



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 365 046**

51 Int. Cl.:  
**C07K 16/28** (2006.01) **C12N 15/13** (2006.01)  
**C12N 15/85** (2006.01) **C12N 15/10** (2006.01)  
**A61K 39/395** (2006.01) **A61P 35/00** (2006.01)  
**A61P 37/04** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06829801 .7**  
96 Fecha de presentación : **21.12.2006**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1966245**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **10.09.2008**

54 Título: **Anticuerpos anti-CD19 con inmunogenicidad reducida.**

30 Prioridad: **30.12.2005 US 755609 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**21.09.2011**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**21.09.2011**

73 Titular/es: **MERCK PATENT GmbH**  
**Frankfurter Strasse 250**  
**64293 Darmstadt, DE**

72 Inventor/es: **Super, Michael;**  
**Davis, Jonathan, H. y**  
**Stein, Pascal, André**

74 Agente: **Carvajal y Urquijo, Isabel**

ES 2 365 046 T3

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

**DESCRIPCIÓN**

Anticuerpos anti-CD19 con inmunogenicidad reducida

Campo de la invención

5 La invención hace referencia en general a regiones variables de cadena liviana y pesada del anticuerpo monoclonal murino B4 anti-CD19 modificadas para reducir su inmunogenicidad.

Antecedentes

10 La CD19 es una proteína de superficie que se encuentra en las células B y en ciertas células cancerígenas derivadas de las células B, tales como muchos linfomas de células B. Los anticuerpos monoclonales anti-CD19 han sido generados en ratones y se muestran algo prometedores en modelos animales pre-clínicos de cáncer derivados de las células B. Sin embargo, los anticuerpos derivados de ratón generalmente son inmunogénicos en humanos. Se han desarrollado una serie de estrategias para modificar los anticuerpos derivados de ratón para minimizar su inmunogenicidad en humanos. Una estrategia tal, la quimerización, implica la fusión de las regiones variables de ratón con regiones constantes humanas. Sin embargo, las secuencias de región variable derivadas de ratón que permanecen tras la quimerización serán a menudo inmunogénicas. Otra estrategia, la humanización, implica la sustitución de las regiones armazón (FR, por sus siglas en inglés) derivadas de ratones dentro de las regiones variables con las secuencias derivadas de humanos más relacionadas, con la reversión opcional de ciertos aminoácidos al aminoácido de ratón correspondiente para mantener la actividad de unión. Sin embargo, incluso los anticuerpos humanizados pueden ser inmunogénicos, dado que las regiones determinantes de complementariedad (CDR, por sus siglas en inglés) de anticuerpos generalmente contienen epítopos de células B y epítopos de linfocitos T que son no propios. De hecho, incluso los anticuerpos completamente humanos son inmunogénicos; ésta es la base de la formación de anticuerpos anti-idiotipo durante el transcurso de una respuesta inmune. Todos estos problemas pueden aplicarse a anticuerpos anti-CD19 derivados de ratón como se aplicarían a cualquier otro tipo de anticuerpo. Por lo tanto, existe una necesidad de anticuerpos anti-CD19 con inmunogenicidad reducida.

Resumen de la invención

25 La presente invención está dirigida a un anticuerpo B4 monoclonal murino anti-CD19 que ha sido modificado para reducir su inmunogenicidad en comparación con un anticuerpo B4 tipo salvaje (*Wild type*). Más específicamente, la región variable del anticuerpo B4 de la invención se modifica para eliminar epítopos de linfocitos T potenciales. Por lo tanto, el anticuerpo B4 de la invención tiene propiedades biológicas mejoradas en comparación con los anticuerpos B4 salvajes.

30 La región armazón de cadena pesada de la inmunoglobulina no modificada tiene residuos de aminoácidos como se especifica en la SEQ ID NO:13.

La región armazón de cadena liviana de la inmunoglobulina no modificada tiene los residuos de aminoácidos de la SEQ ID NO:25.

35 La invención presenta una región variable de anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 17 y, SEQ ID NO: 29, en donde la región variable de anticuerpo se une específicamente con CD19.

En otro aspecto, la invención presenta un ácido nucleico que codifica un polipéptido según cualquiera de las realizaciones de la invención.

40 En otro aspecto, la invención presenta un método para el tratamiento de un paciente, donde el método comprende el paso de administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de un polipéptido, según cualquiera de las realizaciones de la invención, a un paciente.

En otro aspecto, la invención presenta un método para seleccionar como diana una célula con CD 19 en su superficie, donde el método comprende el paso de administrar una región variable de anticuerpo según cualquiera de las realizaciones de la invención. En una realización del método la célula es una célula tumoral.

45 En resumen, la invención hace referencia a:

- Un anticuerpo B4 diseñado y modificado correspondiente que comprende las siguientes cadenas pesadas y livianas seleccionadas del grupo:

(iv) región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 17 y región variable de cadena liviana de SEQ ID NO: 29; a la que se hace referencia.

- Una molécula de ADN que codifica el anticuerpo B4 diseñado y modificado como se especifica con anterioridad y a continuación.
- 5
- Un vector de expresión que comprende una molécula de ADN correspondiente.
  - Una célula huésped que expresa dicho anticuerpo B4 diseñado y modificado.
  - Una composición farmacéutica apropiada para el tratamiento del cáncer y enfermedades autoinmunes que comprende una cantidad farmacológicamente efectiva del anticuerpo como se especifica con anterioridad y a continuación, opcionalmente junto con un disolvente, portador o excipiente farmacéuticamente aceptable.
- 10
- Uso de una composición farmacéutica correspondiente para la elaboración de un medicamento para el tratamiento de enfermedades autoinmunes o cáncer.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 muestra la secuencia de ácido nucleico que codifica la región variable de cadena pesada del anticuerpo B4 (B4 VH0) (SEQ ID NO:1).

- 15
- La figura 2 muestra la secuencia de ácido nucleico que codifica una región variable de cadena pesada del anticuerpo B4 a modo de ejemplo que incorpora codones para las mutaciones Q5E, R19K, L20V, R40T, Q43K, K65D, S85D, S88A, y V93T (B4 VHv4) (SEQ ID NO:5).

La figura 3 muestra la secuencia de ácido nucleico que codifica la región variable de cadena liviana del anticuerpo B4 (B4 VK0) (SEQ ID NO:8).

- 20
- La figura 4 muestra la secuencia de ácido nucleico que codifica una región variable de cadena liviana del anticuerpo B4 a modo de ejemplo que incorpora codones para las mutaciones I10T, M11 L, V19A, S51D, y L53T (B4 VKv4) (SEQ ID NO:12).

La figura 5 muestra la secuencia de aminoácidos de región variable de cadena pesada del anticuerpo B4 (B4 VH0) (SEQ ID NO:13).

- 25
- La figura 6 muestra la secuencia de aminoácidos de una región variable de cadena pesada del anticuerpo B4 con las mutaciones Q5E, R19K, L20V, R40T, Q43K, K65D, S85D, S88A, y V93T (B4 VHv4) (SEQ ID NO:17).

La figura 7 muestra la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena liviana del anticuerpo B4 (B4 VHK0) (SEQ ID NO:25).

- 30
- La figura 8 muestra la secuencia de aminoácidos de una región variable de cadena liviana del anticuerpo B4 a modo de ejemplo que incorpora las mutaciones I10T, M11L, V19A, S51D, y L53T (B4 VKv4) (SEQ ID NO:29).

La figura 9 muestra la secuencia de aminoácidos de región variable de cadena pesada del anticuerpo B4. Las regiones determinantes de complementariedad están subrayadas. Los residuos de aminoácidos modificables se muestran en negrita.

- 35
- La figura 10 muestra la secuencia de aminoácidos de región variable de cadena liviana del anticuerpo B4. Las regiones determinantes de complementariedad están subrayadas. Los residuos de aminoácidos modificables se muestran en negrita.

La figura 11 es una alineación de secuencia de aminoácidos de las regiones variables de cadena pesada del anticuerpo B4 VH0 (SEQ ID NO:13), VHv1 (SEQ ID NO:14), VHv2 (SEQ ID NO:15), VHv3 (SEQ ID NO:16), VHv4 (SEQ ID NO:17), VHv5 (SEQ ID NO: 18), VHv11 (SEQ ID NO:20), y VHv34 (SEQ ID NO:21).

- 40
- La figura 12 es una alineación de secuencia de aminoácidos de las regiones variables de cadena liviana del anticuerpo B4 VK0 (SEQ ID NO:25), VKv1 (SEQ ID NO:26), VKv2 (SEQ ID NO:27), VKv3 (SEQ ID NO:28), VKv4 (SEQ ID NO:29), VKv11 (SEQ ID NO: 30 y, VKv34 (SEQ ID NO:31).

La figura 13 muestra los resultados de un ensayo ADCC en células de linfoma de Burkitt (células Daudi) realizado con el anticuerpo B4 VHv4NKv4 expresado de células HEK 293T (triángulos vacíos) o de células YB2/0 (triángulos

rellenos), y anticuerpo B4 VHv5NKv4 expresado ya sea de una línea celular NS/0 (círculos vacíos) o de células YB2/0 (círculos rellenos) como se describe en el ejemplo 4.

5 La figura 14 muestra los resultados del tratamiento de ratones trasplantados con PBMC humanas tratadas con el anticuerpo B4 VHv4NKv4 de la invención (barras rayadas), anticuerpo Leu 16 (barras blancas) o PBS (barras negras) como se describe en el ejemplo 5.

La figura 15 muestra los resultados del tratamiento de ratones que tienen células de linfoma Namalwa tratadas con el anticuerpo B4 VHv4NKv4 de la invención (círculos vacíos) o PBS (estrellas) como se describe en el ejemplo 6.

10 La figura 16 muestra los resultados del tratamiento de ratones que tienen células de linfoma Daudi Burkitt tratadas con el anticuerpo B4 VHv4NKv4 de la invención (triángulos vacíos), ciclofosfamida (cuadrados vacíos), una combinación del anticuerpo B4 VHv4NKv4 y ciclofosfamida (círculos vacíos) o PBS (estrellas) como se describe en el ejemplo 7.

15 La figura 17 muestra los resultados del tratamiento de ratones que tienen células de linfoma Namalwa con el anticuerpo de la invención combinado con diferentes agentes de quimioterapia, como se describe en el ejemplo 8. En la figura 17 (a) los tratamientos son ciclofosfamida (cuadrados vacíos), el anticuerpo B4 VHv4NKv4 (X), una combinación del anticuerpo B4 VHv4NKv4 y ciclofosfamida (cuadrados rellenos) o PBS (estrellas). En la figura 17 (b) los tratamientos son vincristina (triángulos vacíos), el anticuerpo B4 VHv4NKv4 (X), una combinación del anticuerpo B4 VHv4NKv4 y vincristina (triángulos rellenos) o PBS (estrellas). En la figura 17 (c) los tratamientos son doxorubicina (círculos vacíos), el anticuerpo B4 VHv4NKv4 (X), una combinación del anticuerpo B4 VHv4NKv4 y doxorubicina (círculos rellenos) o PBS (estrellas).

20 Descripción detallada de la invención

La invención proporciona mutaciones dentro de un anticuerpo B4 que tienen el efecto de reducir la inmunogenicidad de un anticuerpo B4, principalmente mediante la eliminación de epítopos de linfocitos T dentro del B4 que pueden estimular una respuesta inmune.

25 La presente invención está dirigida a un conjunto de regiones variables de cadena pesada (VH) y cadena liviana (VK) de anticuerpo modificadas del anticuerpo B4 anti-murino anti-CD19 (Nadler et al., (1983) J. Immunol. 130:2947 - 2951; Roguska et al., (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:969 - 973), que en la presente invención se denominan de manera genérica "B4 VHvX" y "B4 VKvY", respectivamente. Para referencia, la secuencia de la región variable de cadena pesada del anticuerpo B4 murino original (B4 VH0) y la secuencia de las regiones variables de cadena liviana del anticuerpo B4 murino original (B4 VK0), con las CDR subrayadas, se muestran en las figuras 9 y 10, respectivamente.

35 En comparación con los polipéptidos de B4 VH0 y B4 VK0 originales, los polipéptidos de B4 VHv4 y B4 VKv4 tienen inmunogenicidad reducida, principalmente mediante la eliminación de epítopos de linfocitos T dentro de estos polipéptidos que pueden estimular una respuesta inmune. Conforme a la invención, las composiciones de proteínas que contienen las formas modificadas de las regiones variables de B4 son menos inmunogénicas cuando se administran a un humano, pero siguen siendo competentes para unirse específicamente a CD19 y para dirigirse a células que expresan CD19.

40 Como se utiliza en la presente invención, los términos "Regiones determinantes de complementariedad" y "CDR" se entiende que significan regiones hipervariables o bucles de una región variable de inmunoglobulina que interactúan principalmente con un antígeno. La región variable de cadena pesada (VH) de la inmunoglobulina y la región variable de cadena liviana (VK) de la inmunoglobulina contienen ambas tres CDR interpuestas entre regiones armazón, como se muestra en las figuras 9 y 10, respectivamente. Por ejemplo, con referencia a la secuencia de aminoácidos que define la región variable de cadena pesada de la inmunoglobulina del anticuerpo B4 como se muestra en la figura 34 (SEQ ID NO:13), las CDR se definen por las secuencias de aminoácidos de Ser31 a His35 (CDR1), de Glu50 a Asn59 (CDR2), y de Gly99 a Tyr109 (CDR3). Con referencia a la secuencia de aminoácidos que define la región variable de cadena liviana de la inmunoglobulina del anticuerpo B4 como se muestra en la figura 35 (SEQ ID NO: 25), las CDR se definen por las secuencias de aminoácidos de Ser24 a His33 (CDR1), de Asp49 a Ser55 (CDR2), y de His88 a Thr94 (CDR3).

