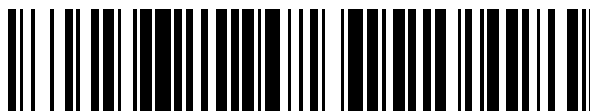


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 383 710**

51 Int. Cl.:
A61K 39/395 (2006.01)
C07K 16/18 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07842083 .3**
96 Fecha de presentación: **07.09.2007**
97 Número de publicación de la solicitud: **2066349**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **10.06.2009**

54 Título: **Anticuerpos anti-CD19 humanizados y su uso en el tratamiento de tumores, trasplantes y enfermedades autoinmunes**

30 Prioridad:
08.09.2006 US 842935 P
22.11.2006 US 866917 P
12.04.2007 US 911397 P
01.05.2007 US 915309 P
22.05.2007 US 939429 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
25.06.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
25.06.2012

73 Titular/es:
MEDIMMUNE, LLC
ONE MEDIMMUNE WAY
GAITHERSBURG, MD 20878, US

72 Inventor/es:
DAMSCHRODER, Melissa;
KIENER, Peter;
WU, Herren;
DALL'ACQUA, William;
HERBST, Ronald y
COYLE, Anthony

74 Agente/Representante:
Lazcano Gainza, Jesús

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).

ES 2 383 710 T3

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos anti-CD19 humanizados y su uso en el tratamiento de tumores, trasplantes y enfermedades autoinmunes.

5 **1. Introducción**

La presente invención se refiere a anticuerpos anti-CD19 humanos, humanizados, o quiméricos que se unen al antígeno CD19 humano. La presente invención se dirige también a composiciones que comprenden anticuerpos anti-CD19 humanos, humanizados o quiméricos que pueden mediar una o más de las siguientes: la citotoxicidad mediada por células dependiente de complemento (CDC), la citotoxicidad mediada por células dependiente de antígeno (ADCC), y la muerte celular programada (apoptosis). La presente invención se refiere además a composiciones que comprenden anticuerpos anti-CD19 humanos, humanizados, o quiméricos del isotipo humano IgG1 y/o IgG3, así como a composiciones que comprenden anticuerpos anti-CD19 humanos, humanizados o quiméricos del isotipo humano IgG2 y/o IgG4 que pueden mediar la ADCC, la CDC, o la apoptosis humana.

La presente invención además se dirige a métodos para el tratamiento de trastornos o enfermedades de las células B en humanos, que incluyen las neoplasias malignas de las células B, por medio del uso de los anticuerpos terapéuticos anti-CD19 humanos, humanizados o quiméricos que se unen al antígeno CD19 humano. La presente invención se dirige a métodos para el tratamiento y prevención de la enfermedad autoinmune, así como el tratamiento y la prevención de la enfermedad de injerto contra huésped (GVHD), el rechazo humoral, y el trastorno linfoproliferativo post-trasplante en receptores de trasplantes humanos por medio del uso de anticuerpos terapéuticos anti-CD19 humanos, humanizados, o quiméricos que se unen al antígeno CD19 humano.

25 **2. Antecedentes**

Las células B expresan una amplia gama de moléculas de superficie celular durante su diferenciación y proliferación. Algunos ejemplos incluyen los marcadores de la superficie de los leucocitos CD10, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD24, CD37, CD53, CD72, CD74, CD75, CD77, CD79a, CD79b, CD80, CD81, CD82, CD83, CD84, CD85 y CD86. Estos marcadores generalmente se sugieren como dianas terapéuticas para el tratamiento de los trastornos o enfermedades de las células B tales como las neoplasias malignas de células B, las enfermedades autoinmunes y el rechazo del trasplante. Los anticuerpos que se unen específicamente a ellos se desarrollaron, y algunos se probaron como agentes terapéuticos para el tratamiento de enfermedades y trastornos.

Por ejemplo, las terapias basadas en el anticuerpo monoclonal quimérico o radiomarcado (AcM) dirigido contra la molécula de superficie celular CD20 específico para las células B maduras y sus homólogos malignos demostraron ser un eficaz tratamiento in vivo para el linfoma no-Hodgkin (Tedder y otros, *Immunol. Today* 15:450-454 (1994); Press y otros, *Hematology*: 221-240 (2001); Kaminski y otros, *N. Engl. J. Med.* 329:459-465 (1993); Weiner, *Semin. Oncol.* 26:43-51 (1999); Onrust y otros, *Drugs* 58:79-88 (1999); McLaughlin y otros, *Oncology* 12:1763-1769 (1998); Reff y otros, *Blood* 83:435-445 (1994); Maloney y otros, *Blood* 90:2188-2195 (1997); Malone y otros, *J. Clin. Oncol.* 15:3266-3274 (1997); Anderson y otros, *Biochem. Soc. Transac.* 25:705-708 (1997)). También se encontró que la terapia con el anticuerpo monoclonal anti-CD20 es parcialmente eficaz en la atenuación de las manifestaciones de la artritis reumatoide, el lupus eritematoso sistémico, la púrpura trombocitopénica idiopática y la anemia hemolítica, así como de otras enfermedades autoinmunes (Silverman y otros, *Arthritis Rheum.* 48:1484-1492 (2002); Edwards y otros, *Rheumatology* 40:1-7 (2001); De Vita y otros, *Arthritis Rheumatism* 46:2029-2033, (2002); Leandro y otros, *Ann. Rheum. Dis.* 61:883-888 (2002); Leandro y otros, *Arthritis Rheum.* 46:2673-2677 (2001)). El anticuerpo anti-CD20 (IgG1), Rituxan, se usó con éxito en el tratamiento de ciertas enfermedades tales como la púrpura trombocitopénica inmune del adulto, la artritis reumatoide y la anemia hemolítica autoinmune (Cured y otros, WO 00/67796). A pesar de la eficacia de estas terapias, la depleción de las células B es menos eficaz cuando las células B no expresan o expresan bajos niveles de CD20, (por ejemplo, en las células pre-B o las células B inmaduras) o pierden la expresión del CD20 después de la inmunoterapia de CD20 (Smith y otros, *Oncogene* 22:7359-7368 (2003)).

En la materia se describen anticuerpos monoclonales murinos anti-CD19, por ejemplo, el HD37 (IgG1, kappa) (Dako North America, Inc, Carpinteria, CA), el BU12 (Callard y otros, *J. Immunology*, 148(10):2983-7 (1992)), el 4G7 (IgG1) (Meeker y otros, *Hybridoma*, 3(4):305-20 (1984, Winter)), el J4.119 (Beckman Coulter, Krefeld, Alemania), el B43 (PharMingen, San Diego, CA), el SJ25C1 (BD PharMingen, San Diego, CA), el FMC63 (IgG2a) (Zola y otros, *Immunol. Cell. Biol.* 69(PT6): 411-22 (1991); Nicholson y otros, *Mol. Immunol.*, 34:1157-1165 (1997); Pietersz y otros, *Cancer Immunol. Immunotherapy*, 41:53-60 (1995)), el 89B (B4) (IgG1) (Beckman Coulter, Miami, FL; Nadler y otros, *J. Immunol.*, 131:244-250 (1983)), y/o el HD237 (IgG2b) (Cuarto Taller Internacional sobre Antígenos de Diferenciación de Leucocitos Humanos, Viena, Austria, 1989; Pezzutto y otros, *J. Immunol.*, 138(9):2793-2799 (1987)). Los anticuerpos anti-CD19 o conjugados de éstos también mostraron un potencial terapéutico en diversos modelos animales de trastornos y enfermedades de las células B (Falvell y otros, *Br. J. Hematol.* 134 (2):157-70

(2006); Valleria y otros, Clin. Cancer Res. 11(21):7920-8 (2005); Yazawa y otros, Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos 102 (42):15178-83 (2005)).

En particular, se describe el uso de los anticuerpos CD19 humanizados para el tratamiento de enfermedades de células B tales como el linfoma, la leucemia, o las enfermedades autoinmunes (ver, Hansen, publicación de la solicitud de patente de los Estados Unidos núm. 2005/0070693).

A pesar de los recientes avances en la terapia del cáncer, las neoplasias malignas de células B, tales como los subtipos de células B de los linfomas no-Hodgkin y la leucemia linfocítica crónica, son los principales contribuyentes de muertes relacionadas con cáncer. En consecuencia, existe una gran necesidad de regímenes terapéuticos adicionales y mejorados para el tratamiento de las neoplasias malignas de células B.

Ahora se sabe que tanto la inmunidad celular (mediada por células T) como la humoral (mediada por células B, anticuerpos) juegan un papel importante en el rechazo del injerto. Si bien la importancia de la inmunidad mediada por células T en el rechazo del injerto está bien establecida, el papel fundamental de la inmunidad humoral en el rechazo agudo y crónico se puso de manifiesto sólo recientemente. En consecuencia, la mayoría de los avances en el tratamiento y prevención del rechazo del injerto se desarrollaron a partir de agentes terapéuticos que se dirigen a la activación de las células T. El primer anticuerpo monoclonal terapéutico que la FDA aprobó para el tratamiento del rechazo del injerto fue el anticuerpo monoclonal murino Orthoclone-OKT3™ (muromonab-CD3), dirigido contra el receptor de células T CD3. Al OKT3 se unieron un número de otros anticuerpos dirigidos contra linfocitos, que incluyen los anticuerpos monoclonales anti-CD52 Campath®, Campath-1G, Campath-1H (alemtuzumab), y Campath-1M), y preparaciones de anticuerpos policlonales anti-timocitos (conocida como globulina antitimocito, o "ATG", también llamada "timoglobina" o "timoglobulina"). Otros anticuerpos de células T, aprobados para la prevención del rechazo del trasplante incluyen el anticuerpo monoclonal quimérico Simulect™ (basiliximab) y el anticuerpo monoclonal humanizado Zenapax™ (daclizumab), ambos se dirigen al receptor de IL-2 de alta afinidad de células T activadas.

La importancia de la inmunidad humoral en el rechazo del injerto se pensó inicialmente que se limitaba al rechazo hiperagudo, en el que el receptor del injerto posee anticuerpos HLA anti-donante antes del trasplante, lo que resulta en una rápida destrucción del injerto en ausencia de un eficaz régimen terapéutico de supresión de anticuerpos. Recientemente se puso de manifiesto que la inmunidad humoral es también un factor importante para mediar el rechazo tanto agudo como crónico. Por ejemplo, las observaciones clínicas demostraron que la supervivencia del injerto en pacientes capaces de desarrollar aloanticuerpos anti-HLA de clase I o clase II (también referidos como "aloanticuerpos anti-MHC") se redujo en comparación con la supervivencia del injerto en pacientes que no podían desarrollar tales anticuerpos. Los datos clínicos y experimentales indican también que otros aloanticuerpos y autoanticuerpos específicos de los donantes son mediadores importantes del rechazo. Para una revisión actual de la evidencia que apoya el papel de los anticuerpos específicos del donante en el rechazo del aloinjerto, consulte Rife y otros, Transplantation, 79:S14-S18 (2005). Por lo tanto, debido a que es relativamente reciente la apreciación del papel de la inmunidad humoral en el rechazo del injerto agudo y crónico, los agentes terapéuticos actuales y las estrategias dirigidas a la inmunidad humoral están menos desarrolladas que aquellas dirigidas a la inmunidad celular. En consecuencia, existe una necesidad en la materia de reactivos y métodos mejorados para el tratamiento y la prevención del rechazo del injerto, es decir, la enfermedad de injerto contra huésped (GVHD), el rechazo humoral, y los trastornos linfoproliferativos post-trasplante en los receptores de trasplantes humanos.

Las enfermedades autoinmunes en general causan importante morbilidad e incapacidad. Basados en los datos de incidencia recogidos desde 1965 hasta 1995, se estima que aproximadamente 1.2 millones de personas desarrollarán una enfermedad autoinmune nueva en los próximos cinco años. Jacobsen y otros, (Clin Immunol. Immunopathol. 84:223 (1997)) evaluaron más de 130 estudios publicados y estimaron que en 1996, 8.5 millones de personas en los Estados Unidos (3.2% de la población) tenían al menos una de las 24 enfermedades autoinmunes revisadas en esos estudios. Si se tiene en cuenta el gran impacto de las enfermedades autoinmunes en la salud pública, son necesarios tratamientos efectivos y seguros para abordar la carga de estos trastornos. Así pues, existe una necesidad en la materia de reactivos y métodos mejorados para el tratamiento de la enfermedad autoinmune.

3. Sumario

La presente invención se refiere a anticuerpos anti-CD19 humanizados, que se unen al antígeno CD19 humano, así como a composiciones que comprenden dichos anticuerpos. En una modalidad, la presente invención proporciona un anticuerpo monoclonal humanizado purificado y aislado o el fragmento de éste según la reivindicación 1.

Se proporcionan los anticuerpos anti-CD19 HB12A (el clon B410F12-2-A6-C2 se depositó en la Colección Americana de Cultivos Tipo ("ATCC", por sus siglas en inglés) el 11 de febrero de 2005, Designación del depósito de la patente ATCC: PTA-6580) y HB12B (el clon B43H12-3-B2-B6 se depositó en la Colección Americana de Cultivos Tipo ("ATCC") el 11 de febrero de 2005, la Designación del depósito de la patente ATCC: PTA-6581). El HB12B se describe en la WO2006/089133.

5 Las secuencias de aminoácidos para las CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de la cadena pesada del HB12A definidas de acuerdo a Kabat se identifican como sec. con núm. de ident.: 6, sec. con núm. de ident.: 8, y sec. con núm. de ident.: 10, respectivamente. Las secuencias de aminoácidos para las CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de la cadena ligera del HB12A definidas de acuerdo a Kabat se identifican como sec. con núm. de ident.: 12, sec. con núm. de ident.: 14 y sec. con núm. de ident.: 16, respectivamente.

10 Las secuencias de aminoácidos para las CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de la cadena pesada del HB12B definidas de acuerdo a Kabat se identifican como sec. con núm. de ident.: 22, sec. con núm. de ident.: 24 y sec. con núm. de ident.: 26, respectivamente. Las secuencias de aminoácidos para las CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de la cadena ligera del HB12B definidas de acuerdo a Kabat se identifican como sec. con núm. de ident.: 28, sec. con núm. de ident.: 30 y sec. con núm. de ident.: 32, respectivamente.

Tabla 1: Los residuos que son diferentes de la secuencia de aminoácidos de la correspondiente CDR HB12B parental aparecen en negrita, subrayados. Los residuos de aminoácidos que corresponden a una posición dada variable dentro de las secuencias de CDR consenso (sec. con núm. de ident.: 230-235) se enumeran en paréntesis.

Nombre del anticuerpo	Dominio VH	CDR1 de VH	CDR2 de VH	CDR3 de VH	Dominio VK	CDR1 de VK	CDR2 de VK	CDR3 de VK
HB12A	Sec. con núm. de ident.: 2	SYVMH (Sec. con núm. de ident.: 6)	YFNPYNDGT DYVEKFKG (Sec. con núm. de ident.: 8)	GTYYGSSY PFDY (Sec. con núm. de ident.: 10)	Sec. con núm. de ident.: 4	KSSQSLYSN GKTYLN (Sec. con núm. de ident.: 12)	LVSKLDS(Sec. con núm. de ident.: 14)	VQGFHPYT (Sec. con núm. de ident.: 16)
HB12B	Sec. con núm. de ident.: 18	SSWMN(Sec. con núm. de ident.: 22)	RIYPGDGD NYNGKFKG (Sec. con núm. de ident.: 24)	SGFITTVD DY (Sec. con núm. de ident.: 26)	Sec. con núm. de ident.: 20	RASESVDTFG ISFMN(Sec. con núm. de ident.: 28)	AASNQGS (Sec. con núm. de ident.: 30)	QQSKEVPFR (Sec. con núm. de ident.: 32)
3649	Sec. con núm. de ident.: 34	SSWMN(Sec. con núm. de ident.: 22)	RIYPGDGD NYNGKFKG (Sec. con núm. de ident.: 24)	SGFITTVD DY (Sec. con núm. de ident.: 26)	Sec. con núm. de ident.: 68	RASESVDTFG ISFMN(Sec. con núm. de ident.: 28)	AASNQGS (Sec. con núm. de ident.: 30)	QQSKEVPFT (Sec. con núm. de ident.: 32)
7E12	Sec. con núm. de ident.: 102	STWMN(Sec. con núm. de ident.: 114)	RIYPGDGD NYNGKFKG (Sec. con núm. de ident.: 24)	SGFITTVD DY (Sec. con núm. de ident.: 120)	Sec. con núm. de ident.: 110	RASESVDTFG ISFIN(Sec. con núm. de ident.: 123)	EASNQGS (Sec. con núm. de ident.: 125)	QQTKEVPFT (Sec. con núm. de ident.: 126)
14H5	Sec. con núm. de ident.: 103	SSWMN(Sec. con núm. de ident.: 22)	RIYPGDGD NYNGKFKG (Sec. con núm. de ident.: 24)	SGFITTVD DY (Sec. con núm. de ident.: 121)	Sec. con núm. de ident.: 111	RASESVDTFG ISFMN(Sec. con núm. de ident.: 28)	EASNQGS (Sec. con núm. de ident.: 125)	QQSKEVPFT (Sec. con núm. de ident.: 127)
16C9	Sec. con núm. de ident.: 103	SSWMN(Sec. con núm. de ident.: 22)	RIYPGDGD NYNGKFKG (Sec. con núm. de ident.: 24)	SGFITTVD DY (Sec. con núm. de ident.: 121)	Sec. con núm. de ident.: 113	RASESVDTFG ISFMN(Sec. con núm. de ident.: 28)	AASNQGS (Sec. con núm. de ident.: 125)	QQSKEVPIT (Sec. con núm. de ident.: 127)
15D1	Sec. con núm. de ident.: 104	SSWMN(Sec. con núm. de ident.: 22)	RIYPGDGD NYNAKFKG (Sec. con núm. de ident.: 115)	SGFITTVD DY (Sec. con núm. de ident.: 121)	Sec. con núm. de ident.: 112	RASESVDHF GISFMN (Sec. con núm. de ident.: 124)	EASNQGS (Sec. con núm. de ident.: 125)	QQSKEVPIT (Sec. con núm. de ident.: 127)
15D7	Sec. con núm. de ident.: 105	SSWMN(Sec. con núm. de ident.: 22)	RIYPGDGD NYNGKFKG (Sec. con núm. de ident.: 24)	SGFITTVD DY (Sec. con núm. de ident.: 122)	Sec. con núm. de ident.: 111	RASESVDTFG ISFMN(Sec. con núm. de ident.: 28)	EASNQGS (Sec. con núm. de ident.: 125)	QQSKEVPFT (Sec. con núm. de ident.: 127)

(continuación)

Nombre del anticuerpo	Dominio VH	CDR1 de VH	CDR2 de VH	CDR3 de VH	Dominio VK	CDR1 de VK	CDR2 de VK	CDR3 de VK
16C4	Sec. con núm. de ident.: 106	SSWMN(Sec. con núm. de ident.: 22)	RIYPGDGDT NYNVKFKG (Sec. con núm. de ident.: 116)	SGFITRVRDF DY (Sec. con núm. de ident.: 121)	Sec. con núm. de ident.: 111	RASESVDTFG ISFMN(Sec. con núm. de ident.: 28)	EASNQGS (Sec. con núm. de ident.: 125)	QQSKEVPFT (Sec. con núm. de ident.: 32)
14H5-YG	Sec. con núm. de ident.: 107	SSWMN(Sec. con núm. de ident.: 22)	RIYPGDGDT NYVGKFKG (Sec. con núm. de ident.: 117)	SGFITRVRDF DY (Sec. con núm. de ident.: 121)	Sec. con núm. de ident.: 111	RASESVDTFG ISFMN(Sec. con núm. de ident.: 28)	EASNQGS (Sec. con núm. de ident.: 125)	QQSKEVPFT (Sec. con núm. de ident.: 32)
14H5-DG	Sec. con núm. de ident.: 108	SSWMN(Sec. con núm. de ident.: 22)	RIYPGDGDT NYDGKFKG (Sec. con núm. de ident.: 118)	SGFITRVRDF DY (Sec. con núm. de ident.: 121)	Sec. con núm. de ident.: 111	RASESVDTFG ISFMN(Sec. con núm. de ident.: 28)	EASNQGS (Sec. con núm. de ident.: 125)	QQSKEVPFT (Sec. con núm. de ident.: 32)
14H5-LG	Sec. con núm. de ident.: 109	SSWMN(Sec. con núm. de ident.: 22)	RIYPGDGDT NYLGKFKG (Sec. con núm. de ident.: 119)	SGFITRVRDF DY (Sec. con núm. de ident.: 121)	Sec. con núm. de ident.: 111	RASESVDTFG ISFMN(Sec. con núm. de ident.: 28)	EASNQGS (Sec. con núm. de ident.: 125)	QQSKEVPFT (Sec. con núm. de ident.: 32)
1A7	Sec. con núm. de ident.: 191	SVWMN(Sec. con núm. de ident.: 208)	RIYPGDGDT NYNVKFKG (Sec. con núm. de ident.: 116)	SGFITRVRDF DY (Sec. con núm. de ident.: 121)	Sec. con núm. de ident.: 111	RASESVDTFG ISFMN(Sec. con núm. de ident.: 28)	EASNQGS (Sec. con núm. de ident.: 125)	QQSKEVPFT (Sec. con núm. de ident.: 32)
3C3	Sec. con núm. de ident.: 191	SVWMN(Sec. con núm. de ident.: 208)	RIYPGDGDT NYNVKFKG (Sec. con núm. de ident.: 116)	SGFITRVRDF DY (Sec. con núm. de ident.: 121)	Sec. con núm. de ident.: 193	RASEVDHF GISFIN (Sec. con núm. de ident.: 211)	EASNQGS (Sec. con núm. de ident.: 218)	AQSKEVPIT (Sec. con núm. de ident.: 222)
3E5	Sec. con núm. de ident.: 191	SVWMN(Sec. con núm. de ident.: 208)	RIYPGDGDT NYNVKFKG (Sec. con núm. de ident.: 116)	SGFITRVRDF DY (Sec. con núm. de ident.: 121)	Sec. con núm. de ident.: 194	RASESVDTFG ISFMN(Sec. con núm. de ident.: 28)	EASNQGS (Sec. con núm. de ident.: 125)	AQSKEVPFT (Sec. con núm. de ident.: 223)
3D4	Sec. con núm. de ident.: 191	SVWMN(Sec. con núm. de ident.: 208)	RIYPGDGDT NYNVKFKG (Sec. con núm. de ident.: 116)	SGFITRVRDF DY (Sec. con núm. de ident.: 121)	Sec. con núm. de ident.: 195	RASESVDTFG ISFMN(Sec. con núm. de ident.: 28)	EASNQGS (Sec. con núm. de ident.: 125)	AQSKRVPFT (Sec. con núm. de ident.: 224)

