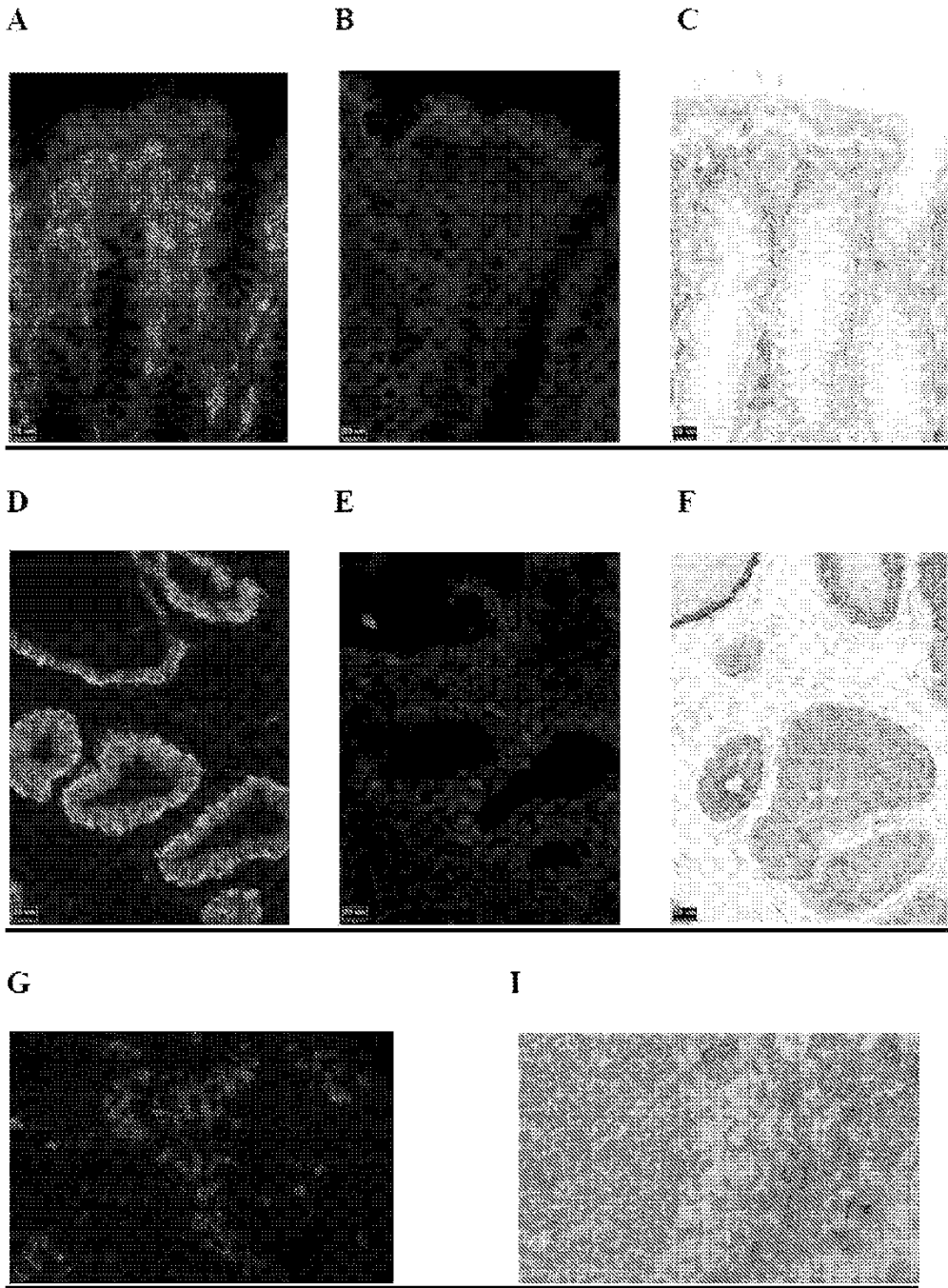
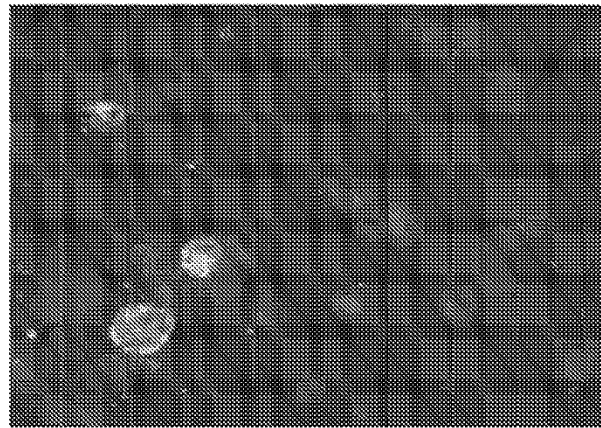