50 Como se utilizan en el presente documento, los términos "Regiones armazón" y "FR" hacen referencia a regiones de una región variable de la inmunoglobulina adyacente a las Regiones determinantes de complementariedad. La región variable de cadena pesada (VH) de la inmunoglobulina y la región variable de cadena liviana (VK) de la inmunoglobulina contienen cada una cuatro regiones armazón, como se muestra en las figuras 34 y 35. Por ejemplo, con referencia a la secuencia de aminoácidos que define la región variable de cadena pesada de inmunoglobulina del anticuerpo B4 como se muestra en la figura 34 (SEQ ID NO: 13, las FR se definen mediante las secuencias de aminoácidos de Gln1 a Thr30 (FR1), de Trp36 a Gly49 (FR2), de Tyr60 a Arg98 (FR3), y de Trp110 a Ser120 (FR4).

Con referencia a la secuencia de aminoácidos que define la región variable de cadena liviana de inmunoglobulina del anticuerpo B4 como se muestra en la figura 35 (SEQ ID NO: 25, las FR se definen mediante las secuencias de aminoácidos de Gln1 a Cys23 (FR1), de Trp34 a Tyr48 (FR2), de Gly56 a Cys87 (FR3), y de Phe95 a Lys104 (FR4). Además, los residuos de aminoácidos que se indican en negrita en las figuras 34 y 35 son residuos de aminoácidos que pueden mutarse según diferentes realizaciones de la invención.

Los epítomos de linfocitos T pueden identificarse mediante una variedad de métodos informáticos y no informáticos, que incluyen predicciones basadas en modelización por ordenador basado en la estructura, o por síntesis de péptidos y pruebas de unión a moléculas MHC de Clase II específicas o en un ensayo de inmunogenicidad. Según la invención, un epítomo potencial de linfocitos T es una secuencia que, cuando se considera como un péptido aislado, ha de unirse a una molécula MHC de Clase II o un equivalente en una especie no humana. Un epítomo potencial de linfocitos T se define sin considerar otros aspectos del proceso antigénico, tales como la eficiencia de la captación de proteínas dentro de las células que presentan antígenos, la eficiencia de la división en los sitios en una proteína intacta para producir un péptido que pueda unirse a un MHC de Clase II y otros. De este modo, el conjunto de epítomos de linfocitos T que se presentan realmente sobre un MHC de Clase II tras la administración de una proteína a un animal es un subconjunto de los epítomos potenciales de linfocitos T. De acuerdo con la invención, un epítomo de linfocitos T es un epítomo sobre una proteína que interactúa con una molécula MHC de clase II. Sin intención de estar sujeto a una teoría, se entiende que un epítomo de células T es una secuencia de aminoácidos en una proteína que no se sometió al proceso de selección negativa de linfocitos T durante el desarrollo de linfocitos T, y por lo tanto se espera que sea presentada mediante una molécula MHC de Clase II y que se reconozca por un receptor de linfocitos T.

De acuerdo con una realización, la invención proporciona métodos relacionados con la reducción de la inmunogenicidad de las regiones VH de B4 y VK de B4. De acuerdo con una realización de la invención, los epítomos potenciales de linfocitos T no propios se identifican en secuencias de VH de B4 o VK de B4. Por ejemplo, los epítomos potenciales de linfocitos T no propios se identifican mediante métodos informáticos basados en el modelado de enlace de péptidos a moléculas MHC de Clase II. Las sustituciones a residuos de aminoácidos específicos se realizan de modo tal que la habilidad de los péptidos que contienen epítomos potenciales de linfocitos T para el enlace con MHC de Clase II se reduce o se elimina.

Secuencias de proteínas modificadas de regiones variables de la invención

De acuerdo con una realización, el efecto de una mutación o mutaciones de aminoácidos específicos se predice en base al modelado por ordenador basado en estructura. Por ejemplo, ProPred (<http://www.imtech.res.in/raghava/propred>; Singh and Raghava (2001) *Bioinformatics* (Bioinformática) 17:1236 - 1237) es una herramienta basada en Internet disponible al público que puede utilizarse para la predicción de los péptidos que unen alelos HLA-DR. ProPred se basa en un algoritmo de predicción de matriz descrito por Sturniolo para un conjunto de 50 alelos HLA-DR (Sturniolo et al., (1999) *Nature Biotechnol.* 17:555- 561). Al utilizar tal algoritmo, se descubrieron varias secuencias de péptidos dentro de VH de B4 y VK de B4 que se predijo que se unen a múltiples alelos del MHC de clase II y son por lo tanto probablemente inmunogénicas. Estas secuencias de péptidos y su predicha frecuencia de unión a alelos HLA-DR se muestran en la Tabla 1.

Con referencia a la Tabla 1, se indica la secuencia de cada péptido 9-mer que se une a al menos 5 alelos HLA-DR, junto con su posición (#) en la región VH de B4 (columna izquierda) o la región VK de B4 (columna derecha). "Frec. de unión" hace referencia a la cantidad de alelos, de 50 alelos posibles, que el péptido une, por encima de un umbral de unión arbitrario, en este caso 20%. Una frecuencia de unión de "+" indica que el péptido se une a 5-9 alelos, "++" indica que el péptido se une a 10-19 alelos, y "+++" indica que el péptido se une a 20-50 alelos. El umbral de unión de 20% es relativo a una puntuación de unión teórica máxima, calculada por un algoritmo descrito por Sturniolo et al.

Tabla 1. Péptidos seleccionados de regiones V de B4 que se predice que se unen a alelos HLA-DR humanos.

Epítomos de linfocitos T de VH (pos. inicial)	Frec. de unión	Epítomos de linfocitos T de VK (pos. inicial)	Frec. de unión
(2) VQLQQPGAE	+	(2) IVLTQSPAI	+++
(12) VKPGASVRL	+	(3) VLTQSPAIM	++
(18) VRLSCKTSG	+++	(19) VTMTCSASS	+

(continuación)

Epítomos de linfocitos T de VH (pos. inicial)	Frec. de unión	Epítomos de linfocitos T de VK (pos. inicial)	Frec. de unión
(36) WVKQRPGQG	+	(29) VNYMHWYQQ	+
(60) YNQKFKGKA	+	(46) WIYDTSKLA	++
(64) FKGKAKLTV	+++	(47) IYDTSKLAS	+
(80) YMEVSSLTS	++		
(93) VYYCARGSN	+		

5 Estas secuencias potencialmente inmunogénicas en los polipéptidos VH de B4 y VK de B4 VK pueden hacerse menos inmunogénicas mediante la introducción de mutaciones específicas que reducen o eliminan la unión de un péptido particular a un alelo HLADR humano (véase, por ejemplo, WO98/52976 y WO00/34317). De manera alternativa, los epítomos de linfocitos T no humanos se mutan para que correspondan a epítomos propios humanos presentes en anticuerpos de cepas microbianas humanas (véase por ejemplo US 5,712,120). Puede obtenerse una guía para la selección de mutaciones apropiadas mediante referencia a la estructura terciaria y cuaternaria de regiones variables de anticuerpos. Las estructuras cristalinas de dominios variables de anticuerpo son conocidas en el arte y se encontró que las estructuras de las FR generalmente son muy similares unas a otras. Un modelo teórico de la región variable de anticuerpo del anticuerpo B4 anti-CD 19 VH0/VK0 puede construirse a partir de las regiones variables de cadena pesada y liviana de anticuerpo relacionadas más cercanas para las cuales se ha determinado una estructura, que pueden identificarse a partir de una alineación de estructura primaria (Altschul et al., (1990) J. Mol. Biol. 215:403- 415). Un algoritmo de reconocimiento de plegamiento se utiliza para aplicar un modelo de las cadenas pesada y liviana de B4 en las estructuras resueltas (Marti-Renom et al., (2000) Annu Rev Biophys Biomol Struct 29:291-325), y las estructuras plegadas pueden refinarse más para obtener energías estereoquímicamente favorables (Weiner et al., (1984) J Am Chem Soc 106:765-784). Se encontró que las estructuras de cadena pesada y liviana disueltas designadas respectivamente por sus códigos de acceso de la base de datos PDB 1 FBL (fragmento Fab del anticuerpo monoclonal F9.13.7) y 1MIM (fragmento Fab del anticuerpo quimérico anti-CD25 Sdz Chi621) resultaron estructuras de referencia útiles para este fin.

Las mutaciones preferentes no interfieren de manera indebida con la expresión, plegado o actividad de las proteínas. Según la invención, los aminoácidos en las posiciones Q5, V12, R19, L20, K23, T24, K38, R40, G42, Q43, K65, K69, S85, S88, o V93 en B4 VH y los aminoácidos en las posiciones Q1, V3, S7, 110, M11, V19, V29, S51, L53, A54, o S75 en B4 VK pueden mutarse y retener la capacidad del anticuerpo de expresarse y unirse a CD19 a niveles comparables con la forma no modificada de B4. Por lo tanto, la invención abarca anticuerpos B4 que tienen al menos una modificación en la secuencia VH seleccionada del grupo de posiciones de aminoácidos que consisten en Q5, V12, R19, L20, K23, T24, K38, R40, G42, Q43, K65, K69, S85, S88, y V93 y/o que tienen al menos una modificación en la secuencia VK seleccionada del grupo de posiciones de aminoácidos que consisten en Q1, V3, S7, 110, M11, V19, V29, S51, L53, A54, y S75.

30 Una lista no exhaustiva de las posiciones específicas que se descubrió toleran sustituciones de aminoácidos según la invención se presenta en la Tabla 2, junto con sustituciones a modo de ejemplo de esas posiciones.

Tabla 2. Sustituciones en las regiones V de B4.

Posición en VH de B4	Sustitución	Posición en VK de B4	Sustitución
Gln5	Glu	Gln1	Asp
Val12	Lys	Val3	Ala
Arg19	Lys	Ser7	Glu
Leu20	Val	Ile 10	Thr
Lys23	Glu, Asp	Met11	Leu
Thr24	Ala	Val19	Ala
Lys38	Arg	Val29	Ala
Arg40	Ala, Thr	Ser51	Asp
Gly42	Asp, Glu	Leu53	Thr
Gln43	Lys	Ala54	Asp
Lys65	Asp, Glu	Ser75	Glu
Lys69	Glu, Asp		
Ser85	Asp, Glu		
Ser88	Ala		
Val93	Thr		

Un conjunto de realizaciones incluye sustituciones de aminoácidos en el polipéptido B4 VH, seleccionados de QSE, V12K, R19K, L20V, K23E, T24A, K38R, R40T, G42D, Q43K, K65D, K69E, S85D, S88A, y V93T. Además, las sustituciones contempladas son K23D, G42E, K65E y K69D. También se descubrió que son útiles combinaciones particulares de mutaciones. Se incluyen R40T, Q43K, K65D, S85D, S88A, y V93T, como se ejemplifica en B4 VHv4 (SEQ ID NO:17).

Otro conjunto de realizaciones incluye sustituciones de aminoácidos en el polipéptido B4 VH, seleccionados de Q1D, V3A, S7E, I10T, M11L, V19A, V29A, S51 D, L53T, A54D, y S75E. En una realización específica, se incluye la sustitución A54D. También se descubrió que son útiles combinaciones particulares de mutaciones.

Una alineación de estructura primaria de algunas secuencias a modo de ejemplo de B4 VHvx y B4 VKvx de la invención, descritas con anterioridad, se muestran en las Figuras 11 y 12, respectivamente. Los aminoácidos que aparecen en negrita son posiciones de VH0 y VK0 que pueden mutarse según la invención, y los aminoácidos subrayados representan CDR. VHv1 - VHv34 y VKv1 - VKv34 son cadenas pesadas y livianas representativas, respectivamente, con sustituciones de aminoácidos específicas que reducen la inmunogenicidad.

Las composiciones de región variable de la invención incluyen al menos una cadena pesada o una cadena liviana de la invención. En una realización específica, la región variable contiene B4 VHv4 (SEQ ID NO:17) y B4 VKv4 (SEQ ID NO:29).

Verificación de la inmunogenicidad reducida de las regiones variables de la invención.

Para verificar que una mutación de la invención efectivamente produjo como resultado inmunogenicidad reducida, pueden emplearse pruebas experimentales estándares, que son conocidas en el arte. Por ejemplo, puede utilizarse un ensayo de estimulación de linfocitos T (por ejemplo, Jones et al., (2004), J. Interferon Cytokine Res., 24:560). En tal ensayo, las células mononucleares de sangre periférica (PBMC, por sus siglas en inglés) se obtienen y cultivan conforme a condiciones estándares. Después de una pre-estimulación opcional, un péptido correspondiente a un epítipo potencial de MHC de Clase II se agrega al cultivo de PBMC; las PBMC se incuban y con posterioridad se agrega timidina tritiada. El péptido puede ser un 9-mer mínimo, o puede tener de 10 a 15 o más de 15 aminoácidos. Después de la incubación de las células, la incorporación de timidina tritiada en el ADN se mide mediante técnicas estándares.

Se cree que el ensayo de estimulación de linfocitos T funciona mediante los siguientes mecanismos. En primer lugar, si se utiliza un péptido como estimulador, el péptido debe unirse primero a una molécula MHC de Clase II presente en una célula entre las PBMC. En segundo lugar, el complejo MHC de Clase II/péptido debe interactuar de manera productiva con un receptor de linfocitos T en una célula CD4+ T. Si el péptido de prueba no puede unirse lo suficientemente a una molécula MHC de Clase II, no se producirá ninguna señal. Si el péptido puede unirse a una molécula MHC de Clase II, y hay linfocitos T que expresan un receptor de linfocitos T reordenado de manera apropiada, capaz de reconocer un complejo MHC de Clase II/péptido, deberá producirse una señal. Sin embargo, si se han detectado tales linfocitos T como resultado de un proceso de selección negativa, no se producirá ninguna señal. Estos mecanismos se consideran relevantes para la inmunogenicidad de una secuencia de proteína, según se infiere de la estimulación o falta de estimulación por un péptido dado.