(continuación)

Nombre del anticuerpo	Dominio VH	CDR1 de VH	CDR2 de VH	CDR3 de VH	Dominio VK	CDR1 de VK	CDR2 de VK	CDR3 de VK
3F11	Sec. con núm. de ident.:192	SVWMN(Sec. con núm. de ident.: 208)	RIYLGDDT NYNVKFKG (Sec. con núm. de ident.:210)	SGFITT/RDF DY (Sec. con núm. de ident.: 121)	Sec. con núm. de ident.:196	RASESVDTFGI SFMN (Sec. con núm. de ident.: 212)	EASNQGS (Sec. con núm. de ident.:125)	QQSKEVPFT (Sec. con núm. de ident.:32)
5B5	Sec. con núm. de ident.:191	SVWMN(Sec. con núm. de ident.: 208)	RIYPGDDT NYNVKFKG (Sec. con núm. de ident.:116)	SGFITT/RDF DY (Sec. con núm. de ident.: 121)	Sec. con núm. de ident.:197	RASESVDTFG ISFMN(Sec. con núm. de ident.: 28)	EASNQGS (Sec. con núm. de ident.:125)	AQTKRVPFT (Sec. con núm. de ident.:225)
6F7	Sec. con núm. de ident.: 191	SVWMN(Sec. con núm. de ident.: 208)	RIYPGDDT NYNVKFKG (Sec. con núm. de ident.:116)	SGFITT/RDF DY (Sec. con núm. de ident.: 121)	Sec. con núm. de ident.: 198	RASESVDTFG ISFMN(Sec. con núm. de ident.: 28)	EASNQGS (Sec. con núm. de ident.:125)	QQSKEVPIT (Sec. con núm. de ident.:226)
1C11	Sec. con núm. de ident.: 106	SSWMN(Sec. con núm. de ident.: 22)	RIYPGDDT NYNVKFKG (Sec. con núm. de ident.:116)	SGFITT/RDF DY (Sec. con núm. de ident.: 121)	Sec. con núm. de ident.: 199	RASESVDTFG ISFIN (Sec. con núm. de ident.: 213)	EASNQGS (Sec. con núm. de ident.:218)	QQSKEVPFT (Sec. con núm. de ident.:32)
2B11	Sec. con núm. de ident.:106	SSWMN(Sec. con núm. de ident.: 22)	RIYPGDDT NYNVKFKG (Sec. con núm. de ident.:116)	SGFITT/RDF DY (Sec. con núm. de ident.: 121)	Sec. con núm. de ident.: 200	RASESVDTFG ISFMN(Sec. con núm. de ident.: 28)	EASNQGS (Sec. con núm. de ident.:125)	AQTKKEVPFT (Sec. con núm. de ident.:227)
2D10	Sec. con núm. de ident.:191	SVWMN(Sec. con núm. de ident.: 208)	RIYPGDDT NYNVKFKG (Sec. con núm. de ident.: 116)	SGFITT/RDF DY (Sec. con núm. de ident.: 121)	Sec. con núm. de ident.:201	RASESVDTFG ISFMN(Sec. con núm. de ident.: 28)	EASNQGS (Sec. con núm. de ident.:125)	AQTKKEVPNT (Sec. con núm. de ident.:228)
3B4	Sec. con núm. de ident.:236	STWMN(Sec. con núm. de ident.: 209)	RIYPGDDT NYNVKFKG (Sec. con núm. de ident.:116)	SGFITT/RDF DY (Sec. con núm. de ident.: 121)	Sec. con núm. de ident.:111	RASESVDTFG ISFMN(Sec. con núm. de ident.: 28)	EASNQGS (Sec. con núm. de ident.:125)	QQSKEVPFT (Sec. con núm. de ident.:32)
SC11	Sec. con núm. de ident.:191	SVWMN(Sec. con núm. de ident.: 208)	RIYPGDDT NYNVKFKG (Sec. con núm. de ident.:116)	SGFITT/RDF DY (Sec. con núm. de ident.: 121)	Sec. con núm. de ident.: 201	RASESVDTFGI SFMN (Sec. con núm. de ident.: 212)	EASNTYS (Sec. con núm. de ident.:219)	AQSKRVPFT (Sec. con núm. de ident.:224)

(continuación)

Nombre del anticuerpo	Dominio VH	CDR1 de VH	CDR2 de VH	CDR3 de VH	Dominio VK	CDR1 de VK	CDR2 de VK	CDR3 de VK
5D4	Sec. con núm. de ident.: 106	SSWMN(Sec. con núm. de ident.: 22)	RIYPGDGDY NYNVKFKG (Sec. con núm. de ident.:116)	SGFITTVRDF DY (Sec. con núm. de ident.: 121)	Sec. con núm. de ident.: 203	RASESVDTFG ISFRN (Sec. con núm. de ident.: 214)	EASNQGS (Sec. con núm. de ident.:125)	QQSKEVPFT (Sec. con núm. de ident.:32)
6C2	Sec. con núm. de ident.: 106	SSWMN(Sec. con núm. de ident.: 22)	RIYPGDGDY NYNVKFKG (Sec. con núm. de ident.:116)	SGFITTVRDF DY (Sec. con núm. de ident.: 121)	Sec. con núm. de ident.:198	RASESVDTFG ISFMN(Sec. con núm. de ident.: 28)	EASNQGS (Sec. con núm. de ident.:125)	QQSKEVPIT (Sec. con núm. de ident.:226)
6C11	Sec. con núm. de ident.:192	SVWMN(Sec. con núm. de ident.: 208)	RIYPGDGDY NYNVKFKG (Sec. con núm. de ident.:210)	SGFITTVRDF DY (Sec. con núm. de ident.: 121)	Sec. con núm. de ident.:204	RASESVDTFG ISFMN(Sec. con núm. de ident.: 28)	EASNPGS (Sec. con núm. de ident.:220)	QQTKRVPFT (Sec. con núm. de ident.:229)
9G7	Sec. con núm. de ident.: 191	SVWMN(Sec. con núm. de ident.: 208)	RIYPGDGDY NYNVKFKG (Sec. con núm. de ident.:116)	SGFITTVRDF DY (Sec. con núm. de ident.: 121)	Sec. con núm. de ident.:205	RASESVDTFG ISFMN(Sec. con núm. de ident.: 215)	EASNRGS (Sec. con núm. de ident.:221)	AQSKEVPIT (Sec. con núm. de ident.:222)
1H4	Sec. con núm. de ident.:191	SVWMN(Sec. con núm. de ident.: 208)	RIYPGDGDY NYNVKFKG (Sec. con núm. de ident.:116)	SGFITTVRDF DY (Sec. con núm. de ident.: 121)	Sec. con núm. de ident.: 206	RASESVDTFG LSFMN (Sec. con núm. de ident.: 216)	EASNPGS (Sec. con núm. de ident.:218)	QQSKEVPFT (Sec. con núm. de ident.:32)
3C6	Sec. con núm. de ident.:191	SVWMN(Sec. con núm. de ident.: 208)	RIYPGDGDY NYNVKFKG (Sec. con núm. de ident.:116)	SGFITTVRDF DY (Sec. con núm. de ident.: 121)	Sec. con núm. de ident.:197	RASESVDTFG ISFMN(Sec. con núm. de ident.: 28)	EASNQGS (Sec. con núm. de ident.:125)	AQTKRVPFT (Sec. con núm. de ident.:225)
5C4	Sec. con núm. de ident.:191	SVWMN(Sec. con núm. de ident.: 208)	RIYPGDGDY NYNVKFKG (Sec. con núm. de ident.:116)	SGFITTVRDF DY (Sec. con núm. de ident.: 121)	Sec. con núm. de ident.:207	RASESVDTFG SFVN (Sec. con núm. de ident.: 217)	EASNPGS (Sec. con núm. de ident.:218)	AQTKRVPFT (Sec. con núm. de ident.:225)
Consenso	Sec. con núm. de ident.:237	S(S/T/V)WMN (Sec. con núm. de ident.:230)	RIY(P/L)GDG DTNY(N/Y/DI) L(G/AV)KFK G (Sec. con núm. de ident.: 231)	SGFITTVRDF Y(H)DFDY (Sec. con núm. de ident.:232)	Sec. con núm. de ident.:238	RASESV(I/D) (T/H)FG(I/L)SF (I/M/R)N (Sec. con núm. de ident.: 233)	(E/A)ASN(P/Q/T)(Y/G)S (Sec. con núm. de ident.: 234)	(Q/A)Q(S/T)K (E/R)VP(F/I/N)T (Sec. con núm. de ident.:235)

Un clon de ADN que comprende el anti-hCD19 VH HB12B-(3-72/JH4) humanizado, se depositó en la Colección Americana de Cultivos Tipo ("ATCC") el 26 de octubre de 2006. Un clon de ADN que comprende el humanizado anti-hCD19 VK HB12B-3649 se depositó en la Colección Americana de Cultivos Tipo ("ATCC") el 26 de octubre de 2006. Un ácido nucleico aislado según la reivindicación 8.

La invención proporciona además un ácido nucleico aislado según la reivindicación 8.

La presente invención se refiere además a una célula aislada según la reivindicación 9.

Los anticuerpos monoclonales anti-CD19 quiméricos, humanos y humanizados descritos en la presente incluyen aquellos del isotipo humano IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4.

Un anticuerpo anti-CD19 humanizado descrito en la presente puede mediar la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC), la citotoxicidad mediada por células dependiente de complemento (CDC), y/o la apoptosis.

Un anticuerpo anti-CD19 humanizado descrito en la presente puede inhibir la proliferación de las células B estimuladas con anti-IgM/CpG.

La presente invención proporciona además una composición farmacéutica según la reivindicación 10.

En otro aspecto, la presente invención se dirige a una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo de la invención para uso según la reivindicación 11.

3.1. Definiciones

Como se usa en la presente, los términos "anticuerpo" y "anticuerpos" (inmunoglobulinas) abarcan los anticuerpos monoclonales (se incluyen los anticuerpos monoclonales de longitud completa), los anticuerpos policlonales, los anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos) formados a partir de al menos dos anticuerpos intactos, los anticuerpos humanos, los anticuerpos humanizados, los anticuerpos camelizados, los anticuerpos quiméricos, los Fv de cadena simple (scFv), los anticuerpos de una sola cadena, los anticuerpos de dominio único, los dominios de anticuerpos, los fragmentos Fab, los fragmentos F(ab')₂, los fragmentos de anticuerpos que exhiben la actividad biológica deseada, los Fv enlazados por disulfuro (sdFv) y los anticuerpos anti-idiotípicos (anti-Id) (se incluyen, por ejemplo, los anticuerpos anti-Id de los anticuerpos de la invención), los intracuerpos y los fragmentos de unión a epítopos de cualquiera de los anteriores. En particular, los anticuerpos incluyen moléculas de inmunoglobulinas y fragmentos de moléculas de inmunoglobulinas inmunológicamente activos, es decir, moléculas que contienen un sitio de unión al antígeno. Las moléculas de inmunoglobulina pueden ser de cualquier tipo (por ejemplo, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA e IgY), clase (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2) o subclases.

Los anticuerpos nativos son generalmente glicoproteínas heterotetraméricas de aproximadamente 150 000 daltons, compuestas de dos cadenas ligeras idénticas (L) y dos cadenas pesadas idénticas (H). Cada cadena ligera está unida a una cadena pesada por un enlace disulfuro covalente, mientras que el número de enlaces disulfuro varía entre las cadenas pesadas de diferentes isotipos de inmunoglobulinas. Cada cadena pesada y ligera también tiene puentes disulfuro intracatenarios espaciados regularmente. Cada cadena pesada tiene en un extremo un dominio variable (VH), seguido por varios dominios constantes. Cada cadena ligera tiene un dominio variable en un extremo (VL) y un dominio constante en su otro extremo, el dominio constante de la cadena ligera está alineado con el primer dominio constante de la cadena pesada, y el dominio variable de la cadena ligera está alineado con el dominio variable de la cadena pesada. Las cadenas ligeras se clasifican como cadenas lambda o cadenas kappa basados en la secuencia de aminoácidos de la región constante de la cadena ligera. El dominio variable de una cadena ligera kappa también puede indicarse en la presente como VK. El término "región variable" también puede usarse para describir el dominio variable de una cadena pesada o cadena ligera. Se cree que residuos de aminoácidos particulares forman una interfase entre los dominios variables de cadena ligera y pesada. Tales anticuerpos pueden derivarse de cualquier mamífero, que incluye, pero no se limitan a, humanos, monos, cerdos, caballos, conejos, perros, gatos, ratones, etc.

El término "variable" se refiere al hecho de que ciertas partes de los dominios variables difieren ampliamente en secuencia entre anticuerpos y son responsables de la especificidad de unión de cada anticuerpo particular para su antígeno particular. Sin embargo, la variabilidad no se distribuye uniformemente a través de los dominios variables de los anticuerpos. Se concentra en segmentos llamados regiones determinantes de la complementariedad (CDR), tanto en los dominios variables de la cadena ligera y de la cadena pesada. Las partes más altamente conservadas de los dominios variables se denominan regiones de marco (FW). Los dominios variables de cadenas pesadas y ligeras nativas comprenden cada uno cuatro regiones FW, en gran medida adoptan una configuración en hoja β conectadas por tres CDR, que forman lazos que conectan, y en algunos casos forman parte de la estructura en hoja β . Las CDR en cada cadena se mantienen unidas en estrecha proximidad por las regiones FW y, con las CDR de la otra cadena, contribuyen

a la formación del sitio de unión al antígeno de los anticuerpos (ver, Kabat y otros, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5^a edición. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)). Los dominios constantes generalmente no están involucrados directamente en la unión al antígeno, pero pueden influir en la afinidad de unión al antígeno y pueden presentar diversas funciones efectoras, como la participación del anticuerpo en la ADCC, la CDC, y/o la apoptosis.

El término "región hipervariable" cuando se usa en la presente se refiere a los residuos de aminoácidos de un anticuerpo que están asociados con su unión al antígeno. Las regiones hipervariables abarcan los residuos de aminoácidos de las "regiones determinantes de complementariedad" o "CDR" (por ejemplo, los residuos 24-34 (L1), 50-56 (L2) y 89-97 (L3) del dominio variable de la cadena ligera y los residuos 31-35 (H1), 50-65 (H2) y 95-102 (H3) del dominio variable de la cadena pesada; Kabat y otros, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5^a edición, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)) y/o los residuos de un "lazo hipervariable" (por ejemplo, los residuos 26-32 (L1), 50-52 (L2) y 91-96 (L3) en el dominio variable de la cadena ligera y 26-32 (H1), 53-55 (H2) y 96-101 (H3) en el dominio variable de la cadena pesada; Chothia y Lesk, *J. Mol. Biol.*, 196:901-917 (1987)). Los residuos de "Marco" o "FW" son los residuos del dominio variable que flanquean las CDR. Los residuos de FW están presentes en los dominios de los anticuerpos quiméricos, humanizados, humanos y los diacuerpos, los vaccicuerpos, los anticuerpos lineales, y los anticuerpos biespecíficos.

El término "anticuerpo monoclonal" como se usa en la presente se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos excepto por posibles mutaciones de origen natural que pueden estar presentes en cantidades menores. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, están dirigidos contra un sitio antigénico único. Además, en contraste con las preparaciones de anticuerpos convencionales (policlonales) que típicamente incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítopos), cada anticuerpo monoclonal está dirigido contra un único determinante en el antígeno. Además de su especificidad, los anticuerpos monoclonales son ventajosos en cuanto a que pueden sintetizarse por las células del hibridoma que no están contaminadas por las células productoras de otras inmunoglobulinas. Aquellos con formación en la materia conocen los métodos alternativos de producción, por ejemplo, las células transfectadas de forma estable o transitoria con los genes de las cadenas pesada y ligera que codifican el anticuerpo monoclonal pueden producir un anticuerpo monoclonal.

El modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo como obtenido a partir de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, y no debe interpretarse como que requiere la ingeniería del anticuerpo por cualquier método particular. El término "anticuerpo monoclonal" se usa en la presente para referirse a un anticuerpo que se deriva de una población clonal de células, se incluye cualquier eucariota, procariota o clon de fago, y no el método por el cual el anticuerpo se modificó por ingeniería. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales para el uso de acuerdo con la presente invención pueden hacerse por el método del hibridoma primero descrito por Kohler y otros, *Nature*, 256:495 (1975), o pueden hacerse por cualquier método de ADN recombinante (ver, por ejemplo, la patente de los Estados Unidos núm. 4,816,567), que incluye el aislamiento a partir de genotecas de anticuerpos en fagos por medio del uso de las técnicas descritas, por ejemplo, en Clackson y otros, *Nature*, 352:624-628 (1991) y Marks y otros, *J. Mol. Biol.*, 222:581-597 (1991). Estos métodos pueden usarse para producir los dominios de anticuerpos de mamíferos monoclonal, quimérico, humanizado, humano, los diacuerpos, los vaccicuerpos, los anticuerpos lineales, y los anticuerpos biespecíficos.

El término "anticuerpos quiméricos" incluye los anticuerpos en los que al menos una porción de la cadena pesada y/o ligera es idéntica u homóloga a las secuencias correspondientes en los anticuerpos derivados de una especie particular o que pertenecen a una clase o subclase de anticuerpo particular, y al menos otra parte de la cadena (s) es idéntica u homóloga a las secuencias correspondientes en los anticuerpos derivados de otras especies o que pertenecen a otra clase o subclase de anticuerpos, así como los fragmentos de tales anticuerpos, mientras que muestren la actividad biológica deseada (la patente de los Estados Unidos núm. 4,816,567; Morrison y otros, *Proc Natl Acad Sci. Estados Unidos*, 81: 6851-6855 (1984)). Los anticuerpos quiméricos de interés en la presente incluyen los anticuerpos "primatizados" que comprenden secuencias de los dominios variables de unión al antígeno derivadas de un primate no humano (por ejemplo, Mono del Viejo Mundo, tal como monos babuinos, rhesus o cinomolgos) y secuencias de las regiones constantes humanas (patente de los Estados Unidos núm. 5,693,780).

Las formas "humanizadas" de los anticuerpos no-humanos (por ejemplo, murino) son anticuerpos quiméricos que contienen una secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. En su mayor parte, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las cuales los residuos de las CDR nativas se reemplazan por los residuos de las correspondientes CDR de una especie no-humana (anticuerpo donante) tal como ratón, rata, conejo o primate no-humano que tienen la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, residuos de la región FW de la inmunoglobulina humana se sustituyen por los correspondientes residuos no humanos. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender residuos que no se encuentran en el anticuerpo receptor o en el anticuerpo donante. Estas modificaciones se realizan para refinar aún más la función del anticuerpo. En general,

una cadena pesada o ligera del anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos de al menos uno o más dominios variables, en los cuales todas o sustancialmente todas las CDR corresponden a las de la inmunoglobulina no humana y todos o sustancialmente todos los FW son los de una secuencia de inmunoglobulina humana. En ciertas modalidades, el anticuerpo humanizado comprenderá al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina (Fc), típicamente la de una inmunoglobulina humana. Para más detalles, ver, Jones y otros, *Nature*, 321:522-525 (1986); Riechmann y otros, *Nature*, 332:323-329 (1988); y Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.*, 2:593-596 (1992).