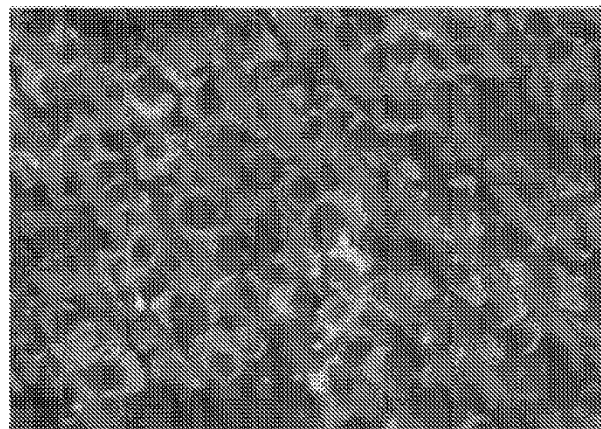
FIGURE 5

A



40X

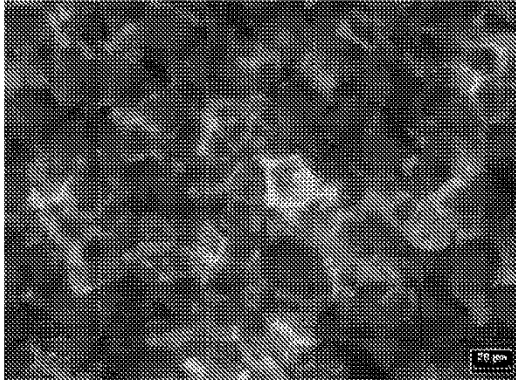
B



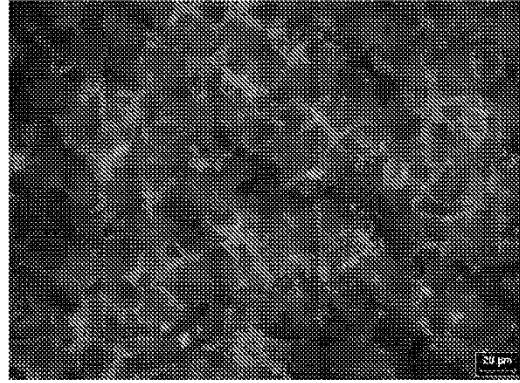
40X

FIGURE 6

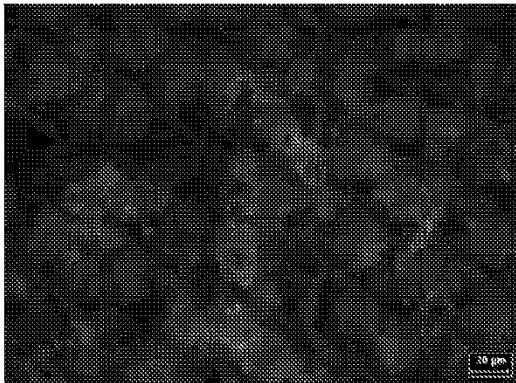
A



B



C



D

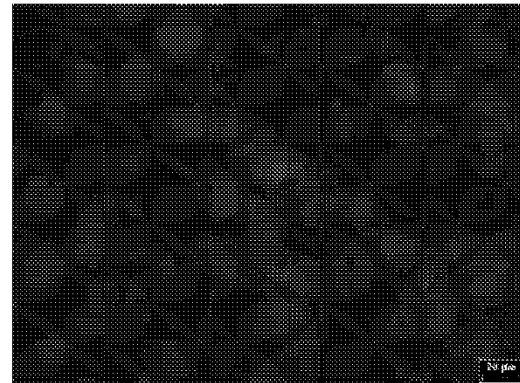


FIGURE 7

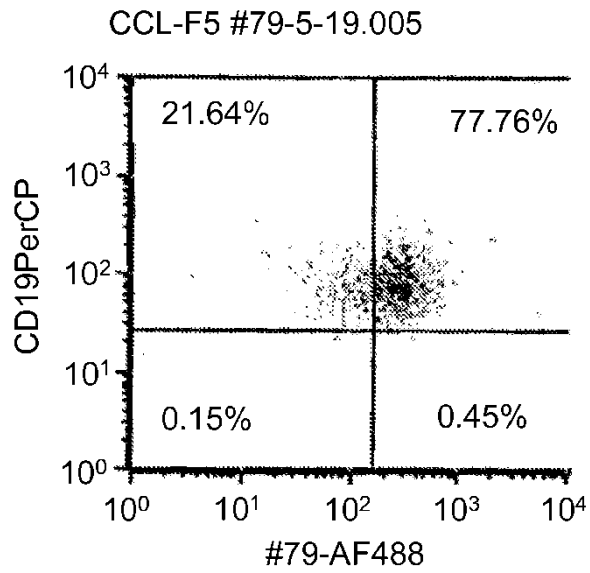
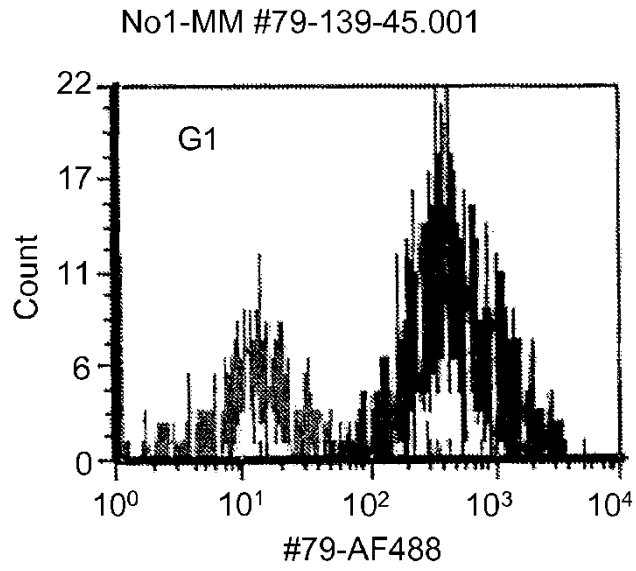