Si están presentes linfocitos T de reconocimiento en cantidades muy bajas en la población de PBMC por razones estocásticas asociadas a que no tuvo lugar un receptor de linfocitos T apropiado o a la proliferación de otro, linfocitos T no relacionados seguidos de homeostasis de la población de linfocitos T, también puede no haber señal aunque se espere una señal. Por lo tanto, puede haber resultados de falso negativos. Teniendo en cuenta estas consideraciones, es importante utilizar un gran número de diferentes fuentes de PBMC y probar estas muestras de manera independiente. También es por lo general útil probar las PBMC de un grupo de humanos de diferentes etnias y determinar los alelos de MHC de Clase II presentes en cada población de PBMC.

El ensayo de linfocitos T estándar tiene la desventaja de que la señal de incorporación de tritio habitualmente es sólo dos veces mayor que la incorporación de fondo. Las proteínas y péptidos de la invención también pueden probarse en un ensayo de linfocitos T modificados en el cual, por ejemplo, se co-cultivan linfocitos T CD4+ y células dendríticas purificadas en presencia del péptido de prueba, tras lo cual se someten a exposición de timidina tritiada y después se prueba para la incorporación de timidina tritiada. Este segundo ensayo tiene la ventaja de que la incorporación de timidina tritiada en células irrelevantes, tales como linfocitos T C8+, es esencialmente eliminada y el fondo se reduce.

Un tercer ensayo implica probar una proteína candidata con inmunogenicidad en un animal tal como un primate. Tal ensayo generalmente implicaría probar una composición de proteína B4 VHvx/VKvy, tal como un anticuerpo, que se ha diseñado mediante la prueba de péptidos componentes individuales para la inmunogenicidad potencial en un ensayo basado en células, tal como el que se describe con anterioridad. Se diseña una composición de proteína B4 VHvx/VKvy tal y se expresa, se prueba la inmunogenicidad de la proteína mediante su inyección en un animal.

La inyección de la composición de proteína B4 VHvx/VKvy se realiza en la misma forma que la vía anticipada de administración durante la utilización terapéutica en humanos. Por ejemplo, puede utilizarse la vía de administración por inyección intradérmica, subcutánea, intramuscular, intraperitoneal o por infusión intravenosa. Si se utiliza más de una administración, las administraciones pueden ser por diferentes vías.

- 5 Para los fines de prueba de inmunogenicidad, puede ser útil co-administrar un adyuvante para incrementar la señal y minimizar la cantidad de animales necesarios. Si se utiliza un adyuvante, es posible utilizar un adyuvante que no tenga un componente de proteína, tal como ADN con dinucleótidos CpG no metilados, lípido A bacteriano, N-formilmetionina u otros componentes bacterianos no proteínas. Sin intención de estar sujeto a una teoría, el razonamiento para evitar adyuvantes que contengan proteínas es que otras proteínas pueden proporcionar epítopos de linfocitos T que contribuirán en última instancia a una respuesta del anticuerpo contra la proteína candidata.

Después de una o más administraciones de la composición de proteína B4 VHvx/VKvy candidata, la presencia de anticuerpos anti-idiotipo se prueba según técnicas estándares, tales como el método ELISA. Se encontró que las composiciones de proteína B4 VHvx/VKvy de la invención inducen la formación de anticuerpos con menor frecuencia, y en menor medida, que las moléculas correspondientes que contienen secuencias B4 VH/VK originales.

- 15 Otras configuraciones de las regiones variables de la invención

Además de la utilización de las regiones V de la invención en un anticuerpo desnudo, también es posible configurar las regiones V de la invención en proteínas de fusión de anticuerpo que tienen como diana toxinas, estimuladores inmunes, y otras proteínas, así como Fab, Fv de una sola cadena, anticuerpos bi-específicos y otras configuraciones conocidas en el arte de la ingeniería de anticuerpos.

- 20 En ciertas realizaciones de la invención, la región variable de cadena liviana y la región variable de cadena pesada pueden acoplarse, respectivamente, a una región constante de cadena liviana y una región constante de cadena pesada de una inmunoglobulina. Las cadenas livianas de inmunoglobulina tienen regiones constantes que están diseñadas como cadenas kappa o lambda. En una realización particular de la invención, la región constante de cadena liviana es una cadena kappa. Las regiones constantes de cadena pesada y diversas modificaciones y combinaciones de éstas se discuten con posterioridad en más detalle.

#### Porción Fc

- Los dominios variables de anticuerpo de la presente invención opcionalmente se fusionan a una porción Fc. Como se utiliza en el presente documento, la porción Fc engloba dominios derivados de la región constante de cadena pesada de una inmunoglobulina, preferentemente una inmunoglobulina humana, incluyendo un fragmento, análogo, variante, mutante o derivado de la región constante. La región constante de una cadena pesada de inmunoglobulina se define como un polipéptido natural o producido de manera sintética homólogo a al menos una porción de la región C-terminal de la cadena pesada, incluyendo los dominios CH1, bisagra, CH2, CH3 y, para algunas clases de cadena pesada, los dominios CH4. La región "bisagra" une el dominio CH1 a la región CH2-CH3 de una porción Fc. La región constante de las cadenas pesadas de todas las inmunoglobulinas de mamíferos exhibe una gran similitud en cuanto a la secuencia de aminoácidos. Las secuencias de ADN para estas regiones de inmunoglobulina son conocidas en el arte. (Véase, por ejemplo, Gillies et al. (1989) J. Immunol. Meth. 125: 191).

- En la presente invención, la porción Fc habitualmente incluye al menos un dominio CH2. Por ejemplo, la porción Fc puede incluir toda la región constante de cadena pesada de inmunoglobulina (CH1-bisagra-CH2-CH3). De manera alternativa, la porción Fc puede incluir toda o una parte de la región bisagra, el dominio CH2 y el dominio CH3. La región constante de una inmunoglobulina es responsable de muchas funciones efectoras de anticuerpos importantes, incluyendo aquellas mediadas por unión al receptor Fc (FcR) y unión de complementos. Existen cinco clases principales de región constante de cadena pesada, clasificadas como IgA, IgG, IgD, IgE, and IgM, cada una con funciones efectoras características designadas por isotopo.

- El IgG, por ejemplo, se separa en cuatro isotopos  $\gamma$ :  $\gamma 1$ ,  $\gamma 2$ ,  $\gamma 3$ , y  $\gamma 4$ , conocidos también como IgG1, IgG2, IgG3, y IgG4, respectivamente. Las moléculas IgG pueden interactuar con múltiples clases de receptores celulares incluyendo tres clases de receptores Fc $\gamma$  (Fc $\gamma$ R) específicos para la clase IgG de anticuerpo, a saber, Fc $\gamma$ R1, Fc $\gamma$ R2, y Fc $\gamma$ R3. Se ha indicado que las secuencias importantes para la unión de IgG a los receptores Fc $\gamma$ R están en los dominios CH2 y CH3.

- Funciones efectoras de anticuerpos ampliamente reconocidas, en particular de la clase IgG, incluyen citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) y citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC). Todas las subclases de IgG (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4) median en la CDC y ADCC en cierto grado, y IgG1 e IgG3 son las más potentes para ambas actividades (Capítulo 3, Tabla 3 en Paul, Essential Immunology 4.sup.th Ed., p. 62). Se cree que la CDC se produce por múltiples mecanismos; un mecanismo se inicia cuando un anticuerpo se une a un antígeno en una superficie celular. Una vez formado el complejo antígeno-anticuerpo, se cree que la molécula C1q se une al

complejo antígeno-anticuerpo. C1q se divide después para iniciar una cascada de activación enzimática y división de otras proteínas complementarias que se unen a la superficie celular diana y facilita su muerte a través de, por ejemplo, lisis celular y/o ingestión de un macrófago. Se cree que la ADCC se produce cuando los receptores Fc en células citotóxicas, tales como linfocitos agresores naturales (células NK, del inglés Natural killer), macrófagos y neutrófilos, se unen a la región Fc de anticuerpos unidos a antígeno en una superficie celular. La unión del receptor Fc señala a la célula citotóxica destruir la célula diana. De manera característica, las células NK, que se cree que son los mediadores principales de ADCC, expresan sólo FcγIIIa.

Habitualmente, es útil alterar las funciones efectoras de un anticuerpo. Por ejemplo, para tratar cánceres asociados con la malignidad de las células B o para tratar enfermedades autoinmunes con un componente de células B, es útil mejorar la actividad ADCC del anticuerpo. Puede ser particularmente útil mejorar la actividad ADCC de un anticuerpo dirigido a los antígenos de superficie de células B presentes en una densidad relativamente baja (Niwa et al., (2005) Clin. Cancer Res. 11:2327-2336), tal como a CD19. Se cree que la densidad de antígeno de CD19 en comparación con CD20 en la superficie de células B es aproximadamente diez veces menor. Las alteraciones en anticuerpos que incrementan la actividad ADCC de un anticuerpo con respecto a su anticuerpo original son conocidas en el arte, y en general se correlacionan con modificaciones que incrementan la afinidad de unión del anticuerpo de variante a FcγRIII (véase por ejemplo, la patente estadounidense N° 6,737,056). Por ejemplo, las mutaciones introducidas en la región Fc en una o más posiciones (con referencia a su posición en IgG1) seleccionadas de 256, 290, 298, 312, 326, 330, 333, 334, 339, 360, 378 y 430 (numeración conforme a Kabat et al. Sequences of Proteins of Immunological Interest (Secuencias de proteínas de interés inmunológico), 1991). Las mutaciones preferentes están en una o más posiciones seleccionadas de 298, 333 y 334. Por ejemplo, pueden introducirse sustituciones de alanina.

La actividad ADCC del anticuerpo también se ve influenciada por la línea celular concreta utilizada para producir el anticuerpo. Por ejemplo, los anticuerpos producidos en las células de mieloma NS/0 de ratón (o células SP2/0) generalmente tienen ADCC baja y los anticuerpos producidos en células de mieloma YO (o YB2/0) tienen alta ADCC (Lifely et al., (1995) Glycobiology (Glicobiología) 5:813 - 822). Se conoce en el arte que el tipo de línea celular utilizada para la expresión de anticuerpos afecta la estructura de carbohidrato de la cadena glicosil N-ligada, que está adherida a la región Fc del anticuerpo en la posición correspondiente a N297 en IgG1. La estructura de carbohidrato de anticuerpos producida en las células CHO es sometida a fucosilación, mientras que la cadena de carbohidrato de anticuerpos producida en YB2/0 está en su mayor parte libre de fucosa (Shinkawa et al., (2003) JBC 278:3466- 3473). Los anticuerpos que no tienen fucosa en la estructura de carbohidrato se unen a FcγRIIIa humana con mayor afinidad (Shields et al., (2002) JBC 277:26733-26740). En algunas realizaciones, los anticuerpos anti-CD19 con regiones variables de la invención se caracterizan por tener fucosilación reducida en la cadena glicosil N-ligada de la porción Fc del anticuerpo.

Habitualmente, también es útil alterar la vida media en suero del anticuerpo. La vida media en suero del anticuerpo, como de una proteína de fusión de inmunoglobulina, se ve influenciada por la capacidad del anticuerpo de unirse a un receptor Fc (FcR) (Gillies et al., Cancer Research (Investigación del cáncer) (1999) 59:2159-66). Los dominios CH2 y CH3 de IgG2 e IgG4 tienen afinidad de unión no detectable o reducida a receptores Fc comparados con aquellos de IgG1. Por lo tanto, la vida media en suero del anticuerpo en cuestión puede incrementarse mediante la utilización del dominio CH2 y/o CH3 de los isotipos IgG2 o IgG4. De manera alternativa, el anticuerpo puede incluir un dominio CH2 y/o CH3 de IgG1 o IgG3 con modificación de uno o más aminoácidos en estos dominios para reducir la afinidad de unión para receptores Fc (véase, por ejemplo, la solicitud de patente estadounidense ser. N° 09/256.156, publicada como publicación de solicitud de patente estadounidense 2003-0105294.)

La región bisagra de la porción Fc normalmente colinda con el extremo C-terminal del dominio CH1 de la región constante de cadena pesada. Cuando se incluye en las proteínas de la presente invención, la bisagra es homóloga a una región de inmunoglobulina que ocurre naturalmente y habitualmente incluye residuos de cisteína que unen dos cadenas pesadas a través de enlaces disulfuro como en inmunoglobulinas naturales. Las secuencias representativas de regiones bisagra para inmunoglobulina humana y de ratón puede encontrarse en "ANTIBODY ENGINEERING, a PRACTICAL GUIDE" (Ingeniería de anticuerpos, una guía práctica), (Borrebaeck, ed., W. H. Freeman and Co., 1992).

Las regiones bisagra adecuadas para la presente invención pueden derivarse de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, y otros isotipos de inmunoglobulina. El isotipo IgG1 tiene dos enlaces disulfuro en la región bisagra que permiten la formación de un enlace disulfuro eficiente y consistente. Por lo tanto, una región bisagra preferente de la presente invención se deriva de IgG1. De manera opcional, la primera, cisteína más N-terminal de una bisagra IgG1 se muta para mejorar la expresión y ensamblaje de anticuerpos o proteínas fusión de anticuerpos de la invención (véase, por ejemplo, la solicitud de patente estadounidense ser. N° 10/093.958, publicada como publicación de solicitud de patente estadounidense 2003-0044423.)