Un "anticuerpo humano" puede ser un anticuerpo derivado de un humano o un anticuerpo obtenido a partir de un organismo transgénico que se "modificó por ingeniería" para producir anticuerpos humanos específicos en respuesta a estímulos antigénicos y pueden producirse por cualquier método conocido en la materia. En ciertas técnicas, los elementos de los loci de las cadenas pesada y ligera humanas derivadas de líneas de células madre que contienen alteraciones específicas de los loci de las cadenas pesada y ligera endógenas se introducen en cepas del organismo. El organismo transgénico puede sintetizar anticuerpos humanos específicos para los antígenos humanos, y el organismo puede usarse para producir hibridomas que secretan anticuerpos humanos. Un anticuerpo humano también puede ser un anticuerpo donde las cadenas pesada y ligera son codificadas por una secuencia de nucleótidos derivada de una o más fuentes de ADN humano. Un anticuerpo totalmente humano también puede construirse por métodos de transfección genética o cromosómica, así como por la tecnología de fagos, o en células B activadas *in vitro*, todos los cuales se conocen en la materia.

La "citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo" y "ADCC" se refieren a una reacción mediada por células en la cual las células citotóxicas no específicas (por ejemplo, células asesinas naturales (NK), neutrófilos y macrófagos) reconocen el anticuerpo unido a una célula diana y causan posteriormente la lisis de la célula diana. En una modalidad, estas células son células humanas. Si bien no se desea limitarse a ningún mecanismo de acción particular, estas células citotóxicas que median la ADCC generalmente expresan receptores Fc (FcR). Las células primarias que median la ADCC, las células NK, expresan el FcγRIII, mientras que los monocitos expresan FcγRI, FcγRII, FcγRIII y/o FcγRIV. La expresión del FcR en las células hematopoyéticas se resume en Ravetch y Kinet, *Annu. Rev. Immunol.*, 9:457-92 (1991). Para evaluar la actividad ADCC de una molécula, puede realizarse un ensayo de ADCC *in vitro*, tal como el descrito en las patentes de los Estados Unidos núms. 5,500,362 ó 5,821,337. Las células efectoras útiles para estos ensayos incluyen las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y las células asesinas naturales (NK). Alternativamente, o adicionalmente, la actividad de ADCC de las moléculas de interés puede evaluarse *in vivo*, por ejemplo, en un modelo animal tal como el descrito en Clynes y otros, *Proc. Natl. Acad. Sci. (Estados Unidos)*, 95:652-656 (1998).

La "citotoxicidad dependiente de complemento" o "CDC" se refiere a la capacidad de una molécula para iniciar la activación del complemento y lisar una diana en presencia de complemento. La vía de activación de complemento se inicia por la unión del primer componente del sistema de complemento (C1q) a una molécula (por ejemplo, un anticuerpo) que forma complejo con un antígeno cognado. Para evaluar la activación del complemento, puede realizarse un ensayo de CDC, por ejemplo, como se describe en Gazzano-Santaro y otros, *J. Immunol. Methods*, 202:163 (1996).

"Las células efectoras" son leucocitos que expresan uno o más FcR y llevan a cabo las funciones efectoras. Las células expresan al menos FcγRI, el FcγRII, FcγRIII y/o FcγRIV y llevan a cabo la función efectora de la ADCC. Los ejemplos de los leucocitos humanos que median la ADCC incluyen las células mononucleares de sangre periférica (PBMC), las células asesinas naturales (NK), los monocitos, las células T citotóxicas y los neutrófilos.

Los términos "receptor de Fc" o "FcR" se usan para describir un receptor que se une a la región Fc de un anticuerpo. En una modalidad, el FcR es una secuencia humana nativa de FcR. Además, en ciertas modalidades, el FcR se une a un anticuerpo IgG (un receptor gamma) e incluye los receptores de las subclases FcγRI, FcγRII, FcγRIII, y FcγRIV, se incluyen variantes alélicas y formas de estos receptores empalmadas alternativamente. Los receptores FcγRII incluyen el FcγRIIA (un "receptor activador") y FcγRIIB (un "receptor inhibidor"), que tienen secuencias de aminoácidos similares que difieren principalmente en los dominios citoplásmicos de éstos. El receptor activador FcγRIIA contiene en su dominio citoplásmico un motivo de activación del inmunoreceptor basado en tirosina (ITAM). El receptor inhibidor FcγRIIB contiene en su dominio citoplásmico un motivo de inhibición del inmunoreceptor basado en tirosina (ITIM). (ver, Daron, *Annu. Rev. Immunol.*, 15:203-234 (1997)). Los FcR se revisan en Ravetch y Kinet, *Annu. Rev. Immunol.*, 9:457-92 (1991); Capel y otros, *Immunomethods*, 4:25-34 (1994); y de Haas y otros, *J. Lab. Clin. Med.*, 126:330-41 (1995). El término "FcR" en la presente abarca los demás FcR, se incluyen los que se identificarán en el futuro. El término también incluye el receptor neonatal, FcRn, que es responsable de la transferencia de IgG maternas al feto (Guyer y otros, *Immunol.*, 117:587 (1976) y Kim y otros, *J. Immunol.*, 24:249 (1994)).

El "Fv" es el mínimo fragmento de anticuerpo que contiene un sitio completo de reconocimiento y unión al antígeno. Esta región consiste de un dímero de un dominio variable de cadena pesada y ligera en una estrecha asociación, no covalente o covalente. Es en esta configuración en que las tres CDR de cada dominio variable interactúan para definir un

sitio de unión al antígeno en la superficie del dímero VH-VL. Las seis CDR colectivamente confieren al anticuerpo la especificidad de unión al antígeno. Sin embargo, incluso un solo dominio variable (o la mitad de un Fv que comprende sólo tres CDR específicas para un antígeno) tiene la capacidad de reconocer y unirse al antígeno, aunque con una menor afinidad que el sitio de unión completo.

La "afinidad" de un anticuerpo por un epítipo para usarse en el tratamiento(s) descrito en la presente, es un término bien entendido en la materia y significa la medida, o la fuerza, de unión del anticuerpo al epítipo. La afinidad puede medirse y/o expresarse en un número de maneras conocidas en la materia, se incluyen, pero no se limitan a, la constante de disociación de equilibrio (KD o Kd), la constante de disociación de equilibrio aparente (KD' o Kd'), e IC50 (cantidad necesaria para provocar el 50% de la inhibición en un ensayo de competencia). Se entiende que, para los propósitos de esta invención, una afinidad es una afinidad promedio de una población dada de anticuerpos que se unen a un epítipo. Los valores de KD' informados en la presente en términos de mg de IgG por ml o mg/ml indican los mg de Ig por ml de suero, aunque puede usarse el plasma. Cuando la afinidad de los anticuerpos se usa como base para la administración de los métodos de tratamiento descritos en la presente, o la selección de los métodos de tratamiento descritos en la presente, la afinidad de los anticuerpos puede medirse antes y/o durante el tratamiento, y un médico puede usar los valores obtenidos para evaluar si un paciente humano es un candidato apropiado para el tratamiento.

Tal como se usa en la presente, el término "avidez" es una medida de la fuerza total de unión (es decir, ambos brazos del anticuerpo) con que un anticuerpo se une a un antígeno. La avidez del anticuerpo puede determinarse por la medición de la disociación del enlace antígeno-anticuerpo en exceso del antígeno por medio del uso de cualquier medio conocido en la materia, tal como, pero no limitado a, la modificación de la fluorescencia indirecta de los anticuerpos como se describió por Gray y otros, J. Virol. Meth., 44:11-24. (1993).

Un "epítipo" es un término bien entendido en la materia y significa cualquier resto químico que muestre unión específica a un anticuerpo. Un "antígeno" es un resto o molécula que contiene un epítipo, y, como tal, también se une específicamente al anticuerpo.

Un "marcador de superficie de células B" como se usa en la presente es un antígeno expresado en la superficie de una célula B, que puede fijarse como diana con un agente que se une al mismo. Los marcadores de superficie de células B incluyen los marcadores de superficie de leucocitos CD10, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD24, CD25, CD37, CD53, CD72, CD73, CD74, CD75, CD77, CD79a, CD79b, CD80, CD81, CD82, CD83, CD84, CD85 y CD86. Un marcador de superficie de célula B de interés particular se expresa preferentemente en células B en comparación con otros tejidos de células no-B de un mamífero y puede expresarse tanto en células precursoras B como células del linaje B maduras. En una modalidad, el marcador es el CD19, el cual se encuentra en las células B en diversas etapas de la diferenciación.

El término "vida media del anticuerpo" como se usa en la presente, significa una propiedad farmacocinética de un anticuerpo que es una medida del tiempo de supervivencia media de las moléculas de anticuerpos después de su administración. La vida media del anticuerpo puede expresarse como el tiempo requerido para eliminar el 50 por ciento de una cantidad conocida de inmunoglobulina del cuerpo del paciente o de un compartimento específico de éste, por ejemplo, según se mida en el suero o plasma, es decir, la vida media circulante, o en otros tejidos. La vida media puede variar de una inmunoglobulina o clase de inmunoglobulina a otra. En general, un aumento de la vida media de los anticuerpos resulta en un aumento en el tiempo medio de residencia (MRT) en circulación para el anticuerpo administrado.

El término "isotipo" se refiere a la clasificación de la región constante de las cadenas pesada o ligera de un anticuerpo. Los dominios constantes de los anticuerpos no están implicados en la unión al antígeno, pero muestran diversas funciones efectoras. En dependencia de la secuencia de aminoácidos de la región constante de la cadena pesada, un anticuerpo humano dado o inmunoglobulina puede asignarse a una de las cinco clases principales de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM. Varias de estas clases pueden dividirse en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG1 (gamma 1), IgG2 (gamma 2), IgG3 (gamma 3), e IgG4 (gamma 4), e IgA1 e IgA2. Las regiones constantes de cadena pesada que corresponden a las diferentes clases de inmunoglobulinas se llaman α , δ , ϵ , γ , y μ , respectivamente. Las estructuras y configuraciones tridimensionales de diferentes clases de inmunoglobulinas son bien conocidas. De las diversas clases de inmunoglobulinas humanas, sólo la IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 e IgM humanas se conoce que activan el complemento. Las IgG1 e IgG3 humanas se conoce que median la ADCC en humanos. Las regiones constantes de la cadena ligera humana pueden clasificarse en dos clases principales, kappa y lambda.

Tal como se usa en la presente, el término "inmunogenicidad" significa que un compuesto es capaz de provocar una respuesta inmune (estimular la producción de anticuerpos específicos y/o la proliferación de las células T específicas).

Tal como se usa en la presente, el término "antigenicidad" significa que un compuesto es reconocido por un anticuerpo o puede unirse a un anticuerpo e inducir una respuesta inmune.

Por los términos "atender", "tratar" o "tratamiento de" (o términos gramaticalmente equivalentes) se entiende que la gravedad de la afección del sujeto se reduce o al menos mejora parcialmente o se atenúa y/o se logra algún alivio, mitigación o disminución de al menos un síntoma clínico y/o no hay una inhibición o retraso en la progresión de la afección y/o la prevención o retraso del comienzo de una enfermedad o dolencia. Por lo tanto, los términos "atender", "tratar" o "tratamiento de" (o términos gramaticalmente equivalentes) se refieren a los regímenes de tratamiento, tanto profilácticos como terapéuticos.

Como se usa en la presente, una "cantidad suficiente" o "una cantidad suficiente para" lograr un resultado particular se refiere a una cantidad de un anticuerpo o la composición de la invención que es eficaz para producir un efecto deseado, que es opcionalmente un efecto terapéutico (es decir, por la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz). Por ejemplo, una "cantidad suficiente" o "cantidad suficiente para" puede ser una cantidad que es eficaz para depletar las células B.

Una cantidad "terapéuticamente eficaz" como se usa en la presente, es una cantidad que proporciona una cierta mejora o beneficio al sujeto. Dicho de otra manera, una cantidad "terapéuticamente eficaz" es una cantidad que proporciona algún alivio, mitigación y/o una disminución de al menos un síntoma clínico. Los síntomas clínicos asociados con los trastornos que pueden tratarse por los métodos de la invención son bien conocidos por aquellos con experiencia en la materia. Además, aquellos con experiencia en la materia apreciarán que los efectos terapéuticos no necesitan ser completos o curativos, siempre y cuando se proporcione algún beneficio al sujeto.

4. Breve descripción de las figuras

La Figura 1A-B: (A) Alineación de la secuencia de aminoácidos de las regiones variables de las cadenas ligeras VK HB12B (sec. con núm. de ident.: 20); HB12B-(A10-Jk4) (sec. con núm. de ident.: 52), HB12B-364987 (sec. con núm. de ident.: 62), HB12B-3649 (sec. con núm. de ident.: 68), y HB12B-36 (sec. con núm. de ident.: 70). La secuencia de los residuos se numera de acuerdo con Kabat. Los residuos de las CDR, definidos de acuerdo a Kabat, están en el recuadro. Los residuos de Vernier, intercatenarios, y canónicos de la VK HB12B (sec. con núm. de ident.: 20) se destacan en color gris claro. Las sustituciones de aminoácidos de HB12B-364987 (sec. con núm. de ident.: 62) (Y40F, K53H, Y91F), HB12B-3649 (sec. con núm. de ident.: 68) (Y40F, K53H), y HB12B 36 (sec. con núm. de ident.: 70) (Y40F) en relación con el dominio variable del anticuerpo injertado HB12B-(A10-Jk4) (sec. con núm. de ident.: 52) se destacan en color gris oscuro. (B) alineación de la secuencia de aminoácidos de las regiones variables de la cadena pesada VH HB12B (sec. con núm. de ident.: 18), HB12B-(3-72/JH4) (sec. con núm. de ident.: 34), y HB12B 9m (sec. con núm. de ident.: 44). Los residuos de la secuencia se numeran de acuerdo con Kabat. Los residuos de las CDR, definidas de acuerdo con Kabat, están en el recuadro. Los residuos de Vernier, intercatenarios y canónicos de la VH HB12B se destacan en color gris claro. Las sustituciones de aminoácidos de HB12B-9m (sec. con núm. de ident.: 44) (L20I, F27Y, T28A, R38I, V49I, F67A, R71A, L80M, I91Y) en relación con el dominio variable del anticuerpo injertado HB12B-(3-72/JH4) (sec. con núm. de ident.: 34) se destacan en color gris oscuro.

La Figura 2. Perfil de unión del anticuerpo anti-CD19 humanizado # 1, que comprende la VH HB12B-(3-72/JH4) (sec. con núm. de ident.: 34) y la VK HB12B 364987 (sec. con núm. de ident.: 62), a las células 300B4 que expresan el CD19 humano recombinante en el ensayo de ELISA basado en células. Las lecturas de OD450 para el anticuerpo anti-CD19 humanizado # 1 están marcadas con un cuadrado abierto. El anticuerpo quimérico HB12B que comprende la VH HB12B (sec. con núm. de ident.: 18) y la VK HB12B (sec. con núm. de ident.: 20) se usó como un patrón de referencia (círculo cerrado). Un anticuerpo IgG1 humano de especificidad irrelevante se incluyó en el ensayo como un control negativo (círculo abierto). El perfil de unión del anticuerpo anti-CD19 humanizado # 1 coincide con el del anticuerpo anti-CD19 quimérico.

La Figura 3. Perfil de unión de los anticuerpos anti-CD19 humanizados # 1, # 2 y # 3 a las células 300B4 que expresan el CD19 humano recombinante en un ensayo de ELISA basado en células. El anticuerpo anti-CD19 humanizado # 1 comprende la VH HB12B-(3-72/JH4) (sec. con núm. de ident.: 34) y la VK HB12B 364987 (sec. con núm. de ident.: 62). El anticuerpo anti-CD19 humanizado # 2 comprende la VH HB12B-(3-72/JH4) (sec. con núm. de ident.: 34) y la VK HB12B 3649 (sec. con núm. de ident.: 68). El anticuerpo anti-CD19 humanizado # 3 comprende la VH HB12B-(3-72/JH4) (sec. con núm. de ident.: 34) y la VK HB12B 36 (sec. con núm. de ident.: 70). El perfil de unión de los anticuerpos anti-CD19 humanizados # 1, # 2, # 3 se marcó con cuadrados, abiertos, círculos abiertos, y círculos cerrados, respectivamente. El anticuerpo quimérico HB12B que comprende la VH HB12B (sec. con núm. de ident.: 18) y VK HB12B (sec. con núm. de ident.: 20) se usó como patrón de referencia (cuadrado cerrado). El perfil de unión de los anticuerpos anti-CD19 humanizados # 1 y # 2 coincidió con la del anticuerpo anti-CD19 quimérico. La unión del

anticuerpo anti-CD19 humanizado # 3 a las células 300B4 que expresan el CD19 humano recombinante fue significativamente más débil que la del anticuerpo quimérico HB12B.

La Figura 4. SDS/PAGE de los anticuerpos anti-hCD19 purificados teñido con Coomassie. Se analizaron por SDS/PAGE 1 y 5 microgramos del anticuerpo anti-CD19 humanizado purificado # 2, fucosilado (3649) y afucosilado (3649-aFuc). Las preparaciones purificadas estaban sustancialmente libres de proteínas contaminantes.

La Figura 5. (A) La intensidad de fluorescencia media de las células Daudi inmuno-teñidas incubadas con diferentes concentraciones del anticuerpo anti-CD19 humanizado # 2. Las células Daudi se incubaron con diferentes concentraciones del anticuerpo anti-CD19 # 2, fucosilado (3649) o afucosilado (3649 aFuc-1 y 3649 aFuc-2). Las células se tiñeron posteriormente con IgG(ab)'2 de cabra anti-humano conjugado con RPE y se analizaron en una citometría de flujo según los protocolos estándar. Las células Daudi incubadas con un anticuerpo anti-CD20 se incluyeron como control positivo. Las preparaciones fucosiladas y afucosiladas del anticuerpo anti-CD19 humanizado # 2 presentaron los perfiles de tinción superpuestos. La intensidad de fluorescencia media de las células anti-CD19 teñidas es menor que la de las células anti-CD20 teñidas en todas las concentraciones de anticuerpos probadas. (B) la actividad ADCC *in vitro* del anticuerpo anti-CD19 humanizado, la actividad ADCC *in vitro* de las preparaciones del anticuerpo anti-CD19 humanizado # 2 fucosilado (3649) y afucosilado (3649-aFuc1 y 3649 aFuc2) se probó por medio del uso del kit CytoTox 96™ (Promega) según las instrucciones del fabricante. Las células Daudi se usaron como dianas. En el ensayo también se realizó por medio del uso de un anticuerpo anti-CD20 control positivo. Ambas preparaciones del anticuerpo anti-CD19 humanizado # 2 afucosilado, así como el anticuerpo anti-CD20 de control positivo mostraron una robusta actividad ADCC, similar. La actividad ADCC del anticuerpo anti-CD19 # 2 fucosilado es menor en las condiciones usadas.

La Figura 6. Actividad ADCC *in vitro* de los anticuerpos anti-CD19 humanizados. La actividad ADCC *in vitro*, del anticuerpo anti-CD19 humanizado # 2 fucosilado (3649) y afucosilado (3649-aFuc) se probó por medio del uso del kit CytoTox 96™ (Promega) según las instrucciones del fabricante. Las células Daudi sirvieron como blanco. Se usó como control positivo un anticuerpo anti-CD20. Una variante de Fc del anticuerpo anti-CD19 # 2 (3649-TM) con la ADCC suprimida se usó como control negativo. El anticuerpo anti-CD19 humanizado # 2 afucosilado (3649-aFuc) y el anticuerpo anti-CD20 de control positivo mostraron una robusta actividad ADCC, similar. La actividad ADCC del anticuerpo anti-CD19 humanizado # 2 fucosilado (3649) es más baja en las condiciones usadas. La variante de Fc del anticuerpo anti-CD19 # 2 de control negativo no mostró actividad ADCC en las condiciones usadas.

La Figura 7. Perfil de expresión de CD19, CD20, CD22 en las células Raji, Ramos, Daudi, y Namalwa. Las células Raji, Ramos, Daudi, y Namalwa se inmuno-tiñeron con anticuerpos primarios anti-CD19, anti-CD20 o anti-CD22 y secundarios IgG anti-ratón de cabra conjugados con EP, y posteriormente se analizaron en un citómetro de flujo. Los gráficos de barras representan la relación de la media del canal de fluorescencia obtenida con inmunotinción y el anticuerpo secundario solo tiñó las muestras control. La línea de células de mieloma múltiple RPMI 8226 que no expresa ni CD19, CD20 o CD22 se incluyó como control negativo. Se detectó significativa expresión de superficie de las tres moléculas en las células Raji, Ramos, y Daudi. Las células Namalwa mostraron CD19 y CD22, pero no CD20 en la superficie celular.