FIGURE 8

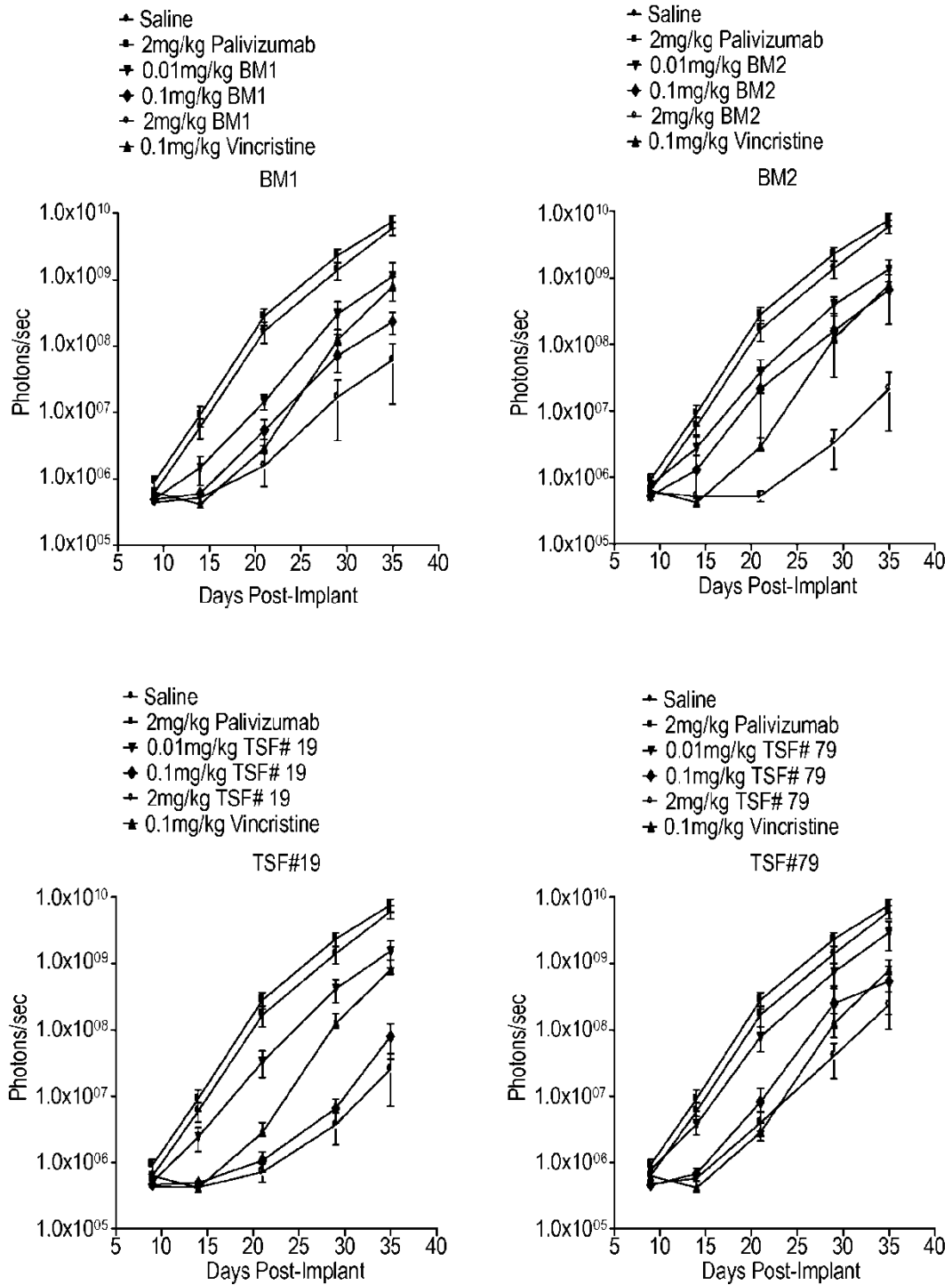
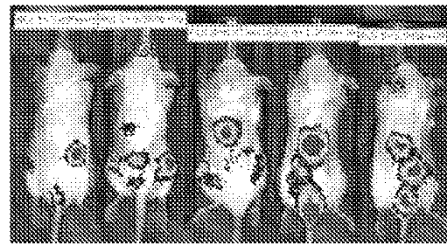