A diferencia de gG1, se conoce que la región bisagra de IgG4 forma enlaces disulfuro de entre cadenas de manera ineficiente (Angal et al., (1993), Mol. Immunol. 30:105 -8). Además, la región de bisagra de IgG2 tiene cuatro enlaces disulfuro que tienden a promover la oligomerización y posiblemente uniones disulfuro incorrectas durante la

secreción en sistemas recombinantes. Una región bisagra adecuada para la presente invención puede derivarse de la región bisagra de IgG4, preferentemente que contiene una mutación que mejora la formación correcta de enlaces disulfuro entre las fracciones derivadas de cadena pesada (Angal et al., (1993), Mol. Immunol. 30 (1): 105-8). Otra región bisagra preferente se deriva de una bisagra de IgG2 en la cual las dos primeras cisteínas se mutaron ambas a otro aminoácido, tal como, en orden de preferencia general, serina, alanina, treonina, prolina, ácido glutámico, glutamina, lisina, histidina, arginina, asparagina, ácido aspártico, glicina, metionina, valina, isoleucina, leucina, tirosina, fenilalanina, triptofano o selenocisteína (véase, por ejemplo, la publicación de solicitud de patente estadounidense 2003-0044423).

Una porción Fc fusionada a una región variable de anticuerpo de la invención puede contener dominios CH2 y/o CH3 y una región bisagra derivadas de diferentes isotipos de anticuerpo. Por ejemplo, la porción Fc puede contener dominios CH2 y/o CH3 de IgG2 o IgG4 y una región bisagra de IgG1. En ensamblaje de tales porciones Fc híbridas se ha descrito en la publicación de solicitud de patente estadounidense 2003-0044423.

Cuando se fusiona con una región variable de anticuerpo de la invención, la porción Fc puede contener una o más modificaciones de aminoácidos que en general extienden la vida media en suero de una proteína de fusión Fc. Tales modificaciones de aminoácidos incluyen mutaciones que sustancialmente disminuyen o eliminan la actividad de unión al receptor Fc o fijación de complemento. Por ejemplo, un tipo de tales mutaciones elimina el sitio de glicosilación de la porción Fc de una cadena pesada de inmunoglobulina. En IgG1, el sitio de glicosilación es Asn297 (véase, por ejemplo, la solicitud de patente estadounidense ser. N° 10/310.719, publicada como publicación de solicitud de patente estadounidense 2003-0166163.)

Las regiones variables de anticuerpo de la invención pueden adherirse a un agente de diagnóstico y/o terapéutico. El agente puede fusionarse al anticuerpo para producir una proteína de fusión. De manera alternativa, el agente puede acoplarse químicamente al anticuerpo que produce un inmunoconjugado. El agente puede ser, por ejemplo, una toxina, radioetiqueta, agente trazador, fracción inmunoestimuladora o similar.

Las regiones variables de anticuerpo de la invención pueden adherirse a una citocina. Las citocinas preferentes incluyen interleucinas tales como interleucina-2 (IL-2), IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-10, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, IL-16, IL-18, IL-21, e IL-23, factores hematopoyéticos tales como factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos (GM-CSF, por sus siglas en inglés), factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF, por sus siglas en inglés) y eritropoyetina, factores de necrosis tumoral (TNF, por sus siglas en inglés) tales como TNF $\alpha$ , linfocinas, tales como linfotóxina, reguladores de procesos metabólicos tales como leptina, interferones tales como interferón  $\alpha$ , interferón  $\beta$  e interferón  $\gamma$ , y quimiocinas. Preferentemente, la proteína de fusión citocina-anticuerpo o inmunoconjugado muestra actividad biológica de citocina. En una realización, los dominios variables de anticuerpo se fusionan a IL-2. Preferentemente, diferentes aminoácidos dentro de la fracción IL-2 se mutan para reducir la toxicidad, como se describe en la publicación de solicitud de patente estadounidense 2003-0166163.

De manera opcional, los complejos de proteína pueden incluir un segundo agente, tal como una segunda citocina. En una realización, una proteína de fusión de anticuerpo B4 VHvx/VKvy incluye IL-12 e IL-2. La construcción de complejos de proteína que contienen un dominio de inmunoglobulina y dos citocinas diferentes se describe en detalle en la patente estadounidense N° 6,617,135

#### Producción de anticuerpos

Los anticuerpos de la invención, y otras proteínas que contienen regiones variables de la invención, se producen mediante métodos conocidos en el arte de la ingeniería de proteínas. Los vectores de ácido nucleico capaces de expresar una cadena pesada y una cadena liviana que incluyen secuencias de la invención se introducen en la célula apropiada y el producto de proteína recombinante se expresa y purifica. Por ejemplo, los anticuerpos de la invención pueden producirse en líneas celulares de mamíferos diseñadas tales como células NS/0, células CHO, células SP2/0 (SP2/0-Ag14; ATCC-CRL 1581), células YB2/0 (YB2/3HL.P2.G11.16Ag.20; ATCC CRL-1662), u otras células de mamíferos conocidas en el arte de la producción de anticuerpos. En una realización, los anticuerpos B4 VHvx/VKvy se producen en células NS/0. En otra realización, los anticuerpos B4 VHvx/VKvy se producen en células YB2/0. De manera alternativa, pueden utilizarse levadura, plantas, células de insectos o bacterias para producir proteínas que contienen regiones variables de la invención.

#### Administración

Los anticuerpos de la invención se utilizan preferentemente para tratar pacientes con trastornos en las células B tales como linfomas de células B o trastornos autoinmunes con un componente de células B tal como artritis reumatoidea, miastenia gravis, esclerosis múltiple, lupus eritematoso sistémico y otros. Para el linfoma de células B, según el criterio del médico, puede ser útil para tratar a un paciente para quien otras terapias no han sido exitosas. Por ejemplo, algunos pacientes tratados con Rituxan™ pueden responder bien en un principio, pero pueden surgir

células cancerígenas resistentes a Rituxan™. Tales pacientes responderían bien en general a los anticuerpos de la invención.

5 En el caso de los anticuerpos dirigidos contra CD19, a veces es útil quitar las células B normales del cuerpo, ya que estas células son propensas a producir la titración del anticuerpo de la invención. Rituxan™ puede utilizarse con este fin, según procedimientos estándares. De manera alternativa, los anticuerpos anti-CD19 de la invención pueden utilizarse para eliminar las células B normales del cuerpo, por ejemplo, como se describe en el Ejemplo 5 y en el Ejemplo 9.

10 La infusión es el método de administración preferente. Otros métodos de administración incluyen la inyección por vías tales como la subcutánea, intradérmica, intramuscular, intraperitoneal o intravenosa (bolus). También son posibles métodos de administración la inhalación o la administración por vía oral.

Para un humano de 70 kilogramos, una dosis habitual se encuentra en un rango de aproximadamente 50 miligramos a 2 gramos, con una dosis preferente en el rango de aproximadamente 400 - 600 miligramos. La dosificación puede repetirse aproximadamente una vez cada tres a seis semanas, por ejemplo, con un control de las células B normales y las células tumorales durante este período.

15 Las proteínas de fusión de la presente invención son útiles en el tratamiento de enfermedades humanas, tales como el cáncer. Al tratar el cáncer, es útil por ejemplo administrar una proteína de fusión IL-2-anticuerpo que comprenden las regiones variables de la invención por infusión o inyección subcutánea, utilizando dosis de 0,1 a 100 miligramos/metro<sup>2</sup>/paciente. En una realización preferente, es particularmente útil administrar una proteína de fusión IL-2-anticuerpo que comprende las regiones variables de la invención por infusión o inyección subcutánea, utilizando  
20 dosis de 1 a 10 miligramos/metro<sup>2</sup>/paciente, y más preferentemente de aproximadamente 3 a 6 miligramos/metro<sup>2</sup>/paciente.

25 Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden utilizarse en la forma de formas de dosis sólidas, semi-sólidas o líquidas, tal como, por ejemplo, píldoras, cápsulas, polvos, líquidos, suspensiones, o similares, preferentemente en formas de unidad de dosis apropiadas para la administración de dosis precisas. Las composiciones incluyen un portador o excipiente farmacéutico convencional y, además, pueden incluir otros agentes medicinales, agentes farmacéuticos, portadores, adyuvantes, etc. Tales excipientes pueden incluir otras proteínas, tales como, por ejemplo, albúmina de suero humano o proteínas de plasma. Los métodos reales de preparación de tales formas de dosis son conocidos o serán evidentes para los expertos en el arte. La composición o formulación a ser administrada contendrá, en cualquier caso, una cantidad del componente o componentes activos en una  
30 cantidad efectiva para lograr el efecto deseado en el sujeto bajo tratamiento.

La administración de las composiciones de la presente invención puede realizarse a través de cualquiera de los modos de administración aceptados para agentes que exhiben tal actividad. Estos métodos son de administración local o sistémica. La inyección intravenosa en un portador farmacéuticamente aceptable es un método preferente de  
35 administración. La cantidad de compuesto activo administrado dependerá por supuesto del paciente bajo tratamiento, la gravedad de la enfermedad, la forma de administración y el criterio del médico que realiza la prescripción.

La invención se ilustra a través de los siguientes ejemplos no limitativos. Ejemplo 1. Construcción de anticuerpos anti-CD19 que contienen cadenas pesadas y livianas de región variable de la invención

40 Se utilizaron técnicas de ingeniería genética estándares para introducir secuencias de ácido nucleico que codifican una región de cadena pesada y región de cadena liviana de la invención en un vector de expresión mamífero apropiado. A continuación se describen estrategias de clonación a modo de ejemplo. El vector de expresión pdHL12 es un vector de expresión pd HL de última generación diseñado para contener sitios de restricción únicos para la inserción de casetes de ácido nucleico que codifican regiones variables de cadena pesada y liviana. pdHL 12 está  
45 diseñado para aceptar ácidos nucleicos que codifican la región variable de cadena pesada como un fragmento Nhe I/Hind III, y ácidos nucleicos que codifican la región variable de cadena liviana como un fragmento Afl II/ Bam HI, y para co-expresar cadenas pesadas y livianas de anticuerpo intactas (véase por ejemplo la solicitud de patente estadounidense 2003/0157054).

Las secuencias de ácido nucleico de regiones variables de cadena pesada de la invención, flanqueadas por secuencias de reconocimiento de endonucleasa de restricción 5'-CTTAAGC - 3' (aguas arriba, que contienen el sitio Nhe I) y 5'-CGTAAGTGGATCC - 3' (aguas abajo, que contienen el sitio Hind III), se sintetizaron de novo y se insertaron en un plásmido portador vector-derivado pUC (Blue Heron Biotechnology, Bothell, WA). El ácido nucleico se extrae del plásmido portador como un fragmento Nhe I / Hind III y se ligó al fragmento de vector apropiado de un plásmido pdHL-12 digerido similar. Se muestran las secuencias de ácido nucleico para B4 VH0 (SEQ ID NO:1), B4  
50 VHv1 (SEQ ID NO:2), B4 VHv2 (SEQ ID NO:3), B4 VHv3 (SEQ ID NO:4), B4 VHv4 (SEQ ID NO:5), B4 VHv5 (SEQ ID NO:6), y B4 VHv6 (SEQ ID NO:7).

De manera similar, los ácidos nucleicos de regiones variables de cadena liviana de la invención, flanqueados por secuencias de reconocimiento de endonucleasa de restricción 5' - GCTAGCTCCAGC -3' (aguas arriba, que contienen el sitio Afl-II) y 5'-GGTAAGCTT - 3' (aguas abajo, que contienen el sitio Bam HI), se sintetizaron de novo y se insertaron en un plásmido portador vector-derivado pUC (Blue Heron Biotechnology, Bothell, WA). El ácido nucleico se extrae del plásmido portador como un fragmento Afl II / Bam HI y se ligó al fragmento de vector apropiado de un plásmido pdHL12 digerido similar. Se muestran las secuencias de ácido nucleico que codifican B4 VK0 (SEQ ID NO:8), B4 VKv1 (SEQ ID NO:9), B4 VKv2 (SEQ ID NO:10), B4 VKv3 (SEQ ID NO:11), y B4 VKv4 (SEQ ID NO:12).

Mediante la inserción de secuencias de ácido nucleico que codifican las diferentes regiones variables de cadena pesada y liviana de manera combinatoria en pdHL 12, se generó un panel de plásmidos que codifican anticuerpos B4 de la invención, B4 VHx/VKvy.

## **Ejemplo 2. Expresión y purificación de anticuerpos de la invención.**

Las siguientes técnicas generales se utilizaron en los Ejemplos a continuación.

### **1A. Cultivo celular y transfección**

15 Para expresar anticuerpos de manera transitoria de células de mamíferos, se introduce ADN plasmídico en células embrionarias renales humanas 293, o células de riñón de hámster bebé (BHK), mediante la co-precipitación de ADN plasmídico con fosfato de calcio y se cultivan células sin selección para mantenimiento plásmido [Sambrook et al. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual ("Clonación molecular: Un manual de laboratorio"), Cold Spring Harbor, N.Y.].

20 Los clones transfectados de manera estable se obtienen mediante uno de varios métodos estándares, por ejemplo, por electroporación o por nucleofección. La electroporación de ADN en células NS/O de mieloma de ratón se realiza de la siguiente manera. Se cultivan células NS/O en Medio del Águila Modificado de Dulbecco (DMEM, por sus siglas en inglés, Life Technologies) suplementado con 10% de suero fetal bobino, 2mM de glutamina, 1mM de piruvato de sodio y 1x de penicilina/estreptomina. Se lavaron aproximadamente  $5 \times 10^6$  células una vez con PBS y se re-suspendieron en 0,5ml de solución tamponada de fosfato (PBS). Después se incubaron diez microgramos de ADN plasmídico linearizado con las células en una cubeta Gene Pulser (0,4cm de espacio entre electrodos, BioRad) durante 10 minutos en hielo. La electroporación se realiza utilizando un Gene Pulser (BioRad) configurado a 0,25 V y microF. Las células se recuperaron durante 10 minutos en hielo, tras lo cual se re-suspendieron en medio de crecimiento y se colocaron en dos placas de 96 pozos. Se seleccionan los clones transfectados de manera estable mediante crecimiento en la presencia de 100nM de metotrexato (MTX), que se introdujo dos días después de la transfección. Las células se alimentaron cada 3 días dos o tres veces más, y los clones resistentes a MTX aparecieron generalmente en de 2 a 3 semanas. Se ensayaron supernatantes de clones mediante ELISA Fc antihumano para identificar productores altos [Gillies et al. (1989) J. Immunol. Methods 125:191]. Los clones de alta producción se aislaron y propagaron en medio de cultivo que contenía 100nM de MTX.