La Figura 8. Susceptibilidad de las células Raji (A), Daudi (B), Ramos (C), y Namalwa (D) a la ADCC mediada por el anti-CD19 # 2. Los ensayos de ADCC se realizaron por medio del uso del kit CytoTox96™ (Promega) según las instrucciones del fabricante. Los anticuerpos usados fueron: (i) el anti-CD19 # 2 afucosilado (3649-aFuc), (ii) la variante de Fc 3M del anti-CD19 # 2 (3649-3M), y (iii) un control de anti-CD20. La relación de efectora a diana fue de 2.5 a 1. Las cuatro líneas de células fueron susceptibles a la ADCC mediada por el anti-CD19 # 2. Sólo las células Raji, Daudi, y Ramos fueron susceptibles a la ADCC mediada por el anti-CD20.

La Figura 9. Susceptibilidad de las células B de amígdalas frescas a la ADCC mediada por el anti-CD19 # 2. Los ensayos de ADCC se realizaron por medio del uso del kit CytoTox 96™ (Promega) según las instrucciones del fabricante. Los anticuerpos usados fueron: (i) el anti-CD19 # 2 afucosilado (3649-aFuc), (ii) la variante de Fc 3M del anticuerpo anti-CD19 # 2 (3649-3M), y (iii) un control anti-CD20. La relación de efectora a diana fue de 2 a 1. Las células B de amígdala fueron susceptibles a la ADCC mediada por los tres anticuerpos probados.

La Figura 10. Los linfocitos circulantes se aislaron a partir de ratones C57B16 hCD19 tg +/-, C57B16 CD19 tg +/+, Balb/c hCD20 tg +/- y Balb/c. Las células aisladas se tiñeron con los anticuerpos anti-CD19 de ratón (α -mCD19) conjugado con PerCP, anti-CD3 conjugado con PE, anti-CD19 humano (α -hCD19) conjugado con Alexa488, y anti-CD20 humano (α -hCD20) conjugado con Alexa647. La n fue igual al número de animales analizados a partir de cada grupo. (A) La intensidad de fluorescencia media de las células CD3 medida en los canales específicos hCD19, hCD20 y mCD19, se presentó en un formato de gráfico de barras. (B) porcentaje de linfocitos CD3- mCD19+ en diferentes fondos genéticos.

La Figura 11. Depleción de las células B *in vivo* por el anticuerpo anti-CD19 # 2. (A) Animales C57B16 hCD19 tg +/- y (B) C57B16 hCD19 tg +/- se trataron con una única dosis i.v. de 250 ó 50 μ g del anticuerpo anti-CD19 # 2 (3649). Los

anticuerpos de control negativo usados fueron (i) la variante de Fc # 2 (3649 TM) de ADCC comprometida y (ii) un anticuerpo de especificidad irrelevante (R347). Los linfocitos circulantes se aislaron 7 días después del tratamiento. Las células se tiñeron con el anti-ratón CD19 (α -mCD19) conjugado con PerCP y los anticuerpos anti-CD3 conjugados con PE. Se presenta el porcentaje de células B mCD19+ CD3-. La n fue igual al número de animales analizados de cada grupo. Un tratamiento con una única dosis del anticuerpo anti-CD19 # 2 resultó en una depleción casi completa de las células B.

La Figura 12. Depleción de las células B in vivo por el anticuerpo anti-CD19 # 2. Los animales C57B16 hCD19 tg +/- y C57B16 hCD19 tg +/- se trataron con una única dosis i.v. de 250 o 50 μ g del anticuerpo anti-CD19 # 2 (3649). Los anticuerpos de control negativo usados fueron (i) la variante de Fc # 2 (3649 TM) de ADCC comprometida y (ii) un anticuerpo de especificidad irrelevante (R347). Las células del bazo se aislaron 7 días después del tratamiento. Las células se tiñeron con los anticuerpos anti-ratón CD19 (α -mCD19) conjugado con PerCP y anti-CD3 conjugado con PE. Se presenta el porcentaje de células B (MCD19 + CD3-) entre los linfocitos del bazo. La n fue igual al número de animales analizados de cada grupo. Un tratamiento con una única dosis del anticuerpo anti-CD19 # 2 resultó en la depleción casi completa de las células B.

La Figura 13. El anticuerpo anti-CD19 # 2 redujo significativamente el crecimiento del tumor en un sistema modelo in vivo. Los ratones CB17 SCID se inyectaron s.c. en el flanco posterior con 5×10^6 células Raji en el día 1. Los animales se trataron con cinco dosis cada dos semanas de 10 mg/kg del anticuerpo a partir del día 4. Los anticuerpos usados fueron: (i) el anti-CD19 # 2 (3649), (ii) la variante de Fc del anti-CD19 # 2 con la actividad ADCC reducida (3649-TM), (iii) el anti-CD20, y (iv) el control de isotipo de especificidad irrelevante (R347). A un grupo de animales control se les dio sólo PBS. El tamaño del tumor se midió dos veces a la semana por medio del uso de los procedimientos estándar.

La Figura 14. El anticuerpo anti-CD19 # 2 redujo significativamente el crecimiento del tumor en un sistema modelo in vivo. Los ratones CB17 SCID se inyectaron s.c. en el flanco posterior con 5×10^6 células Raji en el día 1. Los animales se trataron con cinco dosis cada dos semanas de 10 mg/kg o 2.5 mg/kg del anticuerpo a partir del día 4. Los anticuerpos usados fueron: (i) el anti-CD19 # 2 a 10 mg/kg o 2.5 mg/kg (3649, 10 mg/kg y 3649 * 2.5 mg/kg), (ii) la variante de Fc del anticuerpo anti-CD19 # 2 con actividad ADCC reducida a 10 mg/kg (3649-TM), (iii) la variante de Fc del anticuerpo anti-CD19 # 2 con mayor actividad ADCC humana a 10 mg/kg (3649-3M), (iv) el anti-CD20 a 10 mg/kg, y (v) el control de isotipo de especificidad irrelevante a 10 mg/kg (R347). A un grupo de animales control se les dio sólo PBS. El tamaño del tumor se midió dos veces a la semana por medio del uso de los procedimientos estándar.

La Figura 15 Perfil de unión de los anticuerpos anti-CD19 3649, 3649-3M, y 3649-aFuc al alelo 158V de Fc γ RIIIA según se determinó por ELISA. Se incluyó en el ensayo un anticuerpo anti-CD20 como control de referencia. La afinidad de unión del anticuerpo variante de Fc 3649-3M y el anticuerpo afucosilado 3649-aFuc al Fc γ RIIIA fue mucho mayor que la del anticuerpo fucosilado 3649. Los anticuerpos 3649 y anti-CD20 y tuvieron los mismos perfiles de unión.

La Figura 16. El genotipo del Fc γ RIIIA de las células efectoras influyó en la actividad ADCC *in vitro* del anticuerpo anti-CD19 # 2. Los ensayos de ADCC se realizaron con el kit CytoTox96™ (Promega) según las instrucciones del fabricante. Los anticuerpos usados son: (i) el anti-CD19 # 2 afucosilado (3649-aFuc), (ii) la variante de Fc 3M del anti-CD19 # 2 (3649-3M), y (iii) un control anti-CD20. Las células Daudi sirvieron como diana. Tanto una línea de células NK (A) como las células NK (BE) recién aisladas se usaron como células efectoras. Las células NK con el genotipo de Fc γ RIIIA V158/V158 (C), V158/F158 (D), y F158/F158 (E) se probaron. Las células NK que comprendían al menos una copia de la isoforma de alta afinidad de los receptores Fc γ RIIIA (los genotipos V158/V158 y V158/F158) fueron células efectoras más eficientes que las células NK homocigotas para los alelos de baja afinidad (el genotipo F158/F158). La actividad ADCC del anticuerpo fucosilado (3649) mediada por las células NK V158/V158 o V158/F158 (C, D) observada, fue comparable a la actividad ADCC del anticuerpo afucosilado (3649-aFuc) mediada por las células NK (F158/F158 E).

La Figura 17. Esquema de identificación de los subconjuntos de células B (A) circulante, (B) esplénica, (C) médula ósea, y (D) peritoneal basado en el fenotipo de la expresión del antígeno en la superficie celular. Poblaciones de células aisladas teñidas con fluorescencia, se analizaron en un citómetro de flujo. Los subconjuntos de células B se identificaron y se midieron por medio del uso secuencial de ventanas. El flujo del proceso se indica por flechas en negrita, gris. Por ejemplo, las células B foliculares del bazo se identificaron como sigue: (i) las células vivas se encierran en base a la baja tinción de 7AAD, (ii) los linfocitos de la fracción de células vivas se identificaron basados en su característica FSC y el fenotipo SSC, (iii) las células B entre los linfocitos vivos se identificaron por medio del uso de la tinción del anti-mCD19 y anti-B220, (iv) las células B1a se separaron de las células B basados en las diferencias en la expresión de B220, (v) la población de células B de transición y maduras se distinguieron entre sí basados en la expresión diferencial del CD93, (vi) la subpoblación de células B foliculares de las células B maduras se separaron de la zona marginal de la fracción de células B basados en las diferencias de la expresión del CD23.

La Figura 18. Perfil de unión de los fragmentos Fab del anticuerpo anti-CD19 3649 madurado por afinidad a las células 300B4 que expresaban el CD19 humano recombinante en un ensayo de ELISA basado en células. Se mostraron los resultados obtenidos con una muestra representativa de los Fab que comprendían sustituciones de un solo amino ácido en la CDR3 VH. El Fab anti-CD19 3649 (3649 peri) se usó como patrón de referencia. La afinidad de los Fab 4G6 y 4B7 a células 300B4 recombinantes que expresaban el CD19 humano fue significativamente mayor que la del control de Fab 3649. Todos los otros Fab probados tuvieron afinidades similares a la del Fab 3649 de control.

La Figura 19. Perfil de unión de los fragmentos Fab del anticuerpo anti-CD19 3649 madurado por afinidad a las células 300B4 que expresaban el CD19 humano recombinante en un ensayo de ELISA basado en células. Los Fab caracterizados aquí se identificaron a partir de una genoteca que comprendía todas las combinaciones posibles de las sustituciones de aminoácidos individuales beneficiosas, identificadas en las anteriores detecciones de las CDR específicas. Se mostró el perfil de unión de seis Fab con la mayor afinidad por las células 300B4 que expresaban el CD19 humano recombinante. El Fab anti-CD19 3649 (3649 peri) se usó como patrón de referencia. La afinidad por las células 300B4 que expresaban el CD19 humano recombinante de los seis Fab madurados por afinidad fue mayor que la del Fab 3649 de control.

La Figura 20. Perfil de unión de los anticuerpos anti-CD19 3649 madurados por afinidad a las células 300B4 que expresaban el CD19 humano recombinante en un ensayo de ELISA basado en células. El anticuerpo anti-CD19 3649 se usó como patrón de referencia. El perfil de unión de la IgG 16C9 fue similar a la del anticuerpo de control 3649. La afinidad de unión de los anticuerpos madurados por afinidad 14H5, 15D1, 15D7, 16C4, y 7E12 fue mayor que la del anticuerpo 3649 de control.

La Figura 21. Perfil de unión de los anticuerpos anti-CD19 3649 madurados por afinidad a las células Raji que expresaban el CD19 en el ensayo de ELISA basado en células. El anticuerpo anti-CD19 3649 se usó como patrón de referencia. La afinidad de unión de los seis anticuerpos (14H5, 15D1, 15D7, 16C4, 16C9 y 7E12) fue mayor que la del anticuerpo 3649 de control.

La Figura 22. Perfil de unión de los anticuerpos anti-CD19 3649 madurados por afinidad a las células Daudi que expresaban el CD19 en un ensayo de ELISA basado en células. El anticuerpo anti-CD19 3649 se usó como patrón de referencia. La afinidad de unión de los seis anticuerpos (14H5, 15D1, 15D7, 16C4, 16C9 y 7E12) fue mayor que la del anticuerpo 3649 de control.

La Figura 23. Perfil de unión de los anticuerpos anti-CD19 3649 madurados por afinidad a las células 300B4 que expresaban el CD19 humano recombinante en un ensayo de ELISA basado en células. Los 14H5-YG, 14H5-DG, y 14H5 LG fueron variantes de sustitución de aminoácidos únicos del anticuerpo anti-CD19 3649 madurado por afinidad. Los anticuerpos anti-CD19 3649 madurados por afinidad 14H4 y 16C4 se usaron como patrón de referencia. La afinidad de unión de los anticuerpos 14H5-YG, 14H5-DG, y 14H5-LG fue menor que la de los anticuerpos 14H5 y 16C4 de control.

La Figura 24. Cinética de comparación de la constante de disociación de los anticuerpos anti-CD19 3649 madurados por afinidad. (A) las células Ramos se incubaron con los anticuerpos anti-CD19 madurados por afinidad, se lavaron y se incubaron adicionalmente a 37 ° C durante 0, 30 o 60 minutos. Las células se tiñeron con un anticuerpo secundario fluorescente al final del período de incubación y se analizaron en un citómetro de flujo. Se muestra la media de la intensidad de fluorescencia de las células después de 0, 30 y 60 minutos de incubación. La intensidad de fluorescencia media (MFI) observada en el momento 0 se estableció en 100% para cada uno de los anticuerpos estudiados. El anticuerpo anti-CD19 3649 y un anticuerpo anti-CD20 se usaron como patrones de referencia. La eliminación de los seis anticuerpos anti-CD19 3649 madurados por afinidad (14H5, 15D1, 15D7, 16C4, 16C9 y 7E12) de la superficie celular fue más lenta que la de los patrones de referencia. (B) las células Ramos se tiñeron con un anticuerpo anti-CD19 HB12B, 3649 o 16C4 conjugado con Alexa 647, se lavaron y se incubaron adicionalmente a 37° C durante 0, 30 o 60 minutos. Las células se analizaron en citómetro de flujo al final del período de incubación. Un anticuerpo anti-CD20 directamente conjugado se incluyó en el experimento como un control de referencia. La intensidad de fluorescencia media (MFI) detectada después de diferentes periodos de incubación se expresó como la relación de la MFI vista en el tiempo 0. La pérdida de la MFI después de la tinción con el anticuerpo anti-CD19 16C4 madurado por afinidad fue mucho más lenta que la pérdida de la señal observada con los anticuerpos anti-CD19 3649 y HB12B.

La Figura 25. Perfil de unión de los anticuerpos anti-CD19 3649 madurados por afinidad a células Daudi. Las células Daudi se tiñeron con los anticuerpos anti-CD19 14H5, 15D1, 15D7, 16C4, 16C9 o 7E12 madurados por afinidad y un anticuerpo secundario marcado con fluorescencia. El anticuerpo anti-CD19 3649 se usó como patrón de referencia. Las células teñidas se analizaron en un citómetro de flujo. La mediana de la intensidad de fluorescencia (mediana de FI) observada en las diferentes concentraciones de anticuerpos se presentó en un gráfico. La mediana de FI para los anticuerpos anti-CD19 3649 madurados por afinidad fue mayor que la del patrón de referencia.

La Figura 26. Actividad ADCC *in vitro*, de los anticuerpos anti-CD19 3649 madurados por afinidad. (A) la actividad ADCC *in vitro* de los anticuerpos anti-CD19 14H5, 14H5-DG y 16C4 madurados por afinidad se probó con las células Daudi diana. El anticuerpo anti-CD19 3649 se usó como patrón de referencia. La actividad ADCC de los tres anticuerpos madurados por afinidad fue mayor que la del patrón de referencia a baja concentración del anticuerpo (0.01 y 0.1 µg/ml de anticuerpo). La actividad ADCC de los tres anticuerpos madurados por afinidad fue paralela a la actividad del patrón de referencia a altas concentraciones de anticuerpos (1 y 10 µg/ml de anticuerpo). (B) La actividad ADCC del anticuerpo 16C4 afucosilado (16C4-aFuc) se determinó en un ensayo *in vitro* por medio del uso de las células Daudi diana. La actividad ADCC del 16C4-aFuc fue significativamente mayor que la del control de referencia 3649-aFuc, anti-CD20 y anticuerpos de referencia 16C4 fucosilados.

La Figura 27. IEF-PAGE teñida con Coomassie de los anticuerpos anti-CD19 madurados por afinidad. El punto isoeléctrico de los anticuerpos 16C4, 16C9, 7E12, 14H5, 15D7, 15D1, 14H5-DG, y 3649 fue 7.83, 8.04, 7.69, 7.76, 7.61, 7.72, 7.48 y 7.75, respectivamente.

La Figura 28. Depleción de las células B *in vivo* por el anticuerpo anti-CD19 3649 afucosilado. Los animales C57B16 hCD19 tg +/- se trataron con una única dosis iv de 10, 50, o 250 µg del anticuerpo anti-CD19 fucosilado 3649 (3649) o anticuerpo anti-CD19 afucosilado 3649 (3649-aFuc). Los animales de control negativo se trataron con (i) la variante de Fc del anticuerpo anti-CD19 3649 (3649 TM) de ADCC comprometida o (ii) un anticuerpo de especificidad irrelevante (R347). Los linfocitos circulantes (A) o linfocitos esplénicos (B) se aislaron 7 días después del tratamiento con el anticuerpo. Las células aisladas se inmuno-tiñeron como se describió en la Tabla 5 para identificar diferentes poblaciones de células B. Se presentó el porcentaje de las células B B220+ CD19+. El anticuerpo anti-CD19 afucosilado 3649 logró una depleción significativamente mayor de células B que la misma cantidad del anticuerpo anti-CD19 fucosilado. No se detectó depleción de las células B en los animales tratados con el anticuerpo 3649TM de control.

La Figura 29. Activación de las células NK aumentada en ratones tratados con el anticuerpo anti-CD19 3649 afucosilado. Los animales C57B16 hCD19 tg +/- se trataron con una única dosis iv de 10 µg del anticuerpo anti-CD19 fucosilado 3649 (3649) o el anticuerpo anti-CD19 afucosilado 3649 (3649-aFuc). Los animales de control negativo se trataron con la misma cantidad de un anticuerpo isotipo de especificidad irrelevante (R347). Los linfocitos circulantes se aislaron 7 días después del tratamiento con el anticuerpo. Las células aisladas se tiñeron con los anticuerpos anti-NK1.1, anti-DX5, y anti-CD107a marcados con fluorescencia. Se presentó el gráfico de CD107a vs NK1.1 de los linfocitos vivos encerrados en NK1.1 +, DX5 +. Las células NK aisladas de animales tratados con el anticuerpo anti-CD19 3649 afucosilado mostraron unos porcentajes más altos de CD107a en su superficie celular que las células NK aisladas de animales tratados con el anticuerpo anti-CD19 fucosilado 3649.

La Figura 30. El anticuerpo anti-CD19 # 2 afucosilado (3649-aFuc) redujo significativamente el crecimiento tumoral *in vivo* en un sistema modelo. Los ratones SCID CB17 se inyectaron s.c. en el flanco posterior con 5×10^6 células Raji en el día 1. Los animales se trataron con cinco dosis cada dos semanas de 10 mg/kg o 2.5 mg/kg del anticuerpo a partir del día 4. Los anticuerpos usados fueron: (i) el anti-CD19 # 2 fucosilado a 10 mg/kg (3649), (ii) el anti-CD19 # 2 afucosilado a 10 mg/kg o 2.5 mg/kg (3649-aFuc), (iii) el anti-CD20 a 10 mg/kg, y (iv) el anticuerpo de control de isotipo de especificidad irrelevante a 10 mg/kg (R347). Un grupo de animales control se les dio sólo PBS. El tamaño del tumor se midió dos veces a la semana por medio del uso de los procedimientos estándar.

La Figura 31. Depleción de las células B *in vivo* por medio del uso de los anticuerpos anti-CD19 16C4 y 14H5 madurados por afinidad. Los animales C57B16 hCD19 tg +/- se trataron con una única dosis iv de 10, 50, o 250 µg del anticuerpo anti-CD19 16C4 fucosilado madurado por afinidad (16C4) o el anticuerpo anti-CD19 14H5DG madurado por afinidad (14H5DG). Los animales de control de referencia se trataron con (i) el anticuerpo anti-CD19 3649 (3649), (ii) la variante de Fc del anticuerpo anti-CD19 3649 de ADCC aumentada (3649 3M), y (iii) el anticuerpo anti-CD19 3649 afucosilado (3649 - aFuc). Los animales de control negativo se trataron con (i) la variante de Fc del anticuerpo anti-CD19 3649 de ADCC comprometida (3649 TM) o (ii) un anticuerpo de especificidad irrelevante (R347). Los linfocitos circulantes (A) o los linfocitos esplénicos (B) se aislaron 7 días después del tratamiento con el anticuerpo. Las células aisladas se inmuno-tiñeron como se describió en la Tabla 5 para identificar diferentes poblaciones de células B. Se mostraron los porcentaje de células B B220 + CD19 +. El anticuerpo anti-CD19 16C4 madurado por afinidad logró una depleción de células B ligeramente superior que el anticuerpo anti-CD19 3649 parental. Los anticuerpos 3649-aFuc y 3649 3M lograron una mejor depleción que el anticuerpo 16C4 madurado por afinidad. El anticuerpo anti-CD19 14H5DG madurado por afinidad fue menos eficiente al depletar las células B que el anticuerpo anti-CD19 3649 parental. Los valores dentro del panel (A) fueron los del porcentaje de depleción logrado por un determinado anticuerpo.