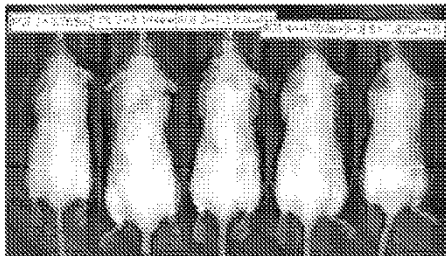
FIGURE 9



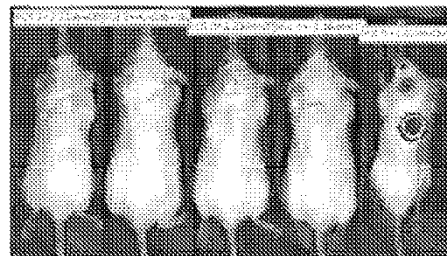
Saline



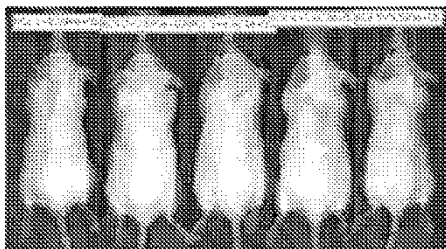
2mg/kg Palivizumab



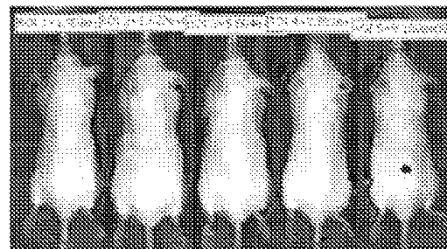
0.1 mg/kg BM1



0.1 mg/kg BM2



0.1 mg/kg TSF #19



0.1 mg/kg TSF #79

FIGURE 10

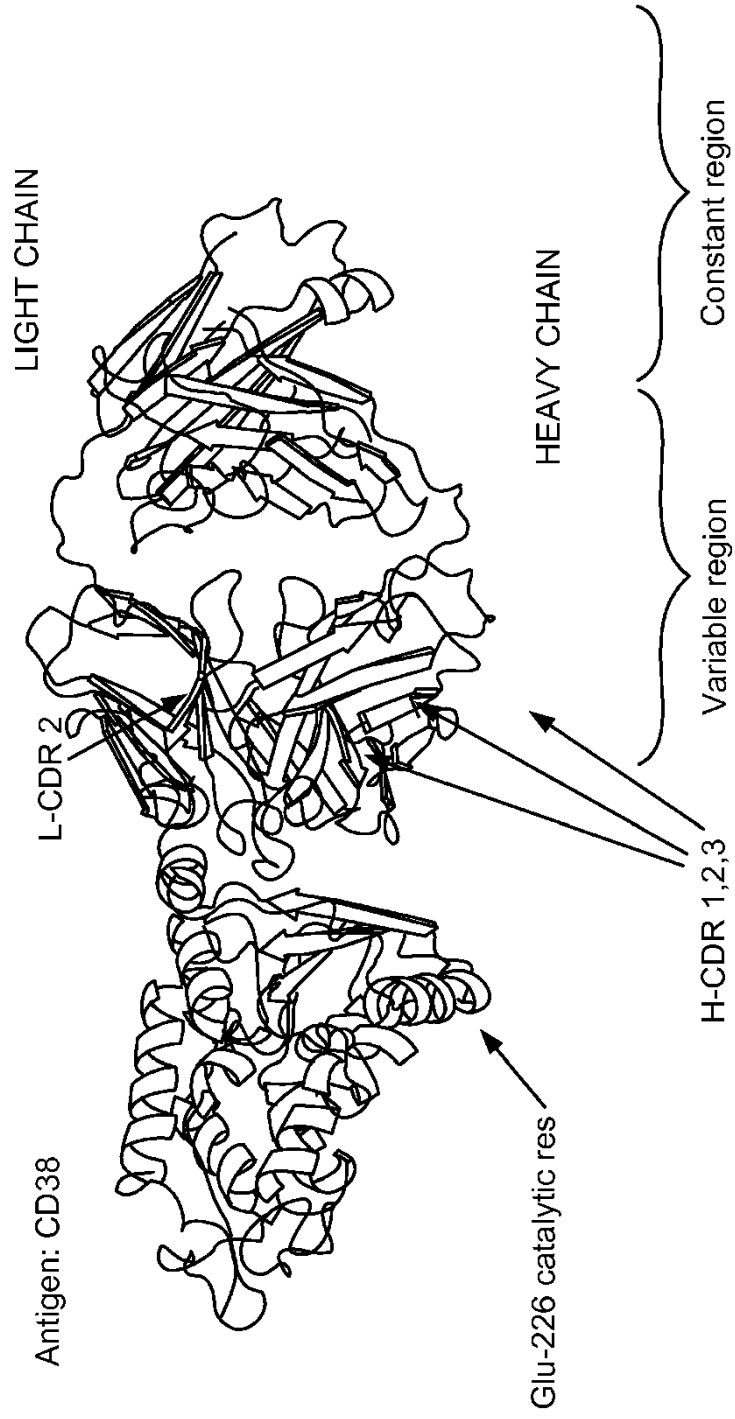


FIGURE 11

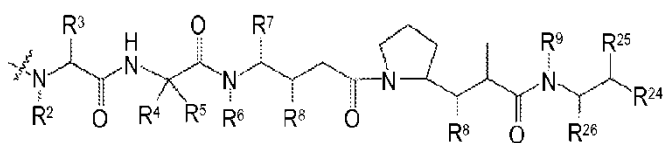
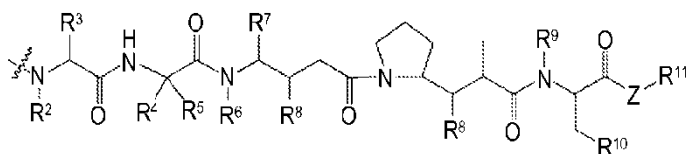
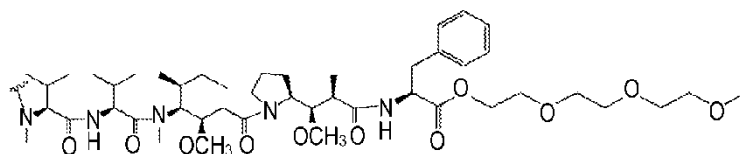