35 De manera similar, pueden utilizarse otras líneas celulares para obtener clones transfectados de manera estable esencialmente mediante el mismo método, tal como células CHO, células BHK, células SP2/O, y células YB2/O. Cuando se utilizan células YB2/O, generalmente se seleccionaron clones transfectados de manera estable mediante crecimiento en presencia de 50mM de MTX.

40 Los clones transfectados de manera estable, por ejemplo, de células de mieloma de rata YB2/O, también se obtuvieron mediante nucleofección. Aproximadamente  $2 \times 10^6$  YB2/O células que se hacen crecer en Medio del Águila Modificado de Dulbecco (DMEM) suplementado con calor inactivado. Se centrifugó 10% de suero fetal bobino, 2mM de glutamina, 1mM de piruvato de sodio y 1x de penicilina/estreptomina a 90xg a temperatura ambiente durante 10 min. y se re-suspendieron en 100µl de solución Nucleofactor V suplementada. Se mezcló 100µl de suspensión de células con 2µg de ADN plasmídico linearizado (linearizado en el sitio Fsp I en la secuencia β-lactamasa), transferido a una cubeta (Amaxa) y la nucleofección se realizó utilizando el programa de Nucleofector (Amaxa) apropiado, Q-20. Se añadió 500µl de medio de cultivo pre-calentado y se transfirió la muestra a un pozo de una placa de 12 pozos. Un día después de la transfección, las células se re-suspendieron en medio de crecimiento y se colocaron en placas de 96 pozos a densidades celulares que oscilaban entre aproximadamente 10 células/pozo a aproximadamente 600 células/pozo. Se seleccionan los clones transfectados de manera estable mediante crecimiento en la presencia de 50nM de metotrexato (MTX), que se introdujo dos días después de la transfección. Las células se alimentaron cada 2 ó 3 días dos veces más, y los clones resistentes a MTX aparecieron generalmente en de 2 a 3 semanas. Se ensayaron supernatantes de clones mediante ELISA Fc antihumano para identificar productores altos [Gillies et al. (1989) J. Immunol. Methods 125:191]. Los clones de alta producción se aislaron y propagaron en medio de cultivo que contenía 50nM MTX.

Las células pueden cultivarse en un medio alternativo conocido en el arte, tal como HSFM suplementado con 2,5% de suero fetal bovino y 100nM de metotrexato, o un medio libre de proteína tal como un medio CD.

## 1B. ELISA

- 5 Se utilizaron diferentes ELISA para determinar las concentraciones de productos de proteína en los supernatantes de clones resistentes a MTX y otras muestras de ensayo. Por ejemplo, se utiliza el ELISA Fc anti-hu para medir la cantidad de proteínas que contienen Fc humana, por ejemplo, anticuerpos quiméricos, y el ELISA kappa anti-hu se utiliza para medir la cantidad de cadena liviana kappa (de inmunoglobulinas quiméricas o humanas).

El ELISA anti-huFc se describe en detalle a continuación.

### A. Placas de recubrimiento

- 10 Las placas de ELISA se recubrieron con IgG (H+L) anti-humana de cabra AffiniPure (Jackson Immuno Research) en una proporción de 5 microgramos/ml en PBS, y 100µl/pozo en placas de 96 pozos (placa Nunc-Immuno Maxisorp). Las placas recubiertas se cubrieron e incubaron a 4°C durante toda la noche. Después se lavaron las placas 4 veces con 0,05% Tween (Tween 20) en PBS y se bloquearon con BSA al 1% /suero de cabra al 1% en PBS, microlitro/pozo. Después de la incubación con tampón de bloqueo a 37°C durante 2 horas, las placas se lavaron 4 veces con 0,05% Tween en PBS y se secaron suavemente en toallas de papel.

### B. Incubación con Muestras de ensayo y anticuerpo secundario

- 20 Las muestras de prueba se diluyen a concentraciones apropiadas en tampón de muestra, que contiene BSA al 1%/suero de cabra al 1%/Tween al 0,05% en PBS. Se prepara una curva estándar con un anticuerpo quimérico (con una Fc humana), cuya concentración se muestra. Para preparar una curva estándar, se realizan diluciones en serie en el tampón de muestra para dar una curva estándar que oscila entre 125ng/ml a 3,9ng/ml. Las muestras diluidas y estándares se agregan a la placa, 100 microlitros/pozo, y las placas se incuban a 37°C durante 2 horas.

- 25 Después de la incubación, la placa se lavó 8 veces con Tween al 0,05% en PBS. A cada pozo se agregaron 100 microlitros del anticuerpo secundario, IgG antihumana conjugada con peroxidasa de rábano (HRP) (Jackson Immuno Research), diluida aproximadamente 1:120.000 en el tampón de muestra. La dilución exacta del anticuerpo secundario debe determinarse para cada lote de IgG antihumana conjugada con HRP. Después de la incubación a 37°C durante 2 horas, la placa se lavó 8 veces con Tween al 0,05% en PBS.

### C. Desarrollo

- 30 La solución del sustrato se agrega a la placa en una proporción de 100µl/pozo. La solución de sustrato se prepara disolviendo 30mg de o-fenilendiamina dihidrocloruro (OPD) (1 tableta) en 15ml de 0,025M de ácido cítrico/0,05M de tampón Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 5 que contiene 0,03% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> recién agregado. Se permitió que el color se revelara durante 30 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad. El tiempo de revelado puede variar según la variabilidad de las placas recubiertas de lote a lote, el anticuerpo secundario, etc. Se observó el revelado del color en la curva estándar para determinar cuándo detener la reacción. La reacción se detuvo añadiendo 4N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 100µl/pozo. Un lector de placa lee la placa, que se fija a 490nm y 650nm y se programa para sustraer la densidad óptica (DO) de fondo en 35 650nm de la DO en 490nm.

El ELISA anti-hu kappa siguió el mismo procedimiento descrito con anterioridad, excepto en que el anticuerpo secundario utilizado es kappa anti-hu de cabra conjugado con peroxidasa de rábano (Southern Biotechnology Assoc. Inc., Birmingham, AL), utilizado en una dilución 1:4000.

### Purificación

- 40 Se procedió a realizar los procedimientos de purificación de anticuerpo estándares. Habitualmente, las composiciones de anticuerpo B4 VHvxNKvy de la invención se purificaron a partir de supernatantes de cultivo de células a través de cromatografía de proteína A basada en la afinidad de la porción Fc para la proteína A. El supernatante condicionado a partir de células que expresan composiciones del anticuerpo B4 VHvx/VKvy se cargó en una columna pre-equilibrada de Sefarosa de proteína A de flujo rápido. La columna se lavó de manera exhaustiva con tampón de fosfato de sodio (50mM de fosfato de sodio, 150mM de NaCl a pH neutro). Se eluyó la proteína unida 45 por un tampón de fosfato de sodio (composición como se indica con anterioridad) de pH bajo (pH 2,5-3) y las fracciones eluidas se neutralizaron de inmediato a un pH de aproximadamente 6,5 con 1M de Tris base. Las composiciones de almacenaron en 50mM de fosfato de sodio, 150 mM de NaCl, pH 6,5 suplementado con Tween 80 al 0,01%.

La pureza e integridad del producto se evaluó de manera habitual mediante cromatografía de exclusión por tamaños HPLC y por SDS-PAGE. Los resultados mostraron que los anticuerpos B4 VHvx/VKvy de la invención habitualmente fueron superiores al 90% sin agregado e intactos, con poca evidencia de productos de degradación.

5 **Ejemplo 3. Determinación de afinidad de unión relativa de anticuerpos B4 de la invención a células que presentan CD-19.**

Para garantizar que los anticuerpos de la invención conservaran la unión a CD19 se utilizó un ensayo de competición, en el cual se midió la fuerza de estos anticuerpos para inhibir la unión del anticuerpo B4 original etiquetado (B4 VH0NK0) a células del linfoma de Daudi, que tienen el antígeno CD19.

10 Se preparó anticuerpo B4 VH0/VK0 etiquetado con biotina utilizando el kit de biotilación EZ-link Sulfo-NHS-LC - Biotin (Pierce, # 21430) conforme al protocolo suministrado. El producto se dializó con un Slide-a-lyzer (Pierce, # 66425), y se analizó con cromatografía de exclusión por tamaños HPLC.

15 De manera breve, se preparó una serie de titración del anticuerpo B4 VH0/VK0 etiquetado con biotina premezclado con una concentración final de 100 ng/ml con uno de los anticuerpos B4 VHvxNKvy experimentales sin etiquetar a 800 ng/ml, 400 ng/ml, 200 ng/ml, 100 ng/ml, y 50 ng/ml en un tampón de PBS / suero al 2 %. Como control, el anticuerpo etiquetado con biotina se pre-mezcló con el anticuerpo B4 VH0/VK0 sin etiquetar en las mismas concentraciones que se indican con anterioridad (control de inhibición) o sólo con tampón (control positivo de unión). Los anticuerpos combinados se agregaron a células Daudi durante 30 minutos a 4°C. Se agregó una disolución de 1:200 de streptavidin etiquetado con FITC a las células y las muestras se incubaron durante otros 30 minutos a 4°C. La cantidad de unión de anticuerpo B4 VH0/VK0 etiquetado se cuantificó mediante el análisis FACS, y los resultados se expresan como "porcentaje de inhibición", con respecto al control positivo de unión. Los anticuerpos probados fueron B4 VHONKO (C), B4 VHv1/VKv1 (1), B4 VHv2NKv1 (2), B4 VHv1NKv2 (3), B4 VHv2NKv2 (4), B4 VHv3NKv3 (5), B4 VHv4NKv3 (6), B4 VHv3NKv4 (7), B4 VHv4NKv4 (8), B4 VHv5NKv4 (9), y B4 VHv6/VKv4 (10). Resultados representativos de dos experimentos se muestran en las Tablas 3 y 4.

25 **Tabla 3.** Inhibición de unión del anticuerpo B4 VH0/VK0 etiquetado con biotina a células Daudi por los anticuerpos de la invención.

Proporción (no etiquetado/ etiquetado)	Anticuerpo (% de inhibición de la unión del anticuerpo B4 etiquetado)								
	C	1	2	3	4	5	6	7	8
8x	68	56	56	56	56	60	56	60	60
4x	56	44	40	44	44	40	44	52	48
2x	44	28	28	32	32	36	32	36	32
1x	28	16	16	20	16	20	16	20	16
0,5x	16	12	8	12	8	12	12	12	12

**Tabla 4.** Inhibición de unión del anticuerpo B4 VH0NK0 etiquetado con biotina a células Daudi por los anticuerpos de la invención.

Proporción (no etiquetado/ etiquetado)	Anticuerpo (% de inhibición de la unión del anticuerpo B4 etiquetado)		
	C	9	10
8x	93	90	87

(continuación)

Proporción (no etiquetado/ etiquetado)	Anticuerpo (% de inhibición de la unión del anticuerpo B4 etiquetado)		
	C	9	10
4x	90	87	80
2x	83	70	70
1x	67	57	60
0,5x	50	47	53

5 Como se muestra en las Tablas 3 y 4 se encontró que los anticuerpos B4 VHvx/VKvy inhibieron la unión del anticuerpo B4 etiquetado a las células Daudi a un nivel similar a la inhibición que produjo el anticuerpo B4 VH0/VK0 sin etiquetar, lo cual indica que las afinidades de los anticuerpos B4 VHvxNKvy y el anticuerpo B4 VHONKO son similares.

#### Ejemplo 4. Actividad ADCC de los anticuerpos de la invención

10 Se midió la actividad ADCC mediada por los anticuerpos de la invención producida en diferentes líneas celulares. La ADCC se midió mediante un ensayo estándar de liberación de 51Cr, como se realiza en el arte. Se preparó una disolución en serie de los anticuerpos (disoluciones cuádruples en un rango de 100ng/ml a 0,025mg/ml), y lisis mediante células PBMC humanas purificadas (células efectoras) de células Daudi etiquetadas con 51Cr (diana; E:T es 100:1) en presencia de los anticuerpos se midió mediante liberación específica de 51Cr, con respecto al 51Cr celular total (con ajuste por 51Cr liberado de manera espontánea). Se evaluaron los anticuerpos B4 VHv4NKv4 producidos a partir de células embrionarias de riñón humano 293T o de células YB2/0 y los anticuerpos B4 VHv5NKv4 producidos a partir de una línea celular NS/0 o de células YB2/0.

15 La figura 13 muestra el resultado de tal experimento. Ambos anticuerpos obtenidos a partir de la expresión de células YB2/0 fueron igualmente activos en la mediación de ADCC y al menos 59 veces más activos que el anticuerpo correspondiente obtenido por la expresión de una línea celular NS/0 o de células 293T. B4 VHv4NKv4 producido a partir de células 293T fue más activo que el anticuerpo B4 VHv5NKv4 producido a partir de una línea celular NS/0.

#### Ejemplo 5. Reducción de células B humanas injertadas en ratones SCID mediante los anticuerpos de la invención

20 La reducción de células B es útil en una serie de contextos terapéuticos. Por ejemplo, las enfermedades autoinmunes e inflamatorias pueden tratarse con los anticuerpos de la invención para reducir o esencialmente eliminar las células B. De manera alternativa, cuando se trata con un agente que tiene como diana al tumor tal como Zevalin™ o Bexxar™ o una proteína de fusión Leu16-IL2 (WO2005/016969), es útil eliminar en primer lugar a las células B normales.