La Figura 32. Actividad de unión del Fab 64D4 madurado por afinidad a células 300B4 que expresaban el CD19 humano recombinante en un ensayo de unión basado en células (Lu y otros, J. Immunol. Methods 314:74-79 (2006)). La 64D4 es una variante del anticuerpo anti-CD19 16C4 que comprende una única sustitución de aminoácido en la CDR2 VH. Los Fab anti-CD19 16C4 y 3649 (Fab 16C4sup y 3649sup, respectivamente) se usaron como patrones de referencia. La

afinidad del Fab 64D4 por las células 300B4 que expresaban el CD19 humano recombinante fue significativamente mayor que la de los Fab 16C4 y Fab 3649 de control.

- La Figura 33. Caracterización de la variante de Fab anti-CD19 madurada por afinidad aislada a partir de la genoteca combinatoria presentada en fago. El perfil de unión de las variantes del Fab 16C4 maduras por afinidad al antígeno CD19 humano presentado en la superficie celular se midió en un ensayo de unión basado en células que usó (A) células 300B4 y (B) células Raji (Lu y otros, J. Immunol. Methods 314:74 -79 (2006)). Los Fab anti-CD19 16C4 y 3649 (Fab 16C4^{sup} y 3649^{sup}, respectivamente) se usaron como patrones de referencia. La afinidad de unión de los Fab 6C11, 2B11, 3B4, 5C11, 3C3, 9G7, 1H4, y 5C4 madurados por afinidad a células 300B4 y Raji fue mayor que la de los Fab 3649 y 16C4 de control. (C) La secuencia de aminoácidos de los clones de Fab madurados por afinidad se determinó por medio del uso de métodos estándar de laboratorio. Se mostraron las secuencias de las CDR de los clones de Fab únicos. Los residuos de aminoácidos diferentes de los de la secuencia 16C4 parental se imprimieron por medio del uso del código de aminoácidos de una letra; los residuos idénticos a la secuencia parental se marcaron con una "-".
- La Figura 34. Perfil de unión de los anticuerpos anti-CD19 1gG 2B11, 3C3, 5C4, 6C11, 6F7 y 9G7 madurados por afinidad a las células 300B4 que expresaban CD19 humano recombinante. La actividad de unión se midió por medio del uso de un ensayo basado en células (Lu y otros, J. Immunol. Methods 314:74-79 (2006)). Los anticuerpos anti-CD19 16C4 y 3649 se usaron como patrones de referencia. La afinidad de unión de los anticuerpos anti-CD19 madurados por afinidad evaluados a las células 300B4 fue mayor que la de los anticuerpos de la referencia 16C4 y 3649.
- La Figura 35. Perfil de unión de los anticuerpos anti-CD19 16C4 madurados por afinidad a (A) células Raji y (B) células Daudi. Las células se tiñeron con los anticuerpos anti-CD19 3C3, 6C11 o 9G7 madurados por afinidad y un anticuerpo secundario marcado con fluorescencia. El anticuerpo anti-CD19 16C4 se usó como patrón de referencia. Las células teñidas se analizaron en un citómetro de flujo. Se presentó la mediana de la intensidad de fluorescencia (FI mediana) observada en las diferentes concentraciones de anticuerpos. La FI mediana de las células teñidas con las variantes de los anticuerpos anti-CD19 16C4 madurados por afinidad fue mayor que la de las células teñidas con los patrones de referencia a la concentración del anticuerpo primario de 0.0625 - 0.125 µg/ml. La FI mediana obtenida por medio del uso de los anticuerpos madurados por afinidad fue sustancialmente la misma que para el anticuerpo de referencia en el intervalo 0.25-10 µg/ml.
- La Figura 36. La actividad ADCC *in vitro*, de las variantes de los anticuerpos anti-CD19 16C4 madurados por afinidad. La actividad ADCC *in vitro* de los anticuerpos anti-CD19 3C3, 6C11 o 9G7 madurados por afinidad se probó con células Raji diana. El anticuerpo anti-CD19 16C4 se usó como patrón de referencia. La actividad ADCC de los tres anticuerpos madurados por afinidad fue sustancialmente la misma que la del patrón de referencia en todas las concentraciones evaluadas (0.01-10 µg/ml).
- La Figura 37. La actividad ADCC *in vitro*, de las variantes de los anticuerpos anti-CD19 16C4 madurados por afinidad. La actividad ADCC *in vitro* de los anticuerpos anti-CD19 3C3, 6C11 o 9G7 madurados por afinidad se probó con células Daudi diana. El anticuerpo anti-CD19 16C4 se usó como patrón de referencia. La actividad ADCC de los tres anticuerpos madurados por afinidad fue sustancialmente la misma que la del patrón de referencia en todas las concentraciones evaluadas (0.01-10 µg/ml).
- La Figura 38. Recuperación a largo plazo de las células B y los niveles séricos de inmunoglobulinas después de la depleción de las células B con una única dosis i.v. administrada del anticuerpo anti-CD19 16C4 afucosilado. (A) Protocolo experimental. A los grupos de cuatro o cinco ratones huCD19 tg +/- se les administró una única dosis iv de 250, 50, o 10 µg del anticuerpo anti-CD19 16C4 afucosilado (16C4 aFuc). Los grupos control se trataron con PBS o con 250 µg de anticuerpo control de especificidad irrelevante (R347). A los animales se les extrajo sangre una vez cada dos semanas; la primera extracción de sangre se realizó siete días antes de la administración del anticuerpo depletante. Los resultados de las primeras 11 semanas se resumen en los paneles. (B) el peso corporal de los animales en todos los grupos se mantuvo normal. Los niveles de las células B se expresaron como (C) la fracción de linfocitos o como (D) el número de células B por microlitro de sangre. Las tres dosis de anticuerpo 16C4 aFuc lograron la depleción completa de las células B. La recuperación de las células B se completó en la semana 5 y la semana 9 en animales que recibieron 10 y 50 µg del anticuerpo 16C4 aFuc, respectivamente. La recuperación de las células B fue todavía incompleta 11 semanas después de la administración de 250 µg del anticuerpo 16C4 aFuc. La IgM (E), IgG1 (F), e IgG2b (G) del suero se mantuvieron sin cambios después de la administración de 50 o 250 µg del 16C4 aFuc. Los niveles séricos de inmunoglobulinas aumentaron después de la administración de 10 µg del anticuerpo 16C4 aFuc o el anticuerpo R347 de control o PBS. Los datos indicaron que 16C4 aFuc suprimió la producción de inmunoglobulinas en curso, pero tuvo un impacto mínimo sobre la inmunoglobulina pre-existente en el suero.
- La Figura 39. El anticuerpo anti-CD19 indujo la señalización intracelular. (AB) el tratamiento con los anticuerpos 3649, 3649-TM, 3649 3M, 3649 aFuc, o 16C4 aumentó significativamente el nivel de fosforilación en tirosina del CD19 en las

células Raji. El tratamiento con los anticuerpos anti-CD19 (CD) no inhibió la fosforilación de ERK1/2 inducida por el tratamiento anti-IgM.

La Figura 40. El tratamiento con el anticuerpo anti-CD19 inhibió la proliferación de las células B mediada por el anti-IgM/CD40.

La Figura 41. El tratamiento con el anticuerpo anti-CD19 inhibió la proliferación de las células B periféricas purificadas inducida por el anti-IgM/CpG. (A) el perfil de la intensidad de fluorescencia de las células B de sangre periférica purificadas y teñidas con CFSE después de 4 días de incubación en presencia del anti-IgM (1µg/ml) y CPG (2µg/ml). Los perfiles CFSE de un primer control de población de células no estimuladas y un segundo control de población de células estimuladas sólo con CpG se incluyeron como patrones de referencia. (B) los perfiles CFSE de las células B después de 4 días de estimulación con el anti-IgM/CpG en presencia del anti-CD19 16C4 o el anticuerpo R347 de control. La proliferación de células B por el anti-IgM/CpG se redujo significativamente en presencia de anticuerpo 16C4.

La Figura 42. La variante de Fc del anticuerpo anti-CD19 3649-3M es un inhibidor más eficaz de la proliferación de las células B inducida por el anti-IgM/CpG que la variante de Fc del anticuerpo 3649-TM. Los perfiles CFSE de las células B después de 4 días de estimulación por el anti-IgM/CpG en presencia de (A) el anticuerpo R347 de control, (B) el anticuerpos anti-CD19 3649-TM, o (C) el anticuerpo anti-CD19 3649-3M.

La Figura 43. La señalización inducida por el anticuerpo 3649-3M a través de los receptores CD19 y FcγRIIB inhibió sinérgicamente la proliferación de las células B mediada por el anti-IgM/CpG.

La Figura 44. Las células Raji internalizaron de manera eficiente el anticuerpo anti-CD19 unido a la superficie. El 35% del 16C4 unido a la superficie y el 55% de los anticuerpos anti-CD19 HB12B y 3649 unidos a la superficie se internalizaron después de 60 minutos de incubación a 37 ° C.

La Figura 45. La expresión superficial del CD19 se redujo significativamente después de 24 horas de tratamiento con el anticuerpo anti-CD19. La expresión de superficie del CD19 se redujo en 55-90% en (A) las células Raji (B) las células B periféricas purificadas, después de 24 horas de incubación en presencia de los anticuerpos anti-CD19 3649, 3649-TM, 3649 3M, 3649 aFuc-, o 16C4.

5. Descripción detallada

La presente invención se refiere a anticuerpos anti-CD19 humanizados, que se unen al antígeno CD19 humano, así como a composiciones que comprenden dichos anticuerpos. En ciertas modalidades un anticuerpo anti-CD19 humanizado, puede mediar la citotoxicidad mediada por células dependiente de antígeno (ADCC). En otras modalidades, la presente invención se dirige hacia composiciones que comprenden un anticuerpo anti-CD19 humanizado, del isotipo humano IgG1 y/o IgG3, así como a un anticuerpo anti-CD19 humanizado, del isotipo humano IgG2 y/o IgG4, que pueden mediar la ADCC, la CDC y/o la apoptosis humana. Un anticuerpo anti-CD19 humanizado puede inhibir la proliferación de las células B estimulada por el anti-IgM/CpG.

Se proporcionan las versiones quiméricas y humanizadas de los anti-. Se proporcionan los anticuerpos monoclonales de ratón CD19 HB12A y HB12B. Un anticuerpo anti-CD19 humanizado de la invención puede unirse al CD19 humano con una afinidad comparable a la afinidad de unión del HB12A o HB12B o comparable a la afinidad de unión de un anticuerpo quimérico HB12B.

La numeración de Kabat se basa en el trabajo seminal de Kabat y otros, (1991), Sequences of Proteins of Immunological Interest, publicación núm. 91-3242, publicado como un conjunto de tres volúmenes por National Institutes of Health, National Technical Information Service (en adelante "Kabat"). Kabat proporciona múltiples alineaciones de secuencias de cadenas de inmunoglobulinas de isotipos de anticuerpos de numerosas especies. Las secuencias alineadas se numeran de acuerdo con un único sistema de numeración, el sistema de numeración de Kabat. Las secuencias de Kabat se actualizan desde su publicación de 1991 y están disponibles en una base de datos electrónica de secuencias (la última versión descargable de 1997). Cualquier secuencia de inmunoglobulina puede numerarse de acuerdo con Kabat al alinear una secuencia con la secuencia de referencia de Kabat. En consecuencia, el sistema de numeración de Kabat proporciona un sistema uniforme de numeración de cadenas de inmunoglobulinas. A menos que se indique lo contrario, todas las secuencias de aminoácidos de inmunoglobulinas descritas en la presente se numeran de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat. Del mismo modo, todas las posiciones individuales de aminoácidos que se refieren en la presente están numeradas de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat.

Una VH humanizada de la invención puede comprender adicionalmente una secuencia líder de MGDNDIHFAFLSTGVHS (sec. con núm. de ident.: 83).

Una VK humanizada de la invención puede comprender adicionalmente una secuencia líder MDMRVPAQLLGLLLLWLPQAKC (sec. con núm. de ident.: 84) seleccionada del péptido líder del gen VKI-L12 humano.

- 5 Los anticuerpos anti-CD19 descritos en la presente pueden tener una alta afinidad de unión al antígeno CD19 humano (hCD19). Por ejemplo, un anticuerpo descrito en la presente puede tener una tasa de asociación constante o tasa K_{on} (anticuerpos (Ab) + antígeno (Ag) $\xrightarrow{k_{on}}$ Ab-Ag) de al menos $2 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{S}^{-1}$, al menos $5 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{S}^{-1}$, al menos $10^6 \text{ M}^{-1}\text{S}^{-1}$, al menos $5 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{S}^{-1}$, al menos $10^7 \text{ M}^{-1}\text{S}^{-1}$, al menos $5 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{S}^{-1}$, o al menos $10^8 \text{ M}^{-1}\text{S}^{-1}$.
- 10 Un anticuerpo anti-CD19 de la invención puede tener una tasa de K_{off} ((Ab-Ag) $\xrightarrow{k_{off}}$ anticuerpo (Ab) + antígeno (Ag)) menor que $5 \times 10^{-1} \text{ S}^{-1}$, menor que 10^{-1} S^{-1} , menor que $5 \times 10^{-2} \text{ S}^{-1}$, menor que 10^{-2} S^{-1} , menor que $5 \times 10^{-3} \text{ S}^{-1}$, menor que 10^{-3} S^{-1} , menor que $5 \times 10^{-4} \text{ S}^{-1}$, o menor que 10^{-4} S^{-1} . En otra modalidad, un anticuerpo de la invención tiene un K_{off} menor que $5 \times 10^{-5} \text{ S}^{-1}$, menor que 10^{-5} S^{-1} , menor que $5 \times 10^{-6} \text{ S}^{-1}$, menor que 10^{-6} S^{-1} , menor que $5 \times 10^{-7} \text{ S}^{-1}$, menor que 10^{-7} S^{-1} , menor que $5 \times 10^{-8} \text{ S}^{-1}$, menor que 10^{-8} S^{-1} , menor que $5 \times 10^{-9} \text{ S}^{-1}$, menor que 10^{-9} S^{-1} , o menor que 10^{-10} S^{-1} .
- 15 Un anticuerpo anti-CD19 de la invención puede tener una constante de afinidad o K_a (k_{on}/k_{off}) de al menos 10^2 M^{-1} , al menos $5 \times 10^2 \text{ M}^{-1}$, al menos 10^3 M^{-1} , al menos $5 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$, al menos 10^4 M^{-1} , al menos $5 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$, al menos 10^5 M^{-1} , al menos $5 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$, al menos 10^6 M^{-1} , al menos $5 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$, al menos 10^7 M^{-1} , al menos $5 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$, al menos 10^8 M^{-1} , al menos $5 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$, al menos 10^9 M^{-1} , al menos $5 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$, al menos 10^{10} M^{-1} , al menos $5 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$, al menos 10^{11} M^{-1} , al menos $5 \times 10^{11} \text{ M}^{-1}$, al menos 10^{12} M^{-1} , al menos $5 \times 10^{12} \text{ M}^{-1}$, al menos 10^{13} M^{-1} , al menos $5 \times 10^{13} \text{ M}^{-1}$, al menos 10^{14} M^{-1} , al menos $5 \times 10^{14} \text{ M}^{-1}$, al menos 10^{15} M^{-1} , o al menos $5 \times 10^{15} \text{ M}^{-1}$. Un anticuerpo anti-CD19 de la invención puede tener una constante de disociación o K_d (k_{off}/k_{on}) menor que $5 \times 10^{-2} \text{ M}$, menor que 10^{-2} M , menor que $5 \times 10^{-3} \text{ M}$, menor que 10^{-3} M , menor que $5 \times 10^{-4} \text{ M}$, menor que 10^{-4} M , menor que $5 \times 10^{-5} \text{ M}$, menor que 10^{-5} M , menor que $5 \times 10^{-6} \text{ M}$, menor que 10^{-6} M , menor que $5 \times 10^{-7} \text{ M}$, menor que 10^{-7} M , menor que $5 \times 10^{-8} \text{ M}$, menor que 10^{-8} M , menor que $5 \times 10^{-9} \text{ M}$, menor que 10^{-9} M , menor que $5 \times 10^{-10} \text{ M}$, menor que 10^{-10} M , menor que $5 \times 10^{-11} \text{ M}$, menor que 10^{-11} M , menor que $5 \times 10^{-12} \text{ M}$, menor que 10^{-12} M , menor que $5 \times 10^{-13} \text{ M}$, menor que 10^{-13} M , menor que $5 \times 10^{-14} \text{ M}$, menor que 10^{-14} M , menor que $5 \times 10^{-15} \text{ M}$, o menor que 10^{-15} M .
- 20 Un anticuerpo de la invención usado de acuerdo con un método descrito en la presente puede unirse inmunoespecíficamente al CD19 humano y pueden tener una constante de disociación (K_d) menor que 3000 pM, menor que 2500 pM, menor que 2000 pM, menor que 1500 pM, menor que 1000 pM, menor que 750 pM, menor que 500 pM, menor que 250 pM, menor que 200 pM, menor que 150 pM, menor que 100 pM, menor que 75 pM, evaluado por un método descrito en la presente o conocido para alguien con experiencia en la materia (por ejemplo, un ensayo BIAcore, ELISA) (Biacore International AB, Uppsala, Suecia). Un anticuerpo de la invención usado de acuerdo con un método descrito en la presente puede unirse inmuno-específicamente a un antígeno CD19 humano y puede tener una constante de disociación (K_d) entre 25 a 3400 pM, 25 a 3000 pM, 25 a 2500 pM, 25 a 2000 pM, 25 a 1500 pM, 25 a 1000 pM, 25 a 750 pM, 25 a 500 pM, 25 a 250 pM, 25 a 100 pM, 25 a 75 pM, 25 a 50 pM evaluado por medio del uso de un método descrito en la presente o conocido para alguien con experiencia en la materia (por ejemplo, un ensayo BIAcore, ELISA).
- 25 Un anticuerpo anti-CD19 de la invención usado de acuerdo con un método descrito en la presente puede unirse inmuno-específicamente al hCD19 y puede tener una constante de disociación (K_d) de 500 pM, 100 pM, 75 pM o 50 pM evaluado por medio del uso de un método descrito en la presente o conocido para alguien con experiencia en la materia (por ejemplo, un ensayo BIAcore, ELISA).
- 30 La invención proporciona adicionalmente polinucleótidos que comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica un anticuerpo anti-CD19 humanizado, descrito en la presente o fragmentos de éste.
- 35 Las condiciones de hibridación astringentes incluyen, pero no se limitan a, la hibridación del filtro unido a ADN en cloruro de sodio/citrato de sodio (SSC) 6X a aproximadamente 45°C, seguido por uno o más lavados en 0.2 X SSC/0.1% SDS a aproximadamente 50-65°C, condiciones altamente astringentes tal como la hibridación del filtro unido al ADN en SSC 6X a aproximadamente 45°C, seguido por uno o más lavados en SSC 0.1x/ SDS 0.2% a aproximadamente 60°C, o cualesquiera otras condiciones de hibridación astringentes conocidas por aquellos con experiencia en la materia (ver, por ejemplo, Ausubel, FM y otros, eds 1989. Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 1, Green Publishing Associates, Inc. y John Wiley and Sons, Inc., Nueva York, en las páginas 6.3.1 a 6.3.6 y 2.10.3).
- 40 Los polinucleótidos pueden obtenerse, y la secuencia de nucleótidos de los polinucleótidos pueden determinarse, por cualquier método conocido en la materia. Por ejemplo, si se conoce la secuencia de nucleótidos del anticuerpo, puede ensamblarse un polinucleótido de codificación del anticuerpo a partir de oligonucleótidos sintetizados químicamente (por ejemplo, como se describe en Kutmeier y otros, Biotechniques 17:242 (1994)), el cual, brevemente, involucra la síntesis de oligonucleótidos que se solapan que contengan porciones de la secuencia de codificación del anticuerpo, el recocido y la ligación de estos oligonucleótidos y, luego la amplificación de los oligonucleótidos ligados por la PCR.
- 45
- 50
- 55
- 60

También puede generarse un polinucleótido de codificación de un anticuerpo a partir del ácido nucleico de una fuente adecuada. Si un clon que contiene un ácido nucleico de codificación de un anticuerpo particular no está disponible, pero se conoce la secuencia de la molécula de anticuerpo, un ácido nucleico de codificación de la inmunoglobulina puede sintetizarse químicamente o puede obtenerse de una fuente adecuada (por ejemplo, una genoteca de ADNc, o una genoteca de ADNc generada de, el ácido nucleico del anticuerpo, preferentemente poliA+ARN, aislado de cualquier tejido o de células que expresen el anticuerpo, tal como las células del hibridoma seleccionado para expresar un anticuerpo) por amplificación por PCR por medio del uso de cebadores sintéticos que hibriden en los extremos 3' y 5' de la secuencia o por clonación por medio del uso de una sonda de oligonucleótido específica para la secuencia del gen particular para identificar, por ejemplo, un clon de ADNc de una genoteca de ADNc de codificación del anticuerpo. Los ácidos nucleicos amplificados generados por la PCR pueden luego clonarse en vectores de clonación replicables por medio del uso de cualquier método bien conocido en la materia.