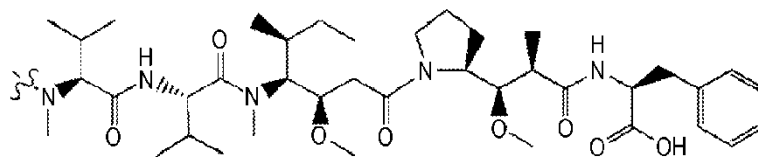
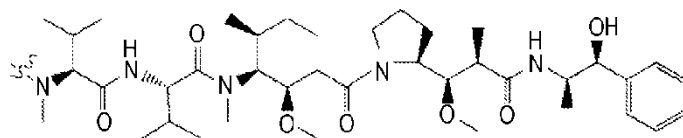
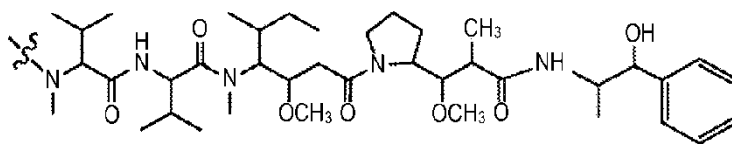
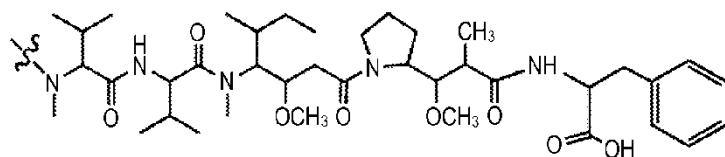
D_ED_F

FIGURE 11A

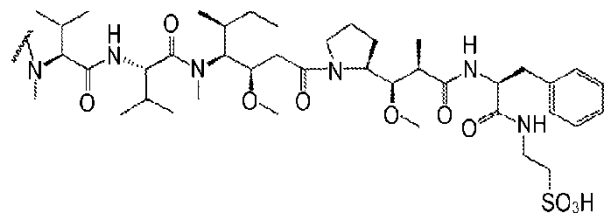
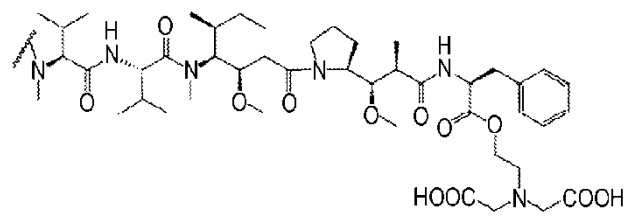
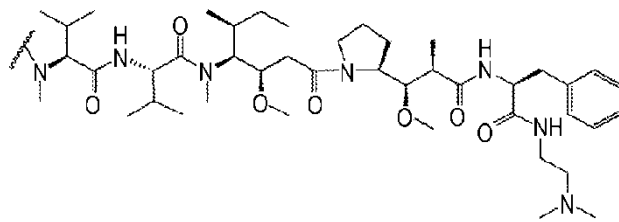
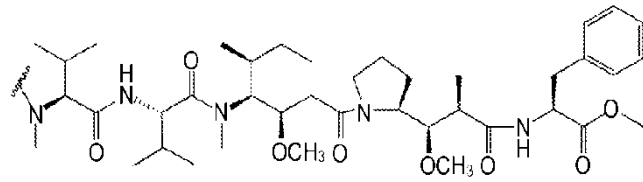
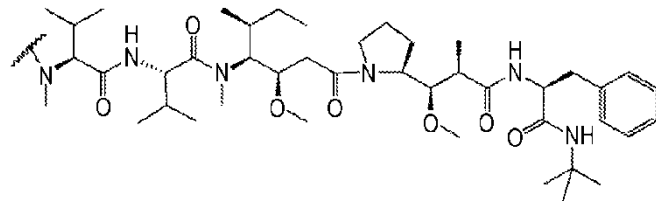
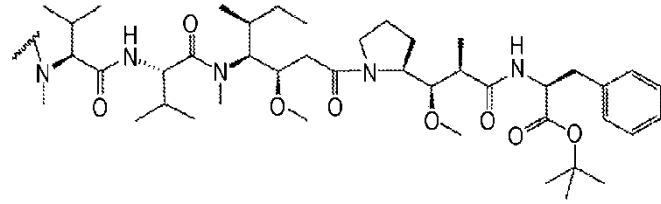