30 Para enfocarse en si un anticuerpo de la invención podría utilizarse para eliminar las células B humanas, se realizó el siguiente experimento. El día 0, se injertó en ratones macho SCID CB 17 (n=3) células PBMC humanas en las cuales se había inyectado en aproximadamente  $4,5 \times 10^7$  células en 0,2ml de PBS de manera intraperitoneal, esencialmente siguiendo un protocolo descrito para la transferencia de células de bazo humanas (Yacoub-Youssef et al., Transpl. Immunol. (2005) 15:157-164). El día 3, se inyectó a los ratones de manera intraperitoneal PBS o 50 microgramos del anticuerpo anti-CD20 Leu 16 o el anticuerpo K4H4 anti-CD19. Los niveles de IgM humana se midieron mediante un kit de cuantificación ELISA de IgM humana (Bethyl Laboratories; Cat # E80-100) los días 7, 14 y 21.

35 La figura 14 muestra resultados habituales. En los controles tratados con PBS, el título de IgM humana incrementó de manera progresiva, y alcanzó aproximadamente 800 microgramos/ml el día 42. En los ratones tratados con Leu16 o el anticuerpo B4 VHv5NKv4, los títulos de IgM humana estaban esencialmente ausentes, lo cual indica que las células B humanas había sido eliminadas por estos tratamientos con anticuerpos.

40 **Ejemplo 6. Tratamiento de un mamífero con linfoma con un anticuerpo de la invención.**

Para evaluar si los anticuerpos de la invención fueron funcionales *in vivo*, se evaluó el anticuerpo B4 VHv4/VKv4, expresado en células YB2/0, en un modelo animal de linfoma humano. Ratones SCID CB17 de ocho semanas de vida (n=6) se inyectaron por vía intravenosa con aproximadamente  $1 \times 10^6$  células 'Namalwa' Nalm-6-UM-1 viables el día 0. Los días 1, 3 y 5, los ratones fueron tratados con 500 microgramos del anticuerpo de manera intraperitoneal o con PBS. Aproximadamente una o dos veces de semana se examinaron los ratones para ver qué ratones estaban lo suficientemente enfermos para requerir eutanasia.

La figura 15 muestra resultados habituales de tal experimento. Los ratones tratados con PBS se enfermaron todos dentro de las 10 semanas desde la inyección de las células tumorales, mientras que los ratones tratados con el anticuerpo B4 VHv4/VKv4 se enfermaron más tarde, y tres de cada seis ratones de este grupo permanecieron sanos durante las 30 semanas del curso del experimento.

#### **Ejemplo 7. Tratamiento de un mamífero con linfoma de Burkitt con un anticuerpo de la invención en combinación con quimioterapia.**

Para analizar si los anticuerpos de la invención se podrían utilizar *in vivo* en combinación con quimioterapia, el anticuerpo B4 VHv4/VKv4 se evaluó en modelos de animales de linfoma humano que eran más severos que en el ejemplo anterior, correspondientes a formas de linfoma más avanzadas o más difíciles de tratar. En un experimento representativo, la línea celular Daudi, que es una línea celular de linfoma de Burkitt, se trató con el anticuerpo B4 VHv4NKv4, expresada en células YB2/0, con o sin ciclofosfamida (CPA). Los ratones SCID CB17 de ocho semanas de vida (n=6) se inyectaron por vía intravenosa con aproximadamente  $5 \times 10^6$  células Daudi el día 0. Los días 8 y 12, los ratones fueron tratados con 100 microgramos del anticuerpo o con PBS. El día 7 los ratones se trataron con PBS o 75 microgramos de CPA por kilogramo de peso corporal. Los tratamientos se administran en forma intraperitoneal en 0,2mls. Aproximadamente una o dos veces de semana se examinaron los ratones para ver qué ratones estaban lo suficientemente enfermos para requerir eutanasia.

La figura 16 muestra los resultados de un experimento habitual. En el grupo de control tratado sin el anticuerpo ni CPA, todos los ratones enfermaron en cuatro semanas desde la inyección de las células de linfoma. En los grupos de ratones tratados sólo con el anticuerpo B4 VHv4NKv4 o CPA 5 de los 6 ratones estaban sanos durante al menos cinco semanas pero se enfermaron dentro de aproximadamente seis semanas. En el grupo de ratones tratados tanto con el anticuerpo B4 VHv4NKv4 como con CPA todos los ratones siguieron sanos durante al menos ocho semanas.

#### **Ejemplo 8. Tratamiento de enfermedad diseminada de linfoma con un anticuerpo de la invención combinado con quimioterapia.**

En otro conjunto de experimentos, se inyectaron células Namalwa de manera intravenosa en ratones descritos en el ejemplo anterior, salvo porque se utilizaron  $2 \times 10^6$  células en lugar de  $1 \times 10^6$  células. El número incrementado de células produce un curso de la enfermedad más agresivo, como se indica mediante una comparación de los ratones tratados con PBS en la figura 42 que se enfermaron dentro de tres semanas, a diferencia de los ratones tratados con PBS en la figura 40, que se enfermaron entre la semana cinco y la diez. Los ratones (n=5) se trataron con 500 microgramos del anticuerpo de manera intraperitoneal o con PBS los días 3, 7 y 11. Los ratones también se trataron con ciclofosfamida (75 mg/kg, i.p.), o vincristina (0.4 mg/kg, i.v.) o doxorubicina (3 mg/kg, i.v.) o PBS (i.v.) los días 3, 7 y 11. Los resultados se muestran en la figura 17 (a-c). Los resultados indicaron que cada uno de los tres agentes quimioterapéuticos podían combinarse con un anticuerpo de la invención.

#### **Ejemplo 9. Tratamiento de un paciente humano con los anticuerpos y métodos de la invención.**

Los anticuerpos anti-CD19 de la invención se utilizan para tratar enfermedades o trastornos humanos de la siguiente manera. En general, el método de administración preferente es mediante infusión intravenosa o inyección intravenosa, aunque la inyección subcutánea, inhalación, administración oral u otros métodos también son posibles. La administración aproximadamente una vez cada 2, 3 ó 4 semanas se utiliza, aunque la frecuencia de administración puede variar según las necesidades del paciente. Una dosis habitual es de aproximadamente 100 a 800mgs para un humano adulto. Los pacientes tratados se monitorearon en cuanto a los signos de infección que pueden resultar de la inmunosupresión.

Por ejemplo, un paciente con la enfermedad de Castleman se trata con el anticuerpo B4 VHv4NKv4 anti-CD19 de la invención aproximadamente una vez cada dos semanas en una dosis de aproximadamente 8 mg/kg con administración mediante infusión por goteo durante aproximadamente 1 hora.

Un paciente con artritis reumatoidea se trata con el anticuerpo B4 VHv4NKv4 anti-CD19 aproximadamente una vez cada cuatro semanas en una dosis de aproximadamente 8 mg/kg con administración mediante infusión por goteo durante aproximadamente 1 hora. Se encontró que la progresión de la destrucción de articulaciones se inhibió de manera significativa mediante monoterapia, incluso si se compara con fármacos anti-reumáticos modificadores la enfermedad.

Un paciente con la enfermedad de Crohn se trata con el anticuerpo B4 VHv4NKv4 anti-CD19 aproximadamente una vez cada cuatro semanas en una dosis de aproximadamente 8 mg/kg con administración mediante infusión por goteo durante aproximadamente 1 hora.

5 Un paciente con mieloma múltiple se trata con el anticuerpo B4 VHv4NKv4 anti-CD19 aproximadamente una vez cada tres semanas en una dosis de aproximadamente 8 mg/kg con administración mediante infusión por goteo durante aproximadamente 1 hora. El tratamiento con B4 VHv4NKv4 anti-CD19 se combina con un tratamiento estándar para mieloma múltiple según el médico determine que es apropiado para el paciente.

10 Un paciente con linfoma de células B se trata con el anticuerpo B4 VHv4NKv4 anti-CD19 aproximadamente una vez cada tres semanas a una dosis de aproximadamente 8 mg/kg con administración mediante infusión por goteo durante aproximadamente 1 hora, de manera opcional en combinación con un anticuerpo tal como Rituxan™ a aproximadamente 375 miligramos por metro cuadrado de superficie corporal, que se administra cada semana, o con el anticuerpo anti-CD22 epratuzumab. De manera alternativa, en el caso de un paciente con linfoma refractario, el tratamiento con el anticuerpo B4 VHv4NKv4 anti-CD19 se combina con un radioinmunoconjugado tal como Bexxar™ o Zevalin™.

15 Más específicamente, un paciente con linfoma de células B se trata con el anticuerpo B4 VHv4NKv4 anti-CD19 aproximadamente una vez cada tres semanas a una dosis de aproximadamente 8 mg/kg con administración mediante infusión por goteo durante aproximadamente 1 hora, de manera opcional en combinación con un régimen quimioterapéutico tal como ciclofosfamida más vincristina más doxorubicina más prednisolona ("CHOP"), o CHOP más bleomicina, o CHOP más etoposida, o mitoxantrona más vincristina más thiotepa, o etoposida más prednisolona más citarabina más cisplatina, o mesna más ifosfamida más mitoxantrona más etoposida, o bendamustine, o fludaribina y 2-CdA.

25 En una estrategia de tratamiento alternativa, un paciente con linfoma de células B se trata de manera inicial con el anticuerpo B4 VHv4NKv4 anti-CD19 a una dosis de aproximadamente 8 mg/kg y después se trata con una proteína de fusión IL2 anti-CD20 tal como se describe en WO2005/016969. Por ejemplo, un paciente se trata el día 1 con el anticuerpo B4 VHv4NKv4 anti-CD19 con administración por infusión por goteo durante aproximadamente 1 hora, y después se trata el día 2 y el día 4 con una proteína de fusión IL2 anti-CD20 a una dosis de aproximadamente 150 microgramos por kg con administración mediante infusión por goteo durante aproximadamente 4 horas, y este ciclo se repite aproximadamente cada tres semanas. Sin intención de estar sujeto a una teoría, el anticuerpo B4 VHv4NKv4 anti-CD19 tiene el efecto de eliminar casi todas las células B normales del paciente, de modo tal que la

30 proteína de fusión IL2 anti-CD20 ejerce su efecto uniéndose a las células tumorales restantes.

**REIVINDICACIONES**

1. Anticuerpo anti-CD19 diseñado y modificado derivado de anticuerpo B4 murino anti-CD19 **caracterizado por** la región variable de cadena pesada de la SEQ. ID: 13 y la región variable de cadena liviana de la SEQ ID NO: 25, en donde dicho anticuerpo diseñado y modificado
- 5 (i) es menos inmunogénico que dicho anticuerpo B4 murino anti-CD19 original cuando se administra a un humano pero sigue siendo competente para unirse específicamente a CD19 y tomar como diana a células que expresan CD19, y
- (ii) comprende la región variable de cadena pesada de la SEQ ID NO: 17 y la región variable de cadena liviana de la SEQ ID NO: 29.
- 10 2. Anticuerpo anti-CD19 diseñado y modificado conforme a la reivindicación 1 que se obtiene mediante la expresión de células YB2/O.
3. Molécula de ADN que codifica un anticuerpo anti-CD19 diseñado y modificado como se especifica en la reivindicación 1 ó 2.
4. Un vector de expresión que comprende una molécula de ADN conforme a la reivindicación 3.
- 15 5. Una célula huésped que expresa un anticuerpo anti-CD19 diseñado y modificado como se especifica en la reivindicación 1 ó 2.
6. Composición farmacéutica que comprende una cantidad farmacéuticamente efectiva de un anticuerpo anti-CD19 diseñado y modificado como se especifica en la reivindicación 1 ó 2, de manera opcional junto con un disolvente, portador o excipiente farmacéuticamente aceptable.
- 20 7. Utilización de una composición farmacéutica conforme a la reivindicación 6 para la elaboración de un medicamento para el tratamiento de enfermedades autoinmunes o cáncer.
8. Anticuerpo anti-CD19 diseñado y modificado como se especifica en la reivindicación 1 ó 2 para su utilización en el tratamiento de enfermedades autoinmunes o cáncer.