Los anticuerpos pueden depletar de manera eficiente las células B que expresan una molécula de CD19 humano recombinante en un sistema modelo de ratón transgénico hCD19 (ver, Yazawa y otros, Proc Natl Acad Sci Estados Unidos A. 102 (42):15178-83 (2005)). En una modalidad específica, un anticuerpo anti-CD19 de la invención puede lograr la depleción de células B de al menos 20%, al menos 30%, al menos 40%, al menos 50%, al menos 60%, al menos 70 %, al menos 80%, al menos 90%, al menos 95%, o al menos 100% de la depleción alcanzada por el anticuerpo monoclonal HB12B. En una modalidad adicional, un anticuerpo anti-CD19 de la invención puede lograr la depleción de células B de manera más completa que la depleción alcanzada por el anticuerpo HB12B. Un anticuerpo anti-CD19 de la invención puede depletar las células B circulantes, las células B de la sangre, las células B esplénicas, las células B de la zona marginal, las células B foliculares, las células B peritoneales y/o las células de B de la médula ósea. En una modalidad, un anticuerpo anti-CD19 de la invención puede lograr la depleción de las células B progenitoras, las células pro-B tempranas, las células pro-B tardías, las células pre-B grandes, las células pre-B pequeñas, las células B inmaduras, las células B maduras, las células B estimuladas por el antígeno y/o las células plasmáticas. En una modalidad, la depleción de las células B por un anticuerpo anti-CD19 de la invención puede persistir durante al menos 1 día, al menos 2 días, al menos 3 días, al menos 4 días, al menos 5 días al menos 6 días, al menos 7 días, al menos 8 días, al menos 9 días, al menos 10 días, al menos 15 días, al menos 20 días, al menos 25 días, o al menos 30 días. En otra modalidad, la depleción de las células B por un anticuerpo anti-CD19 de la invención puede persistir durante al menos 1 semana, al menos 2, al menos 3 semanas, al menos 4 semanas, al menos 5 semana, al menos 6 semanas, al menos 7 semanas, al menos 8 semanas, al menos 9 semanas, o al menos 10 semanas. En una modalidad adicional, la depleción de las células B por un anticuerpo anti-CD19 de la invención puede persistir durante al menos 1 mes, al menos 2 meses, al menos 3 meses, al menos 4 meses, al menos 5 meses, al menos 6 meses, al menos 7 meses, al menos 8 meses, al menos 9 meses, al menos 10 meses, al menos 11 meses o al menos 12 meses.

Los anticuerpos pueden depletar las células B en un humano de manera eficiente. En una modalidad específica, un anticuerpo anti-CD19 de la invención puede alcanzar al menos aproximadamente 20%, al menos aproximadamente 30%, al menos aproximadamente 40%, al menos aproximadamente 50%, al menos aproximadamente 60%, al menos aproximadamente 70%, al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 90%, al menos aproximadamente 95%, o aproximadamente 100% de la depleción de las células B. En otra modalidad, un anticuerpo anti-CD19 de la invención puede depletar subconjuntos de células B en un sujeto humano. En una modalidad específica, un anticuerpo anti-CD19 de la invención puede depletar las células B circulante, las células B de la sangre, las células B esplénicas, las células B de la zona marginal, las células B foliculares, las células B peritoneales, y/o las células B de médula ósea. El CD19 está presente en la superficie de las células B en todas las fases de desarrollo. Un anticuerpo anti-CD19 por lo tanto, puede depletar las células B de todas las etapas de desarrollo. En una modalidad específica, un anticuerpo anti-CD19 de la invención puede lograr la depleción de las células B progenitoras, los células pro-B tempranas, las células pro-B tardías, las células pre-B grandes, las células pre-B pequeñas, las células B inmaduras, las células B maduras, las células B estimuladas por el antígeno, y/o las células plasmáticas. La depleción de las células B puede persistir durante períodos prolongados de tiempo. En una modalidad, la depleción de las células B por un anticuerpo anti-CD19 de la invención puede persistir durante al menos 1 día, al menos 2 días, al menos 3 días, al menos 4 días, al menos 5 días al menos 6 días, al menos 7 días, al menos 8 días, al menos 9 días, al menos 10 días, al menos 15 días, al menos 20 días, al menos 25 días, o al menos 30 días. En otra modalidad, la depleción de las células B por un anticuerpo anti-CD19 de la invención puede persistir durante al menos 1 semana, al menos, 2 semanas, al menos 3 semanas, al menos 4 semanas, al menos 5 semanas, al menos 6 semanas, al menos 7 semanas, al menos 8 semanas, al menos 9 semanas, o al menos 10 semanas. En una modalidad adicional, la depleción de las células B por un anticuerpo anti-CD19 de la invención puede persistir durante al menos 1 mes, al menos 2 meses, al menos 3 meses, al menos 4 meses, al menos 5 meses, al menos 6 meses, al menos 7 meses, al menos 8 meses, al menos 9 meses, al menos 10 meses, al menos 11 meses o al menos 12 meses.

Un anticuerpo anti-CD19 de la invención puede depletar al menos aproximadamente 20%, al menos aproximadamente 30%, al menos aproximadamente 40%, al menos aproximadamente 50%, al menos aproximadamente 60%, al menos aproximadamente 70%, al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 90%, al menos aproximadamente

[illegible]

o al menos 10 semanas. La depleción de las células B por un anticuerpo anti-CD19 de la invención puede persistir durante al menos 1 mes, al menos 2 meses, al menos 3 meses, al menos 4 meses, al menos 5 meses, al menos 6 meses, al menos 7 meses, al menos 8 meses, al menos 9 meses, al menos 10 meses, al menos 11 meses o al menos 12 meses.

5

Las neoplasias malignas de células B se caracterizan por la expansión patológica de subconjuntos específicos de células B, por ejemplo, la leucemia linfoblástica aguda de células B precursoras se caracteriza por una expansión anormal de las células B que corresponden a las etapas de desarrollo de las células pro-B/células pre-B. Las neoplasias malignas de células B mantienen la expresión en la superficie celular de los marcadores de las células B normales tales como el CD19. Un anticuerpo anti-CD19 por lo tanto puede depletar las células B malignas en un sujeto humano. En una modalidad específica, un anticuerpo anti-CD19 de la invención puede lograr al menos 20%, al menos 30%, al menos 40%, al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, al menos el 90%, al menos 95%, o al menos 100% de la depleción de las células B malignas en un sujeto humano.

10

15

Un anticuerpo anti-CD19 humanizado descrito en la presente puede mediar la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC), la citotoxicidad mediada por células dependiente de complemento (CDC), y/o la apoptosis. Un anticuerpo anti-CD19 humanizado de la invención puede mediar la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC) y/o la apoptosis. Un anticuerpo anti-CD19 de la invención puede tener una mayor citotoxicidad celular dependiente anticuerpo (ADCC). Un anticuerpo anti-CD19 de la invención puede comprender una variante de la región Fc que media la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC) aumentada. Un anticuerpo anti-CD19 de la invención puede comprender una región Fc que tiene complejas cadenas de azúcar ligadas a N-glucósido ligadas a la Asn297 en la cual la fucosa no está enlazada a la N-acetilglucosamina en el extremo reductor, en donde dicha región Fc media la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC) aumentada.

20

25

Los anticuerpos anti-CD19 pueden inhibir de manera eficaz la proliferación de las células B estimuladas *in vitro*. La proliferación de las células B periféricas aisladas puede inducirse por diversos estímulos, por ejemplo, pero no se limitan a la estimulación por el anticuerpo anti-IgM, CD40 o CpG. Estos estímulos pueden ser entregados solos o en conjunto unos con otros.

30

Un anticuerpo anti-CD19 de la invención puede inhibir la proliferación de las células B estimuladas *in vitro*. Un anticuerpo anti-CD19 descrito en la presente puede inhibir la proliferación de las células B *in vitro* inducida por estimulación con el anti-IgM/CpG o el anti-IgM/CD40. Un anticuerpo anti-CD19 de la invención puede inhibir la proliferación de las células B estimuladas *in vitro* por al menos aproximadamente 10%, al menos aproximadamente 20%, al menos aproximadamente 30%, al menos aproximadamente 40%, al menos aproximadamente 50% o al menos aproximadamente 75%.

35

Una variante de Fc del anticuerpo anti-CD19 de la invención puede inhibir *in vitro* la proliferación de las células B inducida por estimulación del anti-IgM/CpG o el anti-IgM/CD40, en donde dicha variante de Fc tiene alterada la afinidad de unión a uno o más ligandos de Fc en relación con una molécula no variante comparable. Una variante de Fc del anticuerpo anti-CD19 de la invención puede inhibir la proliferación *in vitro* de las células B inducida por la estimulación del anti-IgM/CpG o el anti-IgM/CD40, en donde dicha variante de Fc tiene mejorada la unión al receptor de Fc gamma IIB en relación con un dominio Fc no-variante comparable. En una modalidad específica adicional, una variante de Fc del anticuerpo anti-CD19 de la invención inhibe la proliferación de las células B estimuladas *in vitro* por al menos aproximadamente 10%, al menos aproximadamente 20%, al menos aproximadamente 30%, al menos aproximadamente 40%, al menos aproximadamente 50% o al menos aproximadamente 75%. En otra modalidad, una variante de Fc del anticuerpo anti-CD19 de la invención inhibe la proliferación de las células B estimuladas *in vitro*, en donde dicho dominio Fc variante tiene una afinidad por el receptor de Fc gamma IIB que es al menos 2 veces, o al menos 3 veces, o al menos 5 veces, o al menos 7 veces, o al menos 10 veces, o al menos 20 veces, o al menos 30 veces, o al menos 40 veces, o al menos 50 veces, o al menos 60 veces, o al menos 70 veces, o al menos 80 veces, o al menos 90 veces, o al menos 100 veces, o al menos 200 veces mayor que la de un dominio Fc no variante comparable.

40

45

50

La presente invención también puede usarse en el tratamiento de una neoplasia maligna de células B en un humano. El anticuerpo anti-CD19 humanizado puede mediar la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC), la citotoxicidad mediada por células dependiente de complemento (CDC), y/o la apoptosis humanas en una cantidad suficiente para depletar las células B circulantes. En un aspecto particular, la presente invención también puede usarse en el tratamiento de una neoplasia maligna de células B en un humano. Un régimen terapéuticamente eficaz de un anticuerpo anti-CD19 humanizado, puede ser del isotipo humano IgG1 o IgG3.

55

La presente invención puede usarse adicionalmente en el tratamiento de una enfermedad o trastorno autoinmune en un humano. Un anticuerpo anti-CD19 humanizado, puede mediar la ADCC, la CDC, y/o la apoptosis humanas en una cantidad suficiente para depletar las células B circulantes. La presente invención también se refiere al uso en el

60

tratamiento de trastornos autoinmunes. Un régimen terapéuticamente eficaz de un anticuerpo anti-CD19 humanizado, puede ser del isotipo humano IgG1 o IgG3.

La presente invención también puede usarse en el tratamiento o la prevención del rechazo humoral en un receptor de trasplante humano que lo necesite. Un anticuerpo anti-CD19 humanizado de la invención puede usarse en una cantidad que puede depletar las células B circulantes, o la inmunoglobulina circulante, o ambas. En otro uso de las modalidades de anticuerpos, la invención proporciona el uso del anticuerpo para prevenir el rechazo del injerto o la enfermedad del injerto contra el huésped en un receptor de trasplante humano que lo necesite. El tratamiento puede comprender contactar un injerto antes del trasplante con una cantidad de un anticuerpo anti-CD19 humano, humanizado, o quimérico que puede depletar las células B del injerto.

5.2. Producción de anticuerpos anti-CD19 humanizados.

Los anticuerpos humanizados que se describen en la presente pueden producirse por medio del uso de diversas técnicas conocidas en la materia, que incluye, pero no se limita a, injerto de CDR (ver, por ejemplo, la patente europea núm. EP 239,400; la publicación internacional núm. WO 91/09967, y las patentes de los Estados Unidos núms. 5,225,539, 5,530,101, y 5,585,089), recubrimiento o remodelado (ver, por ejemplo, las patentes europeas núms. EP 592,106 y EP 519,596; Padlan, 1991, *Molecular Immunology*, 28 (4/5):489-498; Studnicka y otros, 1994, *Protein Engineering*, 7(6):805-814; y Roguska y otros, 1994, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 91:969-973), intercambio de cadenas (ver, por ejemplo, la patente de los Estados Unidos núm. 5,565,332, y las técnicas descritas en, por ejemplo, la patente de los Estados Unidos núm. 6,407,213, la patente de los Estados Unidos núm. 5,766,886, la publicación internacional núm. WO 9317105, Tan y otros, *J. Immunol.*, 169:1119-25 (2002), Caldas y otros, *Protein Eng.*, 13(5):353-60 (2000), Morea y otros, *Methods*, 20(3):267-79 (2000), Baca y otros, *J. Biol. Chem.*, 272(16):10678-84 (1997), Roguska y otros, *Protein Eng.*, 9(10):895-904 (1996), Couto y otros, *Cancer Res.*, 55 (Supp 23):5973s-5977s (1995), Couto y otros, *Cancer Res.*, 55 (8):1717- 22 (1995), Sandhu JS, *Gene*, 150(2):409-10 (1994) y Pedersen y otros, *J. Mol. Biol.*, 235 (3):959-73 (1994). A menudo, residuos FW en las regiones FW se sustituirán con el residuo correspondiente del anticuerpo donante de la CDR para alterar, preferentemente mejorar, la unión al antígeno. Estas sustituciones en los FW se identifican por métodos bien conocidos en la materia, por ejemplo, por la modelación de las interacciones de las CDR y los residuos de los FW para identificar residuos de los FW importantes para la unión al antígeno y la comparación de secuencia para identificar los residuos de los FW inusuales en posiciones particulares (ver, por ejemplo, Queen y otros, la patente de los Estados Unidos núm. 5,585,089; y Riechmann y otros, 1988, *Nature*, 332: 323).

Un anticuerpo humanizado anti-CD19 tiene uno o más residuos de aminoácidos introducidos en él de una fuente no-humana. Estos residuos de aminoácidos no humanos se denominan a menudo como residuos "importados", los cuales se toman típicamente de un dominio variable "importado". Así, los anticuerpos humanizados comprenden una o más CDR de moléculas de inmunoglobulina no humanas y las regiones de marco humanas. La humanización de anticuerpos es bien conocida en la materia y esencialmente puede realizarse según el método de Winter y otros (Jones y otros, *Nature*, 321:522-525 (1986); Riechmann y otros, *Nature*, 332:323-327 (1988); Verhoeven y otros, *Science*, 239:1534-1536 (1988)), por la sustitución de las CDR del roedor o secuencias de las CDR por las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano, es decir, el injerto de CDR (EP 239,400; publicación PCT núm. WO91/09967; y las patentes de los Estados Unidos núms. 4,816,567; 6,331,415; 5,225,539; 5,530,101; 5,585,089; 6,548,640). En tales anticuerpos quiméricos humanizados, se sustituye sustancialmente menos que un dominio variable humano intacto por la secuencia correspondiente de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados son típicamente anticuerpos humanos en los que algunos residuos de las CDR y posiblemente algunos residuos de los FW se sustituyen por residuos de sitios análogos en los anticuerpos de roedores. La humanización de los anticuerpos anti-CD19 también puede lograrse por recubrimiento o remodelación (EP 592,106; EP 519,596; Padlan, 1991, *Molecular Immunology* 28(4/5):489-498; Studnicka y otros, *Protein Engineering*, 7(6):805-814 (1994); y Roguska y otros, *Proc Natl Acad. Sci.*, 91:969-973 (1994)) o el intercambio de cadenas (patente de los Estados Unidos núm. 5,565,332).

La elección de los dominios variables humanos, tanto ligeros como pesados, que se usan para hacer los anticuerpos humanizados es para reducir la antigenicidad. De acuerdo con el llamado método de "mejor ajuste", la secuencia del dominio variable de un anticuerpo de roedor se selecciona contra la genoteca entera de secuencias de dominio-variable humanas conocidas. Las secuencias humanas que están más estrechamente relacionadas con las del roedor se seleccionan por la presencia de residuos específicos que pueden ser críticos para la unión del antígeno, la formación estructural adecuada y/o la estabilidad del AcM humanizado previsto (Sims y otros, *J. Immunol.*, 151:2296 (1993); Chothia y otros, *J. Mol. Biol.*, 196:901 (1987). Las secuencias de los FW resultantes que coinciden con los criterios deseados se usan luego como las regiones de los FW humanos donantes para el anticuerpo humanizado.

Otro método usa un FW particular, derivado de la secuencia consenso de todos los anticuerpos humanos de un subgrupo particular de cadenas ligeras o pesadas. El mismo FW puede usarse para varios anticuerpos anti-CD19

humanizados diferentes (Carter y otros, Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos, 89:4285 (1992); Presta y otros, J. Immunol., 151:2623 (1993).

Los anticuerpos anti-CD19 pueden humanizarse con la retención de alta afinidad por el CD19 y otras propiedades biológicas favorable. Los anticuerpos humanizados pueden prepararse por un proceso de análisis de las secuencias parentales y diversos productos humanizados conceptuales por medio del uso de modelos tridimensionales de las secuencias parentales y humanizadas. Los modelos tridimensionales de inmunoglobulinas están comúnmente disponibles y son familiares para aquellos con experiencia en la materia. Se encuentran disponibles programas de ordenador que ilustran y muestran las estructuras tridimensionales conformacionales probables de una selección de secuencias de inmunoglobulina candidatas. La inspección de estas presentaciones permite el análisis del posible papel de los residuos en el funcionamiento de la secuencia de la inmunoglobulina candidata, es decir, el análisis de los residuos que influyen en la capacidad de la inmunoglobulina candidata para unirse al CD19. De esta manera, los residuos de las FW pueden seleccionarse y combinarse a partir de las secuencias receptoras e importadas, de modo que se logra la característica deseada del anticuerpo, por ejemplo la afinidad por el CD19. En general, los residuos de las CDR están directa y más sustancialmente involucrados en influenciar la unión al antígeno.

Un anticuerpo "humanizado" puede retener una especificidad antigénica similar a la del anticuerpo original, es decir, en la presente invención, la capacidad de unirse al antígeno CD19 humano. Sin embargo, por medio del uso de ciertos métodos de humanización, la afinidad y/o la especificidad de unión del anticuerpo humano por el antígeno CD19 humano puede alterarse por medio del uso de métodos de "evolución dirigida", como describieron Wu y otros, J. Mol. Biol., 294:151 (1999).

Los anticuerpos anti-CD19 humanizados descritos en la presente pueden construirse por la selección de distintas regiones de marco humanos para injertar las regiones determinantes de la complementariedad de HB12A o HB12B, o las "CDR" como se describe en las secciones que siguen. La invención abarca una serie de versiones humanizadas de los anticuerpos de ratón HB12A y HB12B así como las versiones quiméricas, designadas chHB12A y chHB12B.

5.3. Anticuerpos monoclonales anti-CD19

Un anticuerpo monoclonal anti-CD19 muestra especificidad de unión al antígeno CD19 humano y puede mediar la ADCC, la CDC y/o los mecanismos apoptóticos humanos. Dicho anticuerpo puede generarse por el uso de una amplia variedad de técnicas conocidas en la materia, lo que incluye el uso de las tecnologías de hibridoma, recombinante, y la presentación en fagos, o una combinación de éstas. Los anticuerpos son altamente específicos, y se dirigen contra un sitio antigénico único. Un anticuerpo anti-CD19 modificado por ingeniería puede producirse por cualquier medio conocido en la materia, que incluyen, pero no se limitan, a las técnicas descritas a continuación y mejoras a dichas técnicas. La producción a gran escala de alto rendimiento típicamente implica cultivar una célula hospedera que produce el anticuerpo anti-CD19 modificado por ingeniería y la recuperación del anticuerpo anti-CD19 del cultivo de la célula hospedera.

5.3.1. Técnica de hibridoma

Los anticuerpos monoclonales pueden producirse por medio de las técnicas de hibridoma, que incluyen aquellas conocidas en la materia y que se enseñan, por ejemplo, en Harlow y otros, Anticuerpos: Un manual de laboratorio, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2^{da} ed. 1988.); Hammerling y otros, en Monoclonal Antibodies and T Cell Hybridomas, 563-681 (Elsevier, N. Y., 1981). Por ejemplo, en el método de hibridoma, un ratón u otro animal hospedero apropiado, tal como un hámster o macaco, se inmuniza para obtener linfocitos que producen o son capaces de producir anticuerpos que se unirán específicamente a la proteína usada para la inmunización. Los linfocitos también pueden inmunizarse *in vitro*. Los linfocitos luego se fusionan con células de mieloma por medio del uso de un agente de fusión adecuado, tal como el polietilenglicol, para formar una célula de hibridoma (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pp 59-103 (Academic Press, 1986)).