FIGURE 11B

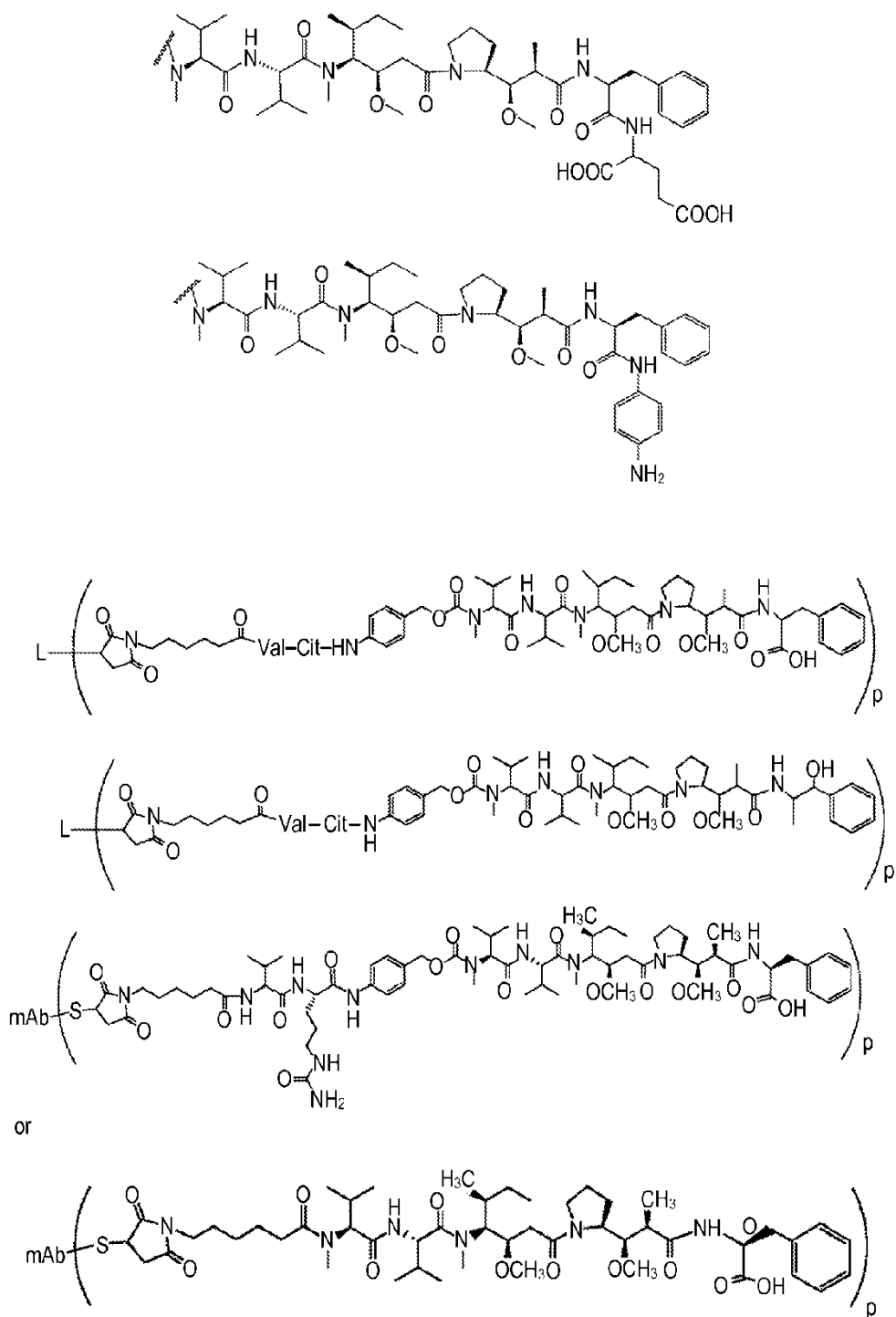
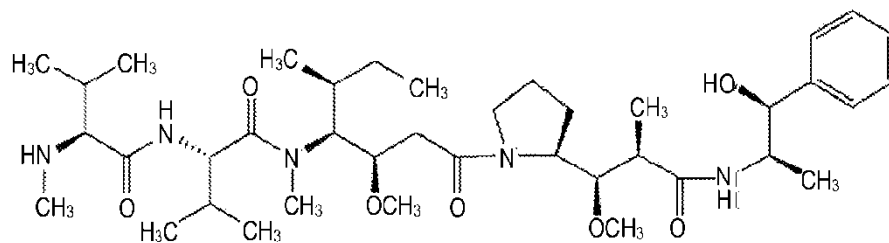
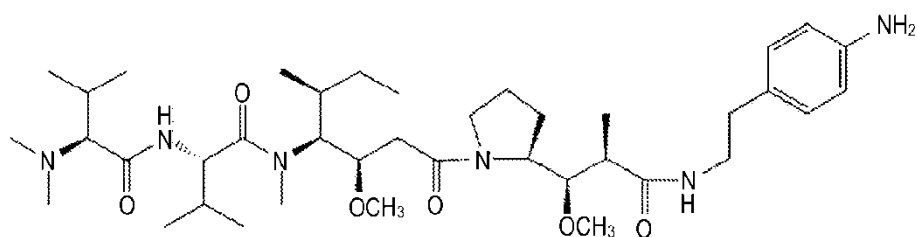