25

30

35

Figura 1

Secuencia de ácidos nucleicos que codifican la región variable de cadena pesada de anticuerpo B4 (B4 VH0)

CAGGTGCAACTGCAGCAGCCTGGGGCTGAAGTGGTGAAGCCTGGGGCTTCAGTGAGACTGTCCT  
GCAAGACTTCTGGCTACACCTTCACCAGCAACTGGATGCACTGGGTGAAGCAGAGGCCTGGACA  
AGGCCTTGAGTGGATCGGAGAGATTGATCCTTCTGATAGTTATACTAACTACAATCAAAGTTC  
AAGGGCAAGCCAAGTTGACTGTAGACAAATCCTCCAGCACAGCCTACATGGAAGTCAGCAGCC  
TGACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTACTGTGCAAGAGGTAGCAACCCTTACTACTATGCTAT  
GGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCA (SEQ ID NO:1)

Figura 2

Secuencia de ácidos nucleicos que codifican la región variable de cadena pesada de anticuerpo B4 con codones para sustituciones de aminoácidos Q5E, R19K, L20V, R40T, Q43K, K65D, S85D, S88A y V93T (B4 VKv4)

CAGGTGCAACTGGAGCAGCCTGGGGCTGAAGTGGTGAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGGTGTCCT  
GCAAGACTTCTGGCTACACCTTCACCAGCAACTGGATGCACTGGGTGAAGCAGACGCCTGGAAA  
AGGACTTGAGTGGATCGGAGAGATTGATCCTTCTGATAGTTATACTAACTACAATCAAAAGTTC  
GATGGCAAGGCCAAGTTGACTGTAGACAAATCCTCCAGCACAGCCTACATGGAAGTCAGCGACC  
TGACAGCTGAGGACTCTGCGACCTATTACTGTGCAAGAGGTAGCAACCCTTACTACTATGCTAT  
GGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCA (SEQ ID NO: 5)

Figura 3

Secuencia de ácidos nucleicos que codifican la región variable de cadena liviana de anticuerpo B4 (B4 VK0)

CAAATTGTTCTCACCCAGTCTCCAGCAATCATGTCTGCATCTCCAGGGGAGAAGGTCACCATGA  
CCTGCAGTGCCAGCTCAGGTGTCAACTACATGCACTGGTACCAGCAGAAGCCAGGCACCTCCCC  
CAAAGATGGATTTATGACACATCCAAACTGGCTTCTGGAGTCCCTGCTCGCTTCAGTGGCAGT  
GGGTCTGGGACCTCTTATTCTCTCACAATCAGCAGCATGGAGGCTGAAGATGCTGCCACTTATT  
ACTGCCATCAGCGAGGTAGTTACACGTTCTGGAGGGGGACCAAGCTGGAAATAAAA (SEQ ID  
NO: 8)

Figura 4

Secuencia de ácidos nucleicos que codifican la región variable de cadena liviana de anticuerpo B4 con codones para sustituciones de aminoácidos I10T, M11L, V19A, S51D y L53T (B4 VKv4)

CAAATTGTTCTCACCCAGTCTCCAGCAACTTTGTCTGCATCTCCAGGGGAGAAGGCTACCATGA  
CCTGTAGTGCCAGCTCAGGTGTCAACTACATGCACTGGTACCAGCAGAAGCCAGGCACCTCCC  
CAAAGATGGATTTATGACACAGACAAAACGGCTTCTGGAGTCCCTGCTCGCTTCAGTGGCAGT  
GGTCTGGGACCTCTTATTCTCTCACAATCAGCAGCATGGAGGCTGAAGATGCTGCCACTTATT  
ACTGCCATCAGCGAGGTAGTTACACGTTCCGAGGGGGACCAAGCTGGAAATAAAA (SEQ ID  
NO : 12)

Figura 5

Secuencia de aminoácidos de región variable de cadena pesada de anticuerpo B4 (B4 VH0)

**QVQLQQPGAIEVVKPGASVRLSCKTSGYTFSTNWMHWKQRPQGLEWIGEIDPSDSYTNYNQKF  
K GKAKLTVDKSSSTAYMEVSSLTSEDSAVYYCARGSNPYYYAMDYWGQGTSTVTVSS (SEQ ID  
NO : 13)**

Figura 6

Secuencia de aminoácidos de región variable de cadena pesada de anticuerpo B4 con codones para sustituciones de aminoácidos Q5E, R19K, L20V, R40T, Q43K, K65D, S85D, S88A y V93T (B4 VHv4)

**QVQLEQPGAEEVVKPGASVKVSCKTSQYTFSTSNWMHWVKQTPGKGLEWIGEIDPSDSYTNYNQKF  
DGKAKLTVDKSSSTAYMEVSDLTAEDSATYYCARGSNPYYYAMDYWGQGTSVTVSS (SEQ ID  
NO : 17)**

Figura 7

Secuencia de aminoácidos de región variable de cadena liviana de anticuerpo B4 (B4 VK0)

**QIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSGVNYMHWYQKPGTSPKRWIYDTSKLASGVPARFSGS  
GSGTSYSLTISSMEAEDAATYYCHQRGSYTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 25)**

Figura 8

Secuencia de aminoácidos de región variable de cadena liviana de anticuerpo B4 con codones para sustituciones de aminoácidos I10T, M11L, V19A, S51D y L53T (B4 VKv4)

**QIVLTQSPATLSASPGEKATMTCSASSGVNYMHWYQQKPGTSPKRWIYDTDKTASGVPARFSGS  
GSGTSYSLTISSMEAEDAATYYCHQRGSYTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 29)**

Figura 9

Secuencia de aminoácidos de región variable de cadena pesada de anticuerpo B4 con las CDR subrayadas y los aminoácidos sustituibles resaltados (B4 VH0) (SEQ ID NO:13)

1 QVQLQQPGAEVVKPGASVRLSCKTSGYTFTSNWMHWKQRPGGLEWIGEIDPSD B4 VH0  
 56 SYTNYNQKFKGKAKLTVDKSSSTAYMEVSSLTSEDSAVYYCARGSNPYYYAMDY B4 VH0  
 111 GQGTSVTVSS B4 VH0

Figura 10

Secuencia de aminoácidos de región variable de cadena liviana de anticuerpo B4 con las CDR subrayadas y los aminoácidos sustituibles resaltados (B4 VK0) (SEQ ID NO:25)

1 QIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSGVNYMHWYQQKPGTSPKRWIYDTSKLAS B4 VK0  
 56 GVPARFSGSGSTSYSLTISSMEADAATYYCHQRGSYTFGGGTKLEIK B4 VK0

Figura 11

Alineación de las secuencias de aminoácidos de región variable de cadena pesada de anticuerpo B4

1	<u>QVQLQQPGA</u> <u>EVVKPGASVRLSCKTSGYTF</u> <u>TSNWMHWKQRPGGLEWIGEIDPSD</u>	B4	VH0	
1	.....E.....D.....	B4	VHv1	
1	.....	B4	VHv2	
1	...E...K...KV...A.....	B4	VHv3	
1	...E...KV.....T..K.....	B4	VHv4	
1	...E...K...KV...A.....R.A..K.....	B4	VHv5	1
	.....K.....E.....D.....	B4	VHv11	
1	...E...K...KV...A.....T..K.....	B4	VHv34	
56	<u>SYTNYNQKFKGKAKLTVDKSSSTAYMEVSSLTSEDSAVYYCARGSNP</u> <u>YYYAMDY</u>	B4	VH0	
56	.....E.....D.....	B4	VHv1	
56	.....E.....D.....	B4	VHv2	
56	.....D..A.....	B4	VHv3	
56	.....D.....D..A...T.....	B4	VHv4	
56	.....D.....D.....T.....	B4	VHv5	
56	.....D..E.....D.....	B4	VHv11	
56	.....D.....D..A...T.....	B4	VHv34	
111	<u>GQGTSVTVSS</u>			SEQ ID NO:
111	.....	B4	VH0	13
111	.....	B4	VHv1	14
111	.....	B4	VHv2	15
111	.....	B4	VHv3	16
111	.....	B4	VHv4	17
111	.....	B4	VHv5	18
.....		B4	VHv11	20
111	.....	B4	VHv34	21

Figura 12

Alineación de las secuencias de aminoácidos de región variable de cadena liviana de anticuerpo B4

1	<u>QIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSGVNYMHWYQOKPGTSPKRWIYDTSKLAS</u>	B4	VK0	
1	..A...E.....D.	B4	VKv1	
1	D.....TL.....D.	B4	VKv2	
1	.....TL.....A.....A.....	B4	VKv3	
1	.....TL.....A.....D.T..	B4	VKv4	
1	..A...E.....A.....D.	B4	VKv11	
1	.....TL.....A.....A.....D.T..	B4	VKv34	
				SEQ ID NO:
56	<u>GVPARFSGSGSGTSYSYLTISSMEAEDAATYYCHQRGYSYTFGGGTKLEIK</u>	B4	VK0	25
56	.....	B4	VKv1	26
56	.....	B4	VKv2	27
56	.....E.....	B4	VKv3	28
56	.....	B4	VKv4	29
56	.....E.....	B4	VKv11	30
56	.....E.....	B4	VKv34	31