Las células de hibridoma así preparadas se siembran y crecen en un medio de cultivo adecuado que contiene una o más sustancias que inhiben el crecimiento o la supervivencia de las células del mieloma parental no fusionadas. Por ejemplo, si las células del mieloma parental carecen de la enzima hipoxantina guanina fosforribosil transferasa (HGPRT o HPRT), el medio de cultivo para los hibridomas incluirá típicamente hipoxantina, aminopterina, y timidina (medio HAT), sustancias que previenen el crecimiento de las células deficientes en HGPRT.

Pueden usarse células de mieloma que se fusionan eficientemente, soportan la producción estable de altos niveles de anticuerpo por la célula productora de anticuerpo seleccionada, y son sensibles a un medio tal como el medio HAT. Entre estas líneas celulares de mieloma están las líneas de mieloma murino, tales como las derivadas de los tumores de ratón MOPC-21 y MPC-11 disponibles del Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, CA, Estados Unidos, y las células

SP-2 o X63-Ag8.653 disponibles en la Colección Americana de Cultivos Tipo, Rockville, MD, Estados Unidos También se describen líneas celulares de mielomas humanos y heteromielomas ratón-humano para la producción de anticuerpos monoclonales humanos (Kozbor, J. Immunol, 133:3001 (1984), Brodeur y otros, Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp 51-63 (Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1987)).

El medio de cultivo en el cual las células de hibridoma crecen se prueba para la producción de anticuerpos monoclonales dirigidos contra el antígeno CD19 humano. La especificidad de unión de los anticuerpos monoclonales producidos por las células del hibridoma puede determinarse por inmunoprecipitación o por un ensayo de unión *in vitro*, tal como radioinmunoensayo (RIA) o ensayo de inmunoabsorción enzimático (ELISA).

Después de que se identifican las células de hibridoma que producen anticuerpos con la especificidad, afinidad y/o actividad deseadas, los clones pueden subclonarse por procedimientos de dilución limitante y se cultivan por métodos estándar (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice., pp 59-103 (Academic Press, 1986)). Los medios de cultivo adecuados para este propósito incluyen, por ejemplo, D-MEM o medio RPMI 1640. Además, las células de hibridoma pueden cultivarse *in vivo* como tumores ascíticos en un animal.

Los anticuerpos monoclonales secretados por los subclones se separan adecuadamente del medio de cultivo, el líquido ascítico, o el suero por procedimientos convencionales de purificación de inmunoglobulinas tales como, por ejemplo, la proteína A-Sepharosa, la cromatografía de hidroxilapatita, la electroforesis en gel, la diálisis o la cromatografía de afinidad.

5.3.2. Técnicas de ADN recombinante

El ADN que codifica un anticuerpo anti-CD19 descrito en la presente se aísla y secuencia fácilmente por medio del uso de procedimientos convencionales (por ejemplo, por medio del uso de sondas de oligonucleótidos que son capaces de unirse específicamente a los genes que codifican las cadenas pesada y ligera de los anticuerpos anti-CD19). Las células de hibridoma sirven como una fuente de ese ADN. Una vez aislado, el ADN puede colocarse en vectores de expresión, que luego se transfectan en células hospederas tales como las células de *E. coli*, las células COS de simio, las células de ovario de hámster chino (CHO), o las células de mieloma que no producen otra proteína de inmunoglobulina, para obtener la síntesis de los anticuerpos anti-CD19 en las células hospederas recombinantes.

En los métodos de presentación en fagos, los dominios funcionales de los anticuerpos se presentan en la superficie de partículas de fago que portan las secuencias de los polinucleótidos que las codifican. En particular, las secuencias de ADN que codifican los dominios VH y VL se amplifican a partir de genotecas de ADNc de animales (por ejemplo, las genotecas de ADNc humano o murino de los tejidos afectados). El ADN de codificación de los dominios VH y VL se recombina junto con un enlazador scFv mediante la PCR y se clona en un vector de fagémido. El vector se electropora en *E. coli* y la *E. coli* se infecta con el fago auxiliador. El fago usado en estos métodos es típicamente un fago filamentoso que incluye fd y M13 y los dominios VH y VL usualmente se recombinan por fusión a ya sea al gen III o al gen VIII del fago. El fago que expresa un dominio de unión al antígeno que se une a un antígeno particular puede seleccionarse o identificarse con el antígeno, por ejemplo, por medio del uso del antígeno marcado o del antígeno capturado o unido a una superficie sólida o perla. Los ejemplos de los métodos de presentación en fagos que pueden usarse para hacer los anticuerpos de la presente invención incluyen los descritos en Brinkman y otros, 1995, J. Immunol. Methods, 182:41-50; Ames y otros, 1995, J. Immunol. Methods, 184:177-186; Kettleborough y otros, 1994, Eur. J. Immunol, 24:952-958; Persic y otros, 1997, Gene, 187:9-18; Burton y otros, 1994, Advances in Immunology, 57:191-280; solicitud internacional núm. PCT/GB91/O1 134; publicación internacional núms. WO 90/02809, WO 91/10737, WO 92/01047, WO 92/18619, WO 93/11236, WO 95/15982, WO 95/20401 y WO 97/13844, y las patentes de los Estados Unidos núms. 5,698,426, 5,223,409, 5,403,484, 5,580,717, 5,427,908, 5,750,753, 5,821,047, 5,571,698, 5,427,908, 5,516,637, 5,780,225, 5,658,727, 5,733,743, y 5,969,108.

Como se describe en las referencias anteriores, después de la selección de los fagos, las regiones de los fagos codificantes del anticuerpo pueden aislarse y usarse para generar anticuerpos completos, lo que incluye anticuerpos humanos, o cualquier otro fragmento deseado de unión al antígeno, y expresarse en cualquier hospedero deseado, lo que incluye las células de mamíferos, las células de insectos, las células de plantas, las levaduras y las bacterias, por ejemplo, como se describe a continuación. Las técnicas para producir recombinantemente fragmentos Fab, Fab' y F(ab')₂ pueden emplearse también por medio del uso de métodos conocidos en la materia tales como los descritos en la publicación PCT núm. WO 92/22324; Mullinax y otros, 1992, BioTechniques, 12. (6):864-869; Sawai y otros, 1995, AJRI, 34:26-34; y Better y otros, 1988, Science, 240:1041-1043.

Los anticuerpos pueden aislarse a partir de genotecas de anticuerpos en fagos que se generan por medio del uso de las técnicas descritas en McCafferty y otros, Nature, 348:552-554 (1990). Clackson y otros, Nature, 352:624-628 (1991). Marks y otros, J. Mol. Biol., 222:581-597 (1991) describen el aislamiento de anticuerpos humanos y murinos

respectivamente, por medio del uso de genotecas de fagos. El intercambio de cadenas puede usarse en la producción de anticuerpos humanos de alta afinidad (intervalo nM) (Marks y otros, Bio/Technology, 10:779-783 (1992)), así como por la infección combinatoria y recombinación *in vivo* como una estrategia para la construcción de genotecas de fagos muy grandes (Waterhouse y otros, Nuc. Acids. Res., 21:2265-2266 (1993)). Por lo tanto, estas técnicas son alternativas viables a las técnicas tradicionales de anticuerpos monoclonales de hibridomas para el aislamiento de anticuerpos anti-CD19.

Para generar los anticuerpos completos, pueden usarse cebadores de la PCR que incluyen las secuencias de nucleótidos VH o VL, un sitio de restricción, y una secuencia flanco para proteger que el sitio de restricción pueda usarse para amplificar las secuencias VH o VL en clones de scFv. Por medio del uso de las técnicas de clonación conocidas por aquellos con experiencia en la materia, los dominios VH amplificados por la PCR pueden clonarse en vectores que expresan una región constante de cadena pesada, por ejemplo, la región constante gamma humana 4, y los dominios VL amplificados por la PCR pueden clonarse en vectores que expresan una región constante de cadena ligera, por ejemplo, regiones constantes kappa o lambda humanas. Los vectores de expresión de los dominios VH o VL pueden comprender un promotor EF-1 α , una señal de secreción, un sitio de clonación para el dominio variable, los dominios constantes, y un marcador de selección, tal como la neomicina. Los dominios VH y VL también pueden clonarse en un vector que expresa las regiones constantes necesarias. Los vectores de conversión de cadena pesada y los vectores de conversión de cadena ligera se cotransfectan en las líneas celulares para generar líneas celulares estables o transitorias que expresan anticuerpos de longitud completa, por ejemplo, IgG, por medio del uso de técnicas conocidas por aquellos con experiencia en la materia.

El ADN también puede modificarse, por ejemplo, al sustituir la secuencia de codificación de los dominios constantes de las cadenas pesada y ligera humanas en lugar de las secuencias homólogas murinas (la patente de los Estados Unidos núm. 4,816,567; Morrison y otros, Proc Natl. Acad Sci Estados Unidos, 81:6851 (1984)), o por la unión covalente a la secuencia de codificación de una inmunoglobulina de toda o parte de la secuencia de codificación de un polipéptido no-inmunoglobulina.

5.4. Anticuerpos quiméricos

Los anticuerpos anti-CD19 en la presente específicamente incluyen anticuerpos quiméricos (inmunoglobulinas) en los cuales una porción de la cadena pesada y/o ligera es idéntica u homóloga a las secuencias correspondientes en los anticuerpos derivados de una especie particular o que pertenecen a una clase o subclase de anticuerpo particular, mientras que otra porción de la(s) cadena(s) es idéntica u homóloga a las secuencias correspondientes en los anticuerpos derivados de otras especies o pertenecientes a otra clase o subclase de anticuerpos, así como los fragmentos de tales anticuerpos, mientras que exhiban la actividad biológica deseada (la patente de los Estados Unidos núm. 4,816,566; Morrison y otros, Proc Natl. Acad Sci Estados Unidos, 81:6851-6855 (1984)). Los anticuerpos quiméricos de interés en la presente incluyen los anticuerpos "primatizados" que comprenden secuencias del dominio variable de unión al antígeno derivadas de un primate no humano (por ejemplo, mono del viejo mundo, tales como babuinos, monos resus o cinomolgos) y secuencias de la región constante humana (la patente de los Estados Unidos núm. 5,693,780).

5.5. Anticuerpos alterados/mutados

Los anticuerpos anti-CD19 de las composiciones y los métodos descritos en la presente pueden ser anticuerpos mutantes. Como se usa en la presente, "anticuerpo mutante" o "anticuerpo alterado" se refiere a una variante de la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo anti-CD19 en la que uno o más de los residuos de aminoácidos de un anticuerpo anti-CD19 se modifican. Las modificaciones de la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo anti-CD19 incluye modificaciones en la secuencia, que pueden mejorar la afinidad o avidéz del anticuerpo por su antígeno y/o modificaciones en la porción Fc del anticuerpo que pueden mejorar la función efectora.

Los anticuerpos pueden mostrar características de unión al CD19 humano alteradas; por ejemplo alteración de las constantes de asociación K_{on} , constante de disociación K_{off} , y/o la constante de equilibrio o afinidad de unión, K_D . En ciertas modalidades, la K_D de un anticuerpo anti-CD19 descrito en la presente, o un derivado alterado/mutante del mismo, para el CD19 humano puede ser no más que aproximadamente $10^{-6}M$, $10^{-7}M$, $10^{-8}M$, o $10^{-9}M$. Los métodos y reactivos adecuados para la determinación de tales características de unión de un anticuerpo de la presente invención, o un derivado alterado/mutante del mismo, se conocen en la materia y/o están disponibles comercialmente (ver más arriba y, por ejemplo, la patente de los Estados Unidos núm. 6,849,425, la patente de los Estados Unidos núm. 6,632,926, la patente de los Estados Unidos núm. 6,294,391, la patente de los Estados Unidos núm. 6,143,574). Además, el equipo y el software diseñado para tales análisis cinéticos están disponibles comercialmente (por ejemplo los instrumentos Biacore® A100, y Biacore® 2000; Biacore International AB, Uppsala, Suecia).

La identidad o similitud con respecto a una secuencia se define en la presente como el porcentaje de residuos de aminoácidos en la secuencia candidata que son idénticos (es decir, el mismo residuo) o similar (es decir el residuo de aminoácido del mismo grupo basado en las propiedades de las cadenas laterales comunes, ver más adelante) a residuos de anticuerpos anti-CD19, después de alinear las secuencias e introducir brechas, si es necesario, para lograr el máximo porcentaje de identidad de secuencia. Ninguna de las extensiones, deleciones o inserciones N-terminales, C-terminales, o internas, en la secuencia del anticuerpo fuera del dominio variable se interpretará como que afecta la identidad o similitud de secuencia.

El "% de identidad", como se conoce en la materia, es una medida de la relación entre dos polinucleótidos o dos polipéptidos, que se determina mediante la comparación de sus secuencias. En general, las dos secuencias que deben compararse se alinean para dar una máxima correlación entre las secuencias. La alineación de las dos secuencias se examina y el número de posiciones que da una correspondencia exacta de aminoácido o de nucleótido entre las dos secuencias determinadas, se divide por la longitud total de la alineación y se multiplica por 100 para dar una figura de % de identidad. Esta figura de % de identidad puede determinarse sobre toda la longitud de las secuencias que se comparan, lo cual es particularmente adecuado para secuencias de la misma longitud o muy similares y que son altamente homólogas, o sobre longitudes más cortas definidas, lo cual es más adecuado para las secuencias de longitud desigual o que tienen un menor nivel de homología.

Por ejemplo, las secuencias pueden alinearse con el software clustalw para Unix que genera un archivo con una extensión ".aln", este archivo puede importarse en el programa Bioedit (Hall, TA 1999, BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT Nuc. Acids. Symp. Ser. 41:95-98), el cual abre el archivo .aln. En la ventana Bioedit, pueden elegirse secuencias individuales (dos a la vez) y alinearlas. Este método permite la comparación de la secuencia entera.

Los métodos para comparar la identidad de dos o más secuencias son bien conocidos en la materia. Así, por ejemplo, los programas están disponibles en el paquete de análisis de secuencia de Wisconsin, versión 9.1 (Devereux, J. y otros, Nucleic Acids Res. 12:387-395, 1984, disponibles de Genetics Computer Group, Madison, WI, Estados Unidos). La determinación del porcentaje de identidad entre dos secuencias puede lograrse por medio del uso de un algoritmo matemático. Por ejemplo, los programas Bestfit y GAP, pueden usarse para determinar el % de identidad entre dos polinucleótidos y el % de identidad entre dos secuencias de polipéptidos. Bestfit usa el algoritmo de "homología local" de Smith y Waterman (Advances in Applied Mathematics, 2:482-489, 1981) y encuentra la mejor región simple de similitud entre dos secuencias. El Bestfit es más adecuado para comparar dos polinucleótidos o dos secuencias de polipéptidos que son diferentes en longitud, y el programa asume que la secuencia más corta representa una porción de la más larga. En comparación, el GAP alinea dos secuencias en la búsqueda de una "máxima similitud" de acuerdo con el algoritmo de Needleman y Wunsch (J. Mol. Biol., 48:443-354, 1970). El GAP es más adecuado para comparar las secuencias que son aproximadamente de la misma longitud y se espera una alineación en toda la longitud. Preferentemente los parámetros "peso brecha" y "peso de longitud" que se usan en cada programa son 50 y 3 para polinucleótidos y 12 y 4 para polipéptidos, respectivamente. Preferentemente, los % de identidades y de similitudes se determinan cuando las dos secuencias que se comparan se alinean de forma óptima.

Otros programas para la determinación de la identidad y/o la similitud entre las secuencias son también conocidos en la materia, por ejemplo, la familia de programas Blast (Karlin y Altschul, 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos, 87:2264-2268, modificado como en Karlin y Altschul, 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos, 90: 5873-5877, disponible en el National Center for Biotechnology Information (NCBI), Bethesda, MD, Estados Unidos y accesible a través de la página principal del NCBI en www.ncbi.nlm.nih.gov). Estos programas son ejemplos no limitantes de un algoritmo matemático que se usa para la comparación de dos secuencias. Este algoritmo se incorpora en los programas Nblast y Xblast de Altschul y otros, 1990, J. Mol. Biol., 215:403-410. Las búsquedas Blast de nucleótidos pueden realizarse con el programa Nblast, puntuación = 100, longitud de palabra = 12 para obtener las secuencias de nucleótidos homólogas a una molécula de ácido nucleico de codificación de la totalidad o una porción de un anticuerpo anti-CD19 de la invención. Las búsquedas Blast de proteína pueden realizarse con el programa Xblast, puntuación = 50, longitud de palabra = 3 para obtener las secuencias de aminoácidos homólogas a una molécula de proteína de la invención. Para obtener alineaciones con brechas para propósitos de comparación, el Gapped Blast puede usarse como se describe en Altschul y otros, 1997, Nucleic Acids Res., 25:3389-3402. El PSI-Blast también puede usarse para desarrollar una búsqueda reiterada la cual detecta relaciones distantes entre moléculas (*Id.*). Cuando se usan los programas Blast, Gapped Blast, y PSI-Blast, pueden usarse los parámetros predeterminados de los respectivos programas (por ejemplo, Xblast y Nblast). Ver, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.

Otro ejemplo no limitante de un programa para determinar la identidad y/o similitud entre las secuencias conocidas en la materia es Fasta (Pearson W.R. y Lipman D.J., Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos, 85:2444-2448, 1988, disponible como parte del Paquete de Análisis de Secuencia de Wisconsin). Preferentemente, la matriz de sustitución de aminoácido Blosom62 (Henikoff S. y Henikoff J.G., Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos, 89:10915-10919, 1992) se usa

en comparaciones de secuencias de polipéptidos que incluyen cuando las secuencias de nucleótidos son primero traducidas a secuencias de aminoácidos antes de la comparación.

Otro ejemplo no limitante de un programa conocido en la materia para determinar la identidad y/o similitud entre las secuencias de aminoácidos es el software SeqWeb (una interfase basada en la red para el paquete GCG de Wisconsin: programa GAP), el cual se usa con el algoritmo y los ajustes de los parámetros predeterminados del programa: Blosum62, el peso de brecha 8, el peso de longitud 2.

El porcentaje de identidad entre dos secuencias puede determinarse por medio del uso de técnicas similares a las descritas anteriormente, que permiten o no brechas. En el cálculo de porcentaje de identidad, por lo general se cuentan las coincidencias exactas.

Preferentemente, el programa Bestfit se usa para determinar el % de identidad de una secuencia de un polinucleótido o de un polipéptido de consulta con respecto a una secuencia de polinucleótido o de polipéptido de la presente invención, la consulta y la secuencia de referencia se alinean de forma óptima y los parámetros del programa se fijan en el valor predeterminado.

Para generar un anticuerpo alterado, se introducen una o más alteraciones de aminoácidos (por ejemplo, sustituciones) en una o más de las regiones hipervariables del anticuerpo dependiente de las especies. También pueden introducirse una o más alteraciones (por ejemplo, sustituciones) de residuos de la región de marco en un anticuerpo anti-CD19 cuando éstas dan como resultado una mejora en la afinidad de unión del anticuerpo mutante por el antígeno de la segunda especie de mamífero. Los ejemplos de los residuos de la región de marco para modificar incluyen aquellos que se unen directamente de forma no covalente al antígeno (Amit y otros, Science, 233:747-753 (1986).); interactúan/afectan la conformación de una CDR (Chothia y otros, J.Mol. Biol., 196:901-917 (1987)); y/o participan en la interfase VL-VH (EP 239 400B1). La modificación de uno o más de tales residuos de la región de marco puede resultar en una mejor afinidad de unión del anticuerpo por el antígeno de la segunda especie de mamífero. Por ejemplo, desde aproximadamente uno a aproximadamente cinco residuos del marco pueden modificarse en esta modalidad de la invención. A veces, esto puede ser suficiente para producir un anticuerpo mutante adecuado para su uso en ensayos preclínicos, incluso cuando ninguno de los residuos de la región hipervariable se modifica. Normalmente, sin embargo, un anticuerpo alterado comprenderá alteración(es) adicional(es) en la región hipervariable.

Los residuos de la región hipervariable que están alterados pueden cambiarse aleatoriamente, especialmente cuando la afinidad inicial de unión de un anticuerpo anti-CD19 por el antígeno de la segunda especie de mamífero es tal que esos anticuerpos alterados producidos al azar pueden seleccionarse fácilmente.

Un procedimiento útil para generar tal anticuerpo alterado se llama "mutagénesis por barrido de alanina" (Cunningham y Wells, Science, 244:1081-1085 (1989)). Aquí, uno o más de los residuos de la(s) región(es) hipervariable(s) se sustituyen por un residuo de alanina o polialanina(s) para afectar la interacción de los aminoácidos con el antígeno de la segunda especie de mamífero. Aquellos residuos de la región hipervariable(s) que comprenden sensibilidad funcional a las sustituciones luego se refinan mediante la introducción de mutaciones adicionales u otras mutaciones en o para los sitios de sustitución. Así, mientras que el sitio para introducir una variación de secuencia de aminoácidos está predeterminado, la naturaleza de la mutación *per se* no necesita estar predeterminada. Los mutantes Ala que se producen de esta manera se seleccionan por su actividad biológica como se describe en la presente.