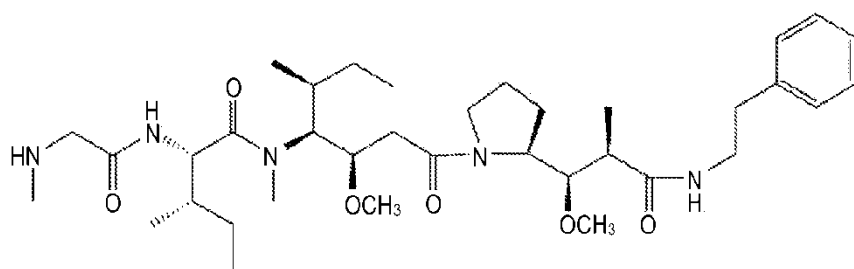
FIGURE 11C



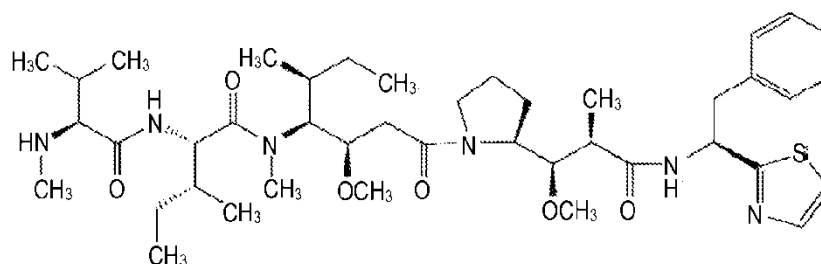
(XI)



(XII)



(XIII)



(XIV)

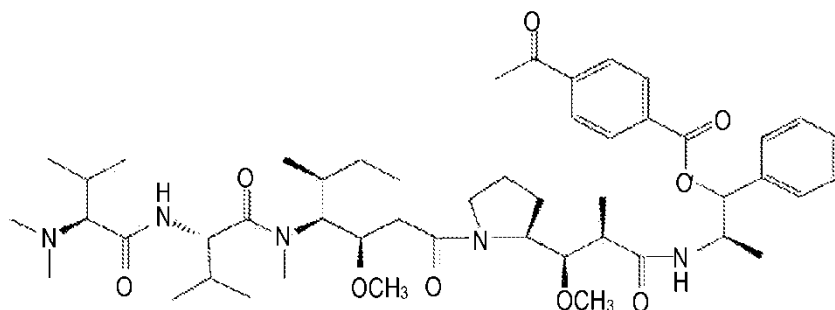
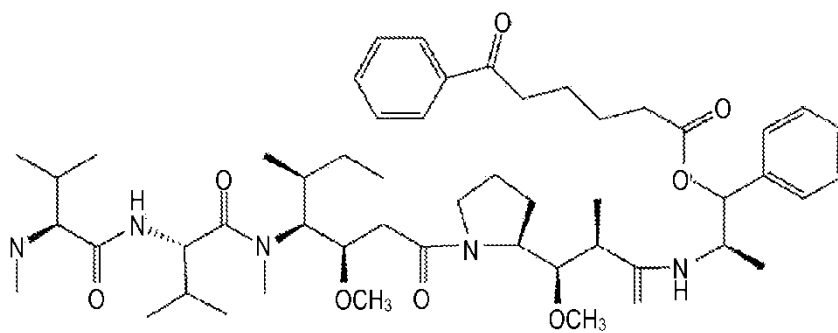
FIGURE 11E**(XX)****(XXI)**