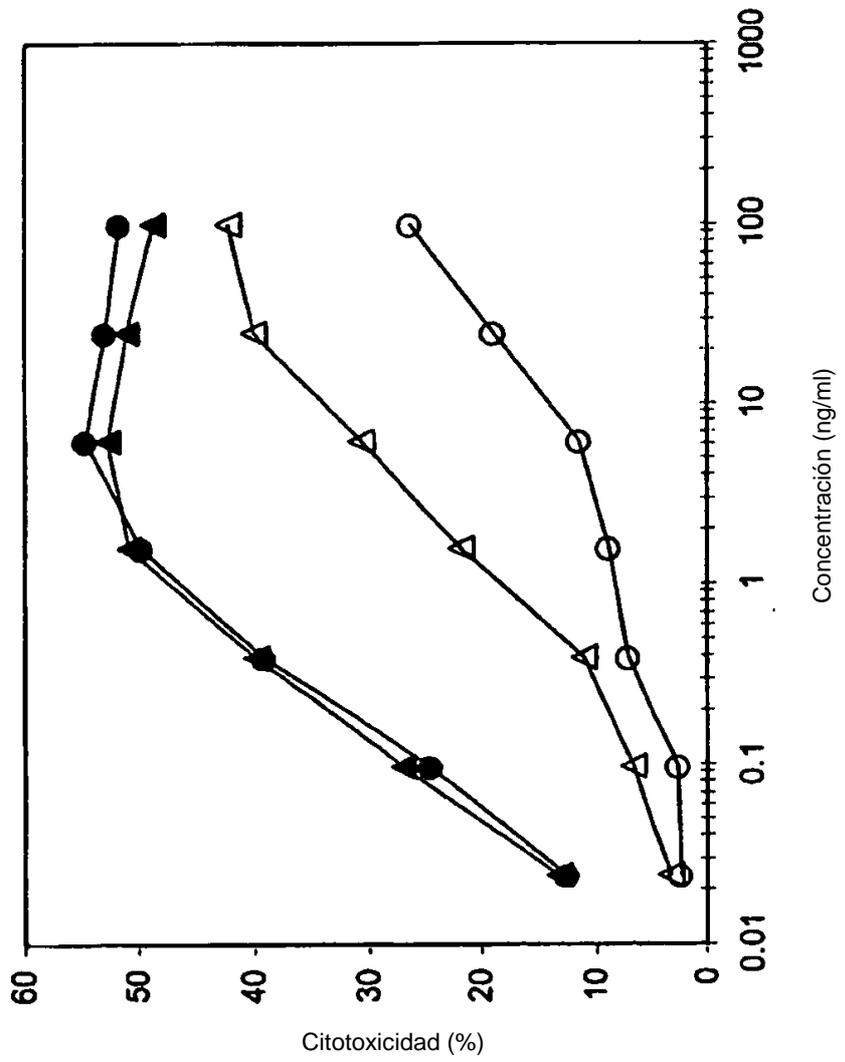


Figura 13

Figura 14

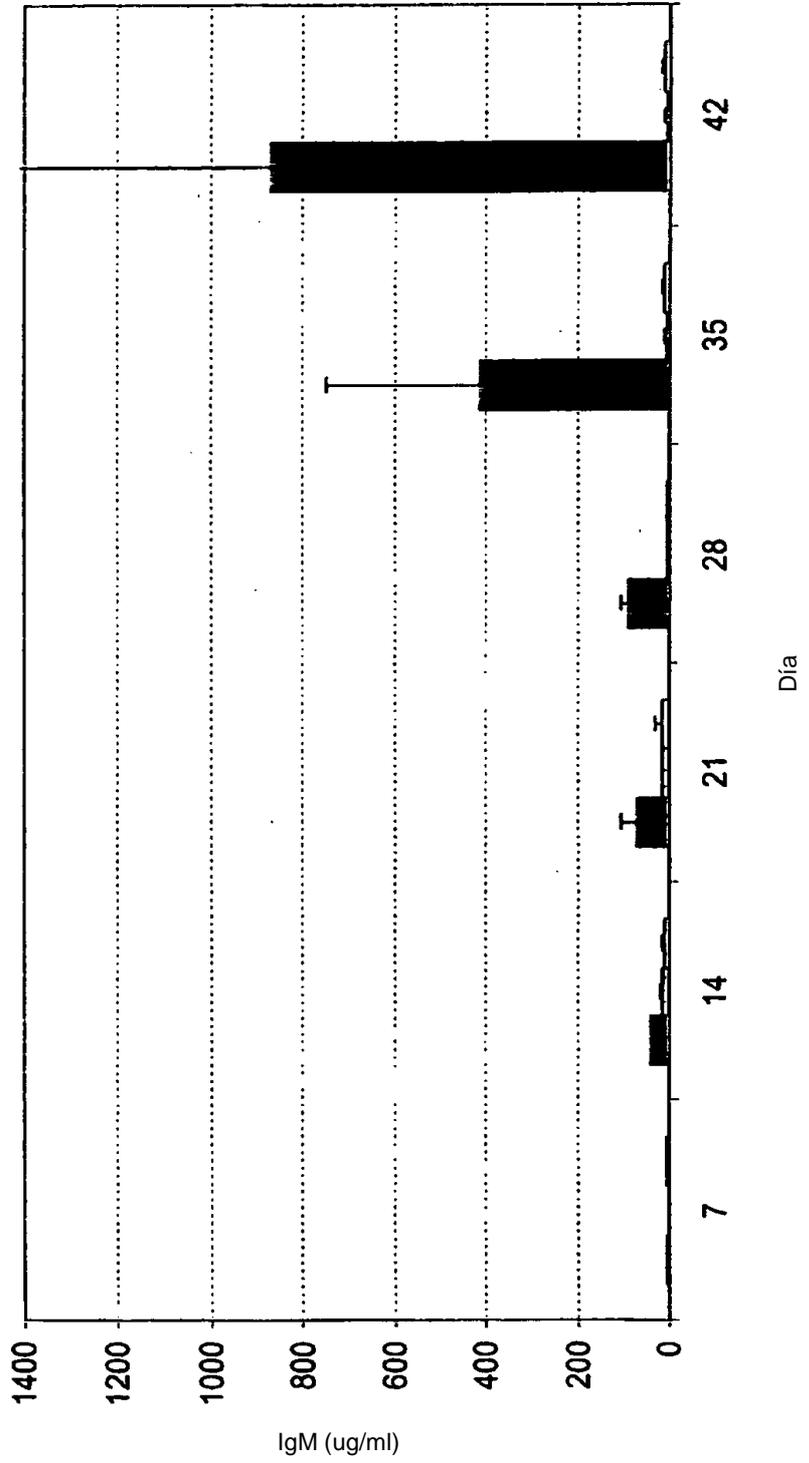


Figura 15

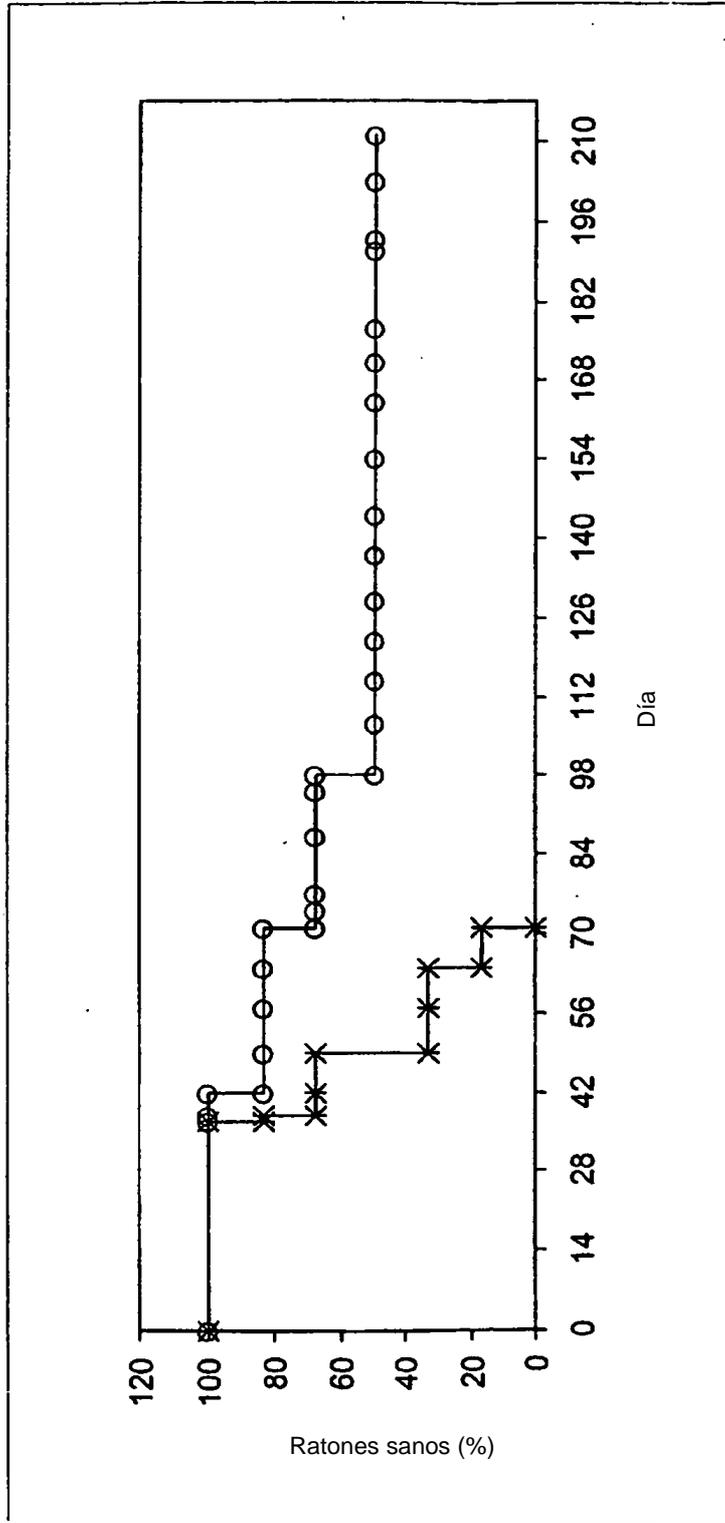


Figura 16

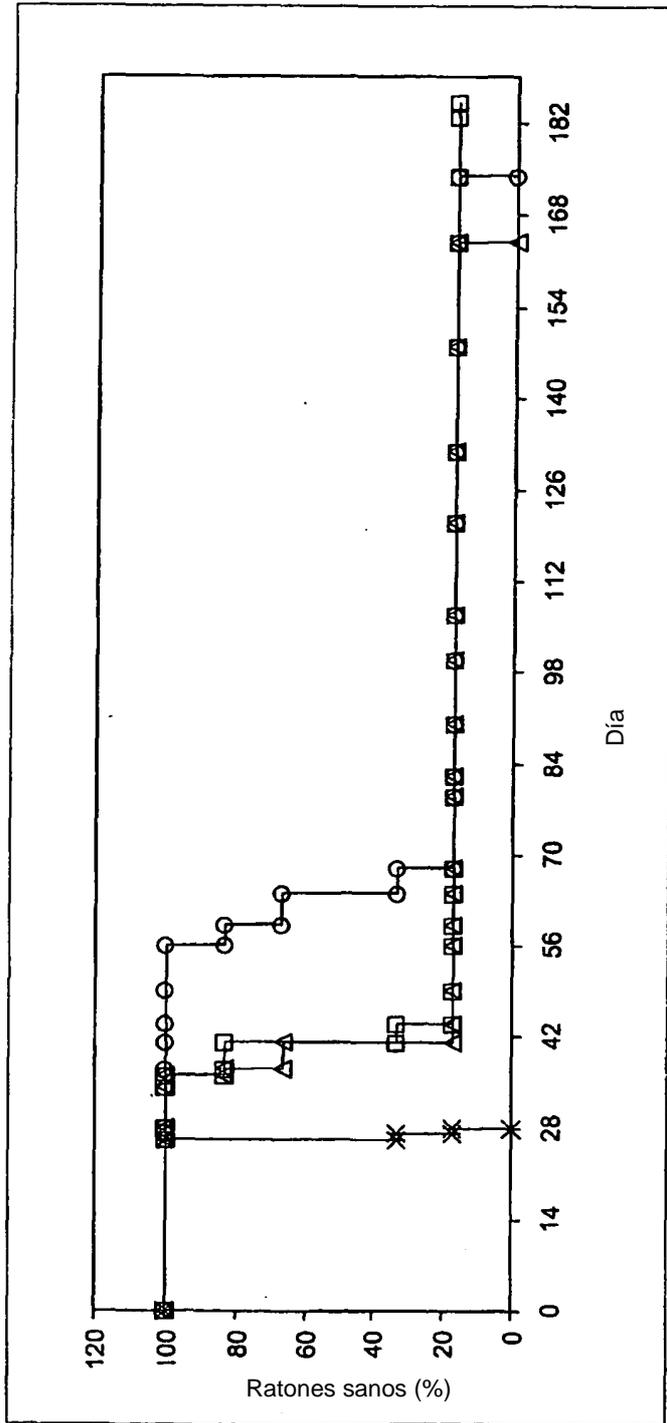


Figura 17 (a)

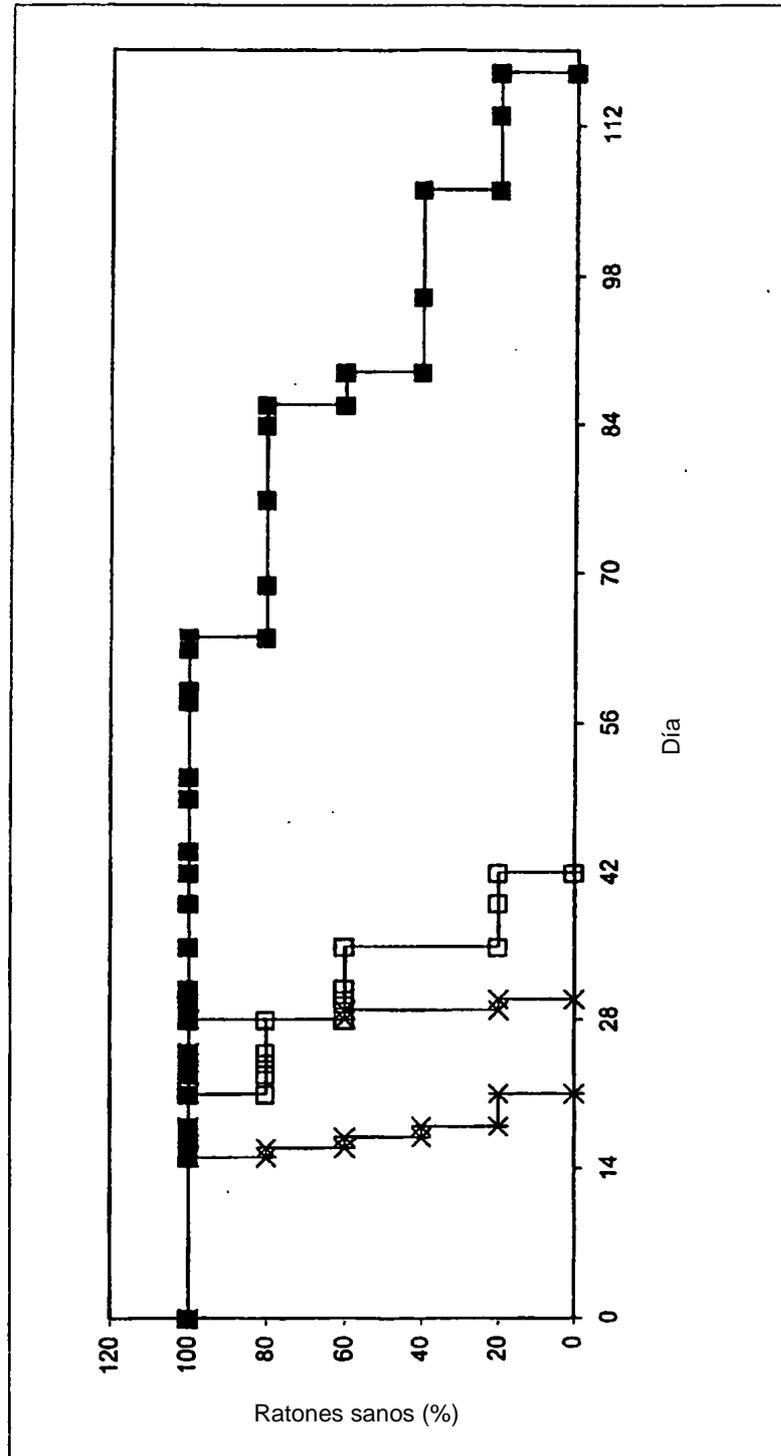


Figura 17 (b)

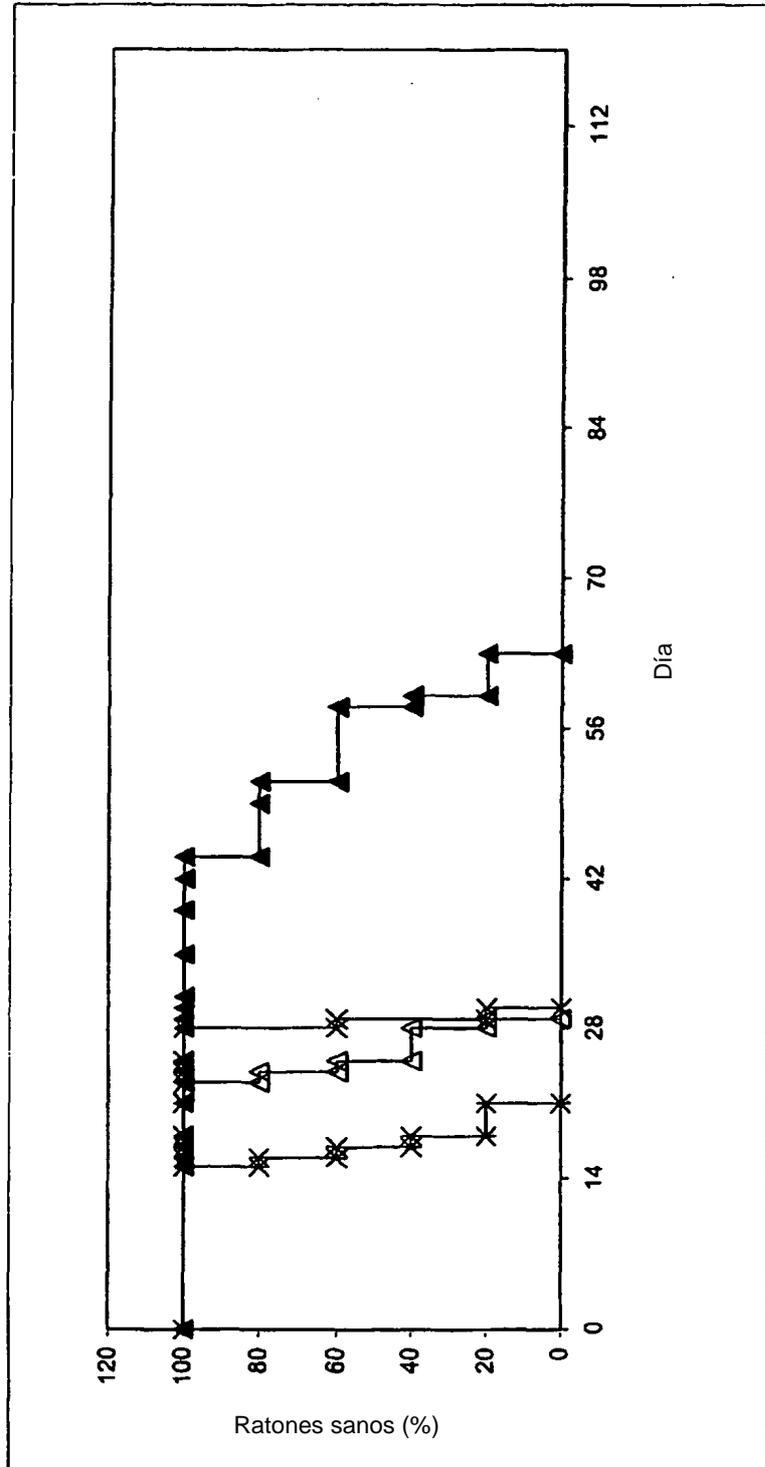


Figura 17 (c)