FIGURE 12

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

FIGURE 13

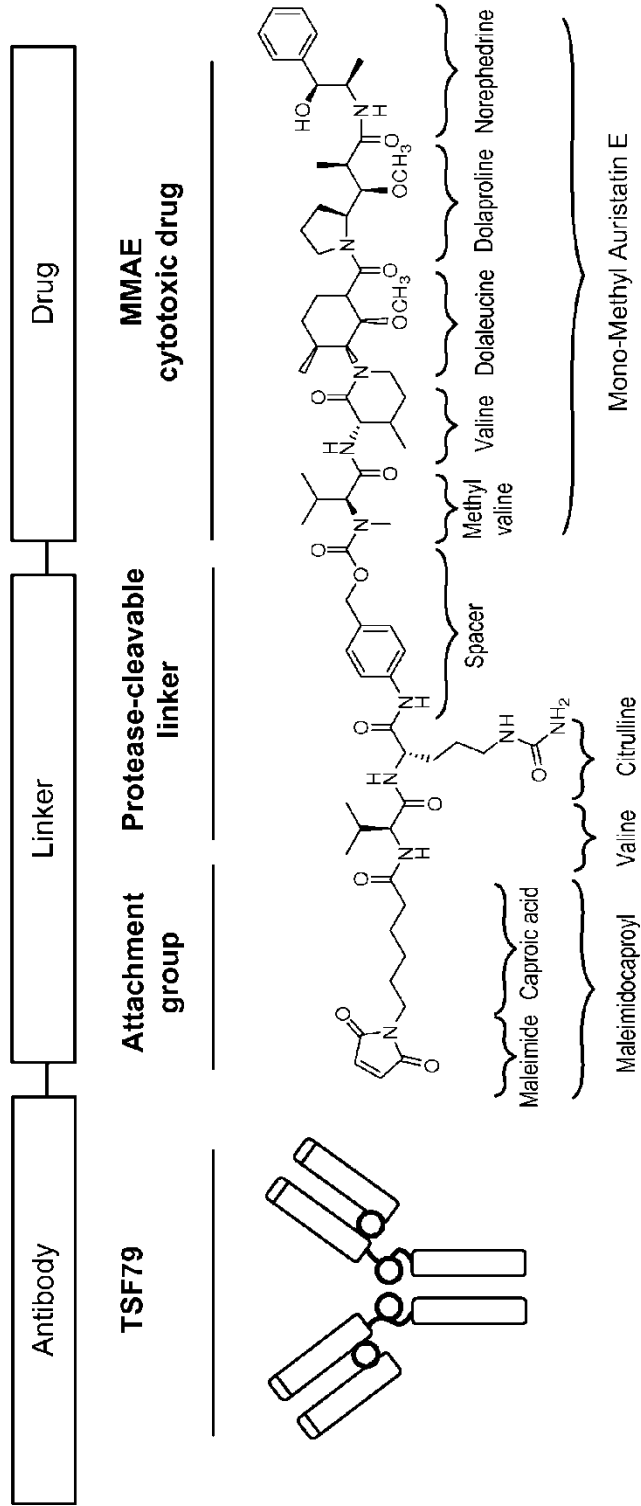


FIGURE 14

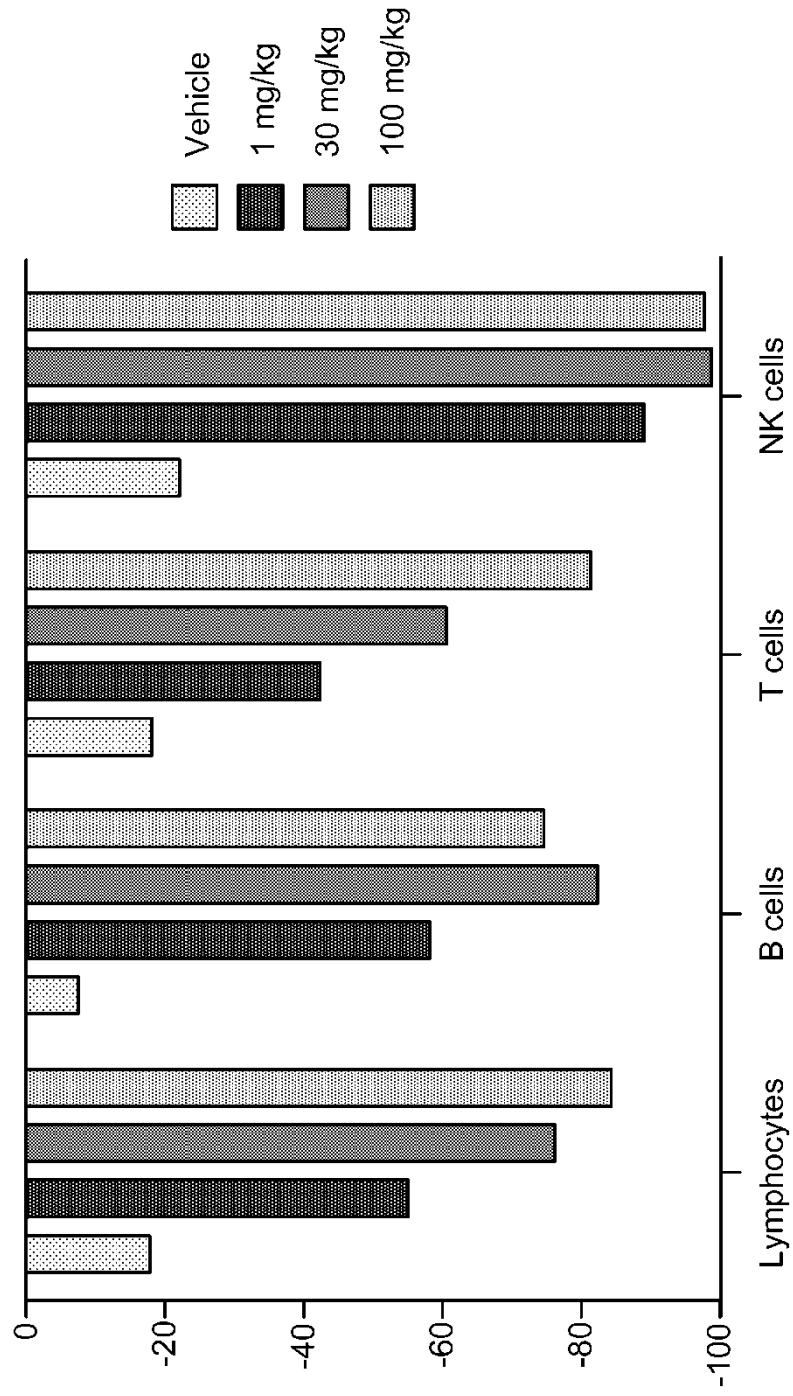


FIGURE 15