Otro procedimiento para generar ese anticuerpo alterado implica la maduración de afinidad por medio del uso de la expresión en fagos (Hawkins y otros, J.Mol. Biol., 254:889-896 (1992) y Lowman y otros, Biochemistry, 30 (45):10832-10837 (1991)). Brevemente, varios sitios de la región hipervariable (por ejemplo, 6-7 sitios) se mutan para generar todas las posibles sustituciones de aminoácidos en cada sitio. Los mutantes de anticuerpos así generados se presentan de forma monovalente en las partículas de fagos filamentosos como fusiones con el producto del gen III del M13 empaquetado dentro de cada partícula. Los mutantes presentados en los fagos se seleccionan por su actividad biológica (por ejemplo, la afinidad de unión) como se describe en la presente.

Las mutaciones en las secuencias de anticuerpos pueden incluir sustituciones, delecciones, que incluye delecciones internas, adiciones, que incluye adiciones que producen proteínas de fusión, o sustituciones conservadoras de residuos de aminoácidos dentro de y/o adyacentes a la secuencia de aminoácidos, pero que resultan en un cambio "silente", ya que el cambio produce un anticuerpo anti-CD19 funcionalmente equivalente. Pueden hacerse sustituciones conservadoras de aminoácidos sobre la base de la similitud en la polaridad, la carga, la solubilidad, la hidrofobicidad, la hidrofiliidad, y/o la naturaleza anfipática de los residuos implicados. Por ejemplo, los aminoácidos no polares (hidrófobos) incluyen alanina, leucina, isoleucina, valina, prolina, fenilalanina, triptófano y metionina; los aminoácidos polares neutros incluyen glicina, serina, treonina, cisteína, tirosina, asparagina y glutamina; los aminoácidos positivamente cargados (básico) incluyen arginina, lisina, histidina y, los aminoácidos cargados negativamente (ácidos)

incluyen ácido aspártico y ácido glutámico. Además, la glicina y la prolina son los residuos que pueden influir en la orientación de la cadena. Las sustituciones no conservativas implicarán el intercambio de un miembro de una de estas clases por un miembro de otra clase. Además, si se desea, pueden introducirse aminoácidos no clásicos o análogos químicos de aminoácidos como una sustitución o adición en la secuencia del anticuerpo. Los aminoácidos no clásicos incluyen, pero no se limitan a, los isómeros D de los aminoácidos comunes, ácido α -amino isobutírico, ácido 4-aminobutírico, Abu, ácido 2-amino butírico, γ -Abu, ϵ -Ahx, ácido 6-amino hexanoico, Aib, ácido 2-amino isobutírico, ácido 3-amino propiónico, ornitina, norleucina, norvalina, hidroxiprolina, sarcosina, citrulina, ácido cisteico, t-butilglicina, t-butilalanina, fenilglicina, ciclohexilalanina, β -alanina, fluoro-amino ácidos, amino ácidos de diseño tales como β -metil aminoácidos, $C\alpha$ -metil aminoácidos, N-metil α aminoácidos, y los análogos de amino ácidos en general.

Puede madurarse la afinidad de los sitios seleccionados para la modificación mediante la expresión en fagos (ver más arriba).

Cualquier técnica para mutagénesis conocida en la materia puede usarse para modificar los nucleótidos individuales en una secuencia de ADN, con el propósito de hacer sustitución de aminoácido(s) en la secuencia del anticuerpo, o para crear/eliminar sitios de restricción para facilitar las manipulaciones posteriores. Tales técnicas incluyen, pero no se limitan a, mutagénesis química, mutagénesis dirigida in vitro (Kunkel, Proc Natl. Acad Sci Estados Unidos, 82:488 (1985); Hutchinson, C. y otros, J. Biol. Chem., 253: 6551 (1978)), mutagénesis dirigida a oligonucleótidos (Smith, Ann Rev. Genet., 19:423-463 (1985.); Hill y otros, Methods Enzymol., 155:558-568 (1987)), extensión por solapamiento basada en la PCR (Ho y otros, Gene, 77:51-59 (1989)), mutagénesis con megacebador basada en la PCR (Sarkar y otros, Biotechniques, 8:404-407 (1990)), etc. Las modificaciones pueden confirmarse por secuenciación de dideoxi- ADN de doble cadena.

Un anticuerpo anti-CD19 puede modificarse para producir proteínas de fusión, es decir, el anticuerpo, o un fragmento del mismo, se fusiona a una proteína heteróloga, polipéptido o péptido. En ciertas modalidades, la proteína fusionada a la porción de un anticuerpo anti-CD19 es un componente enzimático de la terapia enzimática con pro-fármaco dirigida por anticuerpo (ADEPT). Los ejemplos de otras proteínas o polipéptidos que pueden modificarse por ingeniería como una proteína de fusión con un anticuerpo anti-CD19 incluyen, pero no se limitan a las toxinas tales como la ricina, la abrina, la ribonucleasa, la DNasa I, la enterotoxina-A de estafilococos, la proteína anti-viral de la hierba carmín, la gelonina, la toxina diftérica, la exotoxina de *Pseudomonas*, y la endotoxina de *Pseudomonas*. Ver, por ejemplo, Pastan y otros, Cell, 47:641 (1986), y Goldenberg y otros, Cancer Journal for Clinicians, 44:43 (1994). Las toxinas enzimáticamente activas y los fragmentos de éstas que pueden usarse incluyen la cadena A de la difteria, los fragmentos activos sin unión de la toxina diftérica, la cadena A de la exotoxina (de *Pseudomonas aeruginosa*), la cadena A de la ricina, la cadena A de la abrina, la cadena A de la modicina, la alfa-sarcina, las proteínas de *Aleurites fordii*, las proteínas de la diantina, las proteínas de la *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII, y PAP-S), el inhibidor de la *Momordica charantia*, la curcina, el crotino, el inhibidor de la *Sapaonaria officinalis*, la gelonina, la mitogelina, la restrictocina, la fenomicina, la enomicina y los tricotecenos. Ver, por ejemplo, el documento WO 93/21232 publicado en el 28 de octubre de 1993.

Pueden generarse proteínas de fusión adicionales mediante las técnicas de intercambio de genes, intercambio de motivos, intercambio de exones y/o intercambio de codones (referidos colectivamente como "intercambio de ADN"). El intercambio de ADN puede emplearse para alterar las actividades del anticuerpo anti CD19 o los fragmentos de éste (por ejemplo, un anticuerpo o un fragmento de éste con mayor afinidad y menor tasa de disociación). Ver, en general, las patentes de los Estados Unidos núms. 5,605,793, 5,811,238, 5,830,721, 5,834,252 y 5,837,458, y Patten y otros, 1997, Curr. Opinion Biotechnol., 8:724-33; Harayama, 1998, Trends Biotechnol. 16 (2): 76-82; Hansson y otros, 1999, J. Mol. Biol., 287:265-76; y Lorenzo y Blasco, 1998, Biotechniques 24 (2): 308 - 313 (cada una de estas patentes y publicaciones se incorporan en la presente como referencia en su totalidad). El anticuerpo puede además ser una proteína de fusión de dominio de unión de inmunoglobulina como se describe en la publicación de los Estados Unidos 20030118592, la publicación de los Estados Unidos 200330133939, y la publicación PCT WO 02/056910, todo de Ledbetter y otros.

5.6. Anticuerpos de dominio

Los anticuerpos anti-CD19 pueden ser anticuerpos de dominio, por ejemplo, anticuerpos que contienen las pequeñas unidades funcionales de unión de los anticuerpos, que corresponden a las regiones variables de las cadenas pesadas (VH) o ligeras (VL) de los anticuerpos humanos. Los ejemplos de anticuerpos de dominio incluyen, pero no se limitan a, los disponibles de Domantis Limited (Cambridge, Reino Unido) y Domantis Inc. (Cambridge, MA, Estados Unidos) que son específicos para objetivos terapéuticos (ver, por ejemplo, WO04/058821; WO04/003019, las patentes de los Estados Unidos núms. 6,291,158, 6,582,915, 6,696,245 y 6,593,081). Las genotecas comercialmente disponibles de dominios de anticuerpos pueden usarse para identificar los dominios de los anticuerpos anti-CD19. En ciertas modalidades, los anticuerpos anti-CD19 comprenden una unidad funcional de unión al CD19 y una unidad funcional de unión al receptor de Fc gamma.

5.7. Diacuerpos

Los anticuerpos anti-CD19 pueden ser "diacuerpos". El término "diacuerpos" se refiere a pequeños fragmentos de anticuerpos con dos sitios de unión al antígeno, dichos fragmentos comprenden un dominio variable de cadena pesada (VH) conectado a un dominio variable de cadena ligera (VL) en la misma cadena polipeptídica (VH-VL). Por medio del uso de un enlazador que es demasiado corto para permitir el acoplamiento entre los dos dominios en la misma cadena, los dominios se fuerzan a acoplarse con los dominios complementarios de otra cadena y crear dos sitios de unión al antígeno. Los diacuerpos se describen más detalladamente en, por ejemplo, EP 404.097, WO 93/11161; y. Hollinger y otros, Proc Natl. Acad Sci Estados Unidos, 90:6444-6448 (1993).

5.8. Vaccicuerpos

En ciertas modalidades de la invención, los anticuerpos anti-CD19 son vaccicuerpos. Los vaccicuerpos son polipéptidos diméricos. Cada monómero de un vaccicuerpo consiste de un scFv con especificidad para una molécula de superficie sobre una APC conectado a través de una región bisagra y un dominio Cy3 a un segundo scFv. En otras modalidades de la invención, los vaccicuerpos que contienen como uno de los scFv un fragmento de anticuerpo anti-CD19 pueden usarse para yuxtaponer aquellas células B que serán destruidas y una célula efectora que media la ADCC. Por ejemplo, ver, Bogen y otros, publicación de la solicitud de patente de los Estados Unidos núm. 20040253238.

5.9. Anticuerpos lineales

Los anticuerpos anti-CD19 pueden ser anticuerpos lineales. Los anticuerpos lineales comprenden un par de segmentos Fd en tándem ($V_H-C_{H1}-V_H-C_{H1}$) los cuales forman un par de regiones de unión al antígeno. Los anticuerpos lineales pueden ser biespecífico o monoespecífico. Ver, Zapata y otros, Protein Eng., 8 (10):1057-1062 (1995).

5.10. Anticuerpo parental

El anticuerpo anti-CD19 puede ser un anticuerpo parental. Un "anticuerpo parental" es un anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos que puede carecer, o puede ser deficiente en uno o más residuos de aminoácidos en o adyacente a una o más regiones hipervariables del mismo en comparación con un anticuerpo alterado/mutante tal como se describe en la presente. Así, el anticuerpo primario puede tener una región hipervariable más corta que la región correspondiente hipervariable de un anticuerpo mutante tal como se describe en la presente. El polipéptido parental puede comprender una secuencia de anticuerpo original (es decir, una forma natural, que incluye una variante alélica natural) o una secuencia del anticuerpo con modificaciones pre-existentes de secuencias de aminoácidos (tales como otras inserciones, supresiones y/o sustituciones) de una secuencia que ocurre naturalmente.

5.11. Fragmentos de anticuerpos

Los "fragmentos de anticuerpo" comprenden una porción de un anticuerpo de longitud completa, generalmente la región de unión al antígeno o región variable de éste. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen los Fab, los Fab', los $F(ab')_2$, y los fragmentos Fv; los diacuerpos; los anticuerpos lineales; las moléculas de anticuerpo de cadena sencilla; y los anticuerpos multispecíficos que se forman a partir de los fragmentos de anticuerpos.

Tradicionalmente, estos fragmentos se obtuvieron a través de la digestión proteolítica de anticuerpos intactos (ver, por ejemplo, Morimoto y otros, Journal of Biochemical and Biophysical Methods, 24:107-117 (1992) y Brennan y otros, Science, 229:81 (1985)). Sin embargo, estos fragmentos pueden producirse ahora directamente por células hospederas recombinantes. Por ejemplo, los fragmentos de anticuerpo pueden aislarse a partir de las genotecas de anticuerpos en fagos que se discutieron anteriormente. Los fragmentos Fab'-SH también pueden recuperarse directamente a partir de *E. coli* y acoplarse químicamente para formar los fragmentos $F(ab')_2$ (Carter y otros, Bio/Technology, 10:163-167 (1992)). Según otro enfoque, los fragmentos $F(ab')_2$ pueden aislarse directamente del cultivo de la célula hospedera recombinante. Otras técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpos serán evidentes para aquellos con experiencia. En otras modalidades, el anticuerpo de elección es un fragmento Fv de simple cadena (scFv). Ver, por ejemplo, WO 93/16185. En ciertas modalidades, el anticuerpo no es un fragmento Fab.

5.12. Anticuerpos biespecíficos

Los anticuerpos biespecíficos son anticuerpos que tienen especificidades de unión por al menos dos epítomos diferentes. Los anticuerpos biespecíficos ejemplares pueden unirse a dos epítomos diferentes del marcador de superficie de célula B. Otros anticuerpos de este tipo pueden unirse a un primer marcador de células B y adicionalmente unirse a un segundo marcador de superficie de célula B. Un brazo de unión al marcador de células B también puede combinarse con un brazo que se une a una molécula de activación en un leucocito tal como una molécula receptora de células T (por

ejemplo, CD2 o CD3), o los receptores Fc para la IgG (Fc γ R), así como para enfocar los mecanismos de defensa celular a la célula B. Los anticuerpos biespecíficos también pueden usarse para localizar agentes citotóxicos hacia las células B. Estos anticuerpos poseen un brazo de unión al marcador de las células B y un brazo que une el agente citotóxico (por ejemplo, la saporina, el anti-interferón- α , los alcaloides de la vinca, la cadena A de la ricina, la metola-exato o el hapteno de isótopo radiactivo). Los anticuerpos biespecíficos pueden prepararse como anticuerpos completos o fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, F(ab')₂: anticuerpos biespecíficos).

Los métodos para preparar los anticuerpos biespecíficos se conocen en la materia. (ver, por ejemplo, Millstein y otros, Nature, 305:537-539 (1983); Traunecker y otros, EMBO J., 10:3655-3659 (1991); Suresh y otros, Methods in Enzymology, 121: 210 (1986); Kostelny y otros, J. Immunol, 148 (5):1547-1553 (1992); Hollinger y otros, Proc Natl. Acad Sci Estados Unidos, 90:6444-6448 (1993); Gruber y otros, J. Immunol, 152:5368 (1994); las de patentes de los Estados Unidos núms. 4,474,893; 4,714,681; 4,925,648; 5,573,920; 5,601,819; 5,731,168; 4,676,980; y 4,676,980, WO 94/04690, WO 91/00360, WO 92/200373, WO 93/17715, WO 92/08802, y EP 03089).

Cuando un anticuerpo anti-CD19 de las composiciones y los métodos de la invención es biespecífico, el anticuerpo anti-CD19 puede ser humano o humanizado y puede tener especificidad por el CD19 humano y un epítipo sobre una célula T o puede ser capaz de unirse a una célula humana efectora tal como, por ejemplo, un monocito/macrófago y/o una célula asesina natural para efectuar la muerte celular.

Un anticuerpo anti-CD19 de la invención puede ser un anticuerpo biespecífico capaz de unirse específicamente a un primer y un segundo antígeno, en el que dicho primer antígeno es el CD19 humano y dicho segundo antígeno es un receptor de Fc gamma seleccionado del grupo que consiste de Fc γ RI, Fc γ RIIA, Fc γ RIIB, Fc γ RIIIA y/o Fc γ RIV. Un anticuerpo anti-CD19 de la invención puede ser un anticuerpo biespecífico capaz de unirse específicamente al CD19 humano y al Fc γ RIIB. Un anticuerpo anti-CD19 de la invención puede ser un anticuerpo biespecífico capaz de unirse específicamente al CD19 humano y al Fc γ RIIB humano.

5.13. Regiones variantes de Fc

La presente invención proporciona la formulación de las proteínas que comprenden una región variante de Fc. Es decir, una región Fc que no ocurre naturalmente, por ejemplo una región Fc que comprende uno o más residuos de aminoácidos que no ocurren naturalmente. También se incluyen en las variantes de regiones Fc de la presente invención las regiones Fc que comprenden delecciones de aminoácidos, adiciones y/o modificaciones.

Se entenderá que la región Fc como se usa en la presente incluye los polipéptidos que comprenden la región constante de un anticuerpo con exclusión del primer dominio de la región constante de la inmunoglobulina. Así Fc se refiere a los dos últimos dominios de la región constante de inmunoglobulina de IgA, IgD e IgG, y los últimos tres dominios de la región constante de inmunoglobulina de IgE e IgM, y la bisagra flexible N-terminal de estos dominios. Para la IgA e IgM el Fc puede incluir la cadena J. Para la IgG, el Fc comprende los dominios de inmunoglobulina C γ 2 y C γ 3 y la bisagra entre C γ 1 y C γ 2. Aunque los límites de la región Fc pueden variar, la región Fc de la cadena pesada de IgG humana se define generalmente que comprende los residuos C226 o P230 en su carboxilo-terminal, en donde la numeración está de acuerdo con el índice EU como en Kabat y otros, (1991, NIH Publication 91-3242, National Technical Information Service, Springfield, VA). El "índice de EU como se establece en Kabat" se refiere a la numeración del residuo del anticuerpo humano IgG 1 EU como se describe en Kabat y otros *supra*. Fc puede referirse a esta región en aislamiento, o a esta región en el contexto de un anticuerpo, fragmento de anticuerpo, o proteína de fusión Fc. Una proteína variante de Fc puede ser un anticuerpo, la fusión de Fc, o cualquier dominio de la proteína o proteínas que comprendan una región Fc que incluye, pero no se limitan a, proteínas que comprenden regiones variante de Fc, las cuales no son variantes de un Fc que ocurre naturalmente. Nota: Los polimorfismos se observaron en un número de posiciones de Fc, que incluyen pero no se limitan a Kabat 270, 272, 312, 315, 356, y 358, y por lo tanto pueden existir diferencias leves entre la secuencia presentada y las secuencias anteriores en la materia.

La presente invención abarca proteínas variantes de Fc que tienen propiedades de unión alteradas para un ligando de Fc (por ejemplo, un receptor de Fc, C1q) relativas a una molécula similar (por ejemplo, una proteína que tiene la misma secuencia de aminoácidos, excepto que tiene un tipo de región Fc salvaje). Los ejemplos de propiedades de unión incluyen pero no se limitan a, la especificidad de unión, la constante de equilibrio de disociación (K_D), las tasas de disociación y de asociación (k_{off} y k_{on} respectivamente), la afinidad y/o aidez de la unión. En general se entiende que una molécula de unión (por ejemplo, una proteína variante de Fc tal como un anticuerpo) con una baja K_D puede ser preferible a una molécula de unión con una alta K_D . Sin embargo, en algunos casos el valor de k_{on} o k_{off} puede ser más relevante que el valor de la K_D . Alguien con experiencia en la materia puede determinar qué parámetro cinético es más importante para una aplicación dada del anticuerpo.

Las afinidades y las propiedades de unión de un dominio Fc para su ligando pueden determinarse por una variedad de métodos de ensayo *in vitro* (ensayos bioquímicos o inmunológicos) conocidos en la materia para la determinación de las interacciones Fc-Fc γ R, es decir, la unión específica de una región Fc a un Fc γ R que incluye pero no se limita a, los métodos de equilibrio (por ejemplo, el ensayo de inmunoabsorción enzimático (ELISA), o el radioinmunoensayo (RIA)), o cinéticos (por ejemplo, análisis BIACOR[®]), y otros métodos tales como los ensayos de unión indirectos, los ensayos de inhibición competitiva, la transferencia de energía de resonancia fluorescente (FRET), la electroforesis en gel y la cromatografía (por ejemplo, la filtración en gel). Estos y otros métodos pueden usar un marcador en uno o más de los componentes que se examinan y/o emplear una variedad de métodos de detección que incluyen pero no se limitan a los cromogénicos, los marcadores fluorescentes, los luminiscentes, o los marcadores isotópicos. Una descripción detallada de las afinidades y la cinética de unión puede encontrarse en Paul W.E., ed., *Fundamental Immunology*, 4^{ta} Ed., Lippincott-Raven, Filadelfia (1999), que se centra en las interacciones anticuerpo-inmunógeno.

La proteína variante de Fc puede tener una mayor unión a uno o más ligandos Fc en relación con una molécula comparable. La proteína variante de Fc puede tener una afinidad por un ligando Fc que es al menos 2 veces, o al menos 3 veces, o al menos 5 veces, o al menos 7 veces, o al menos 10 veces, o al menos 20 veces, o al menos 30 veces, o al menos 40 veces, o al menos 50 veces, o al menos 60 veces, o al menos 70 veces, o al menos 80 veces, o al menos 90 veces, o al menos 100 veces, o al menos 200 veces mayor que la de una molécula comparable. La proteína variante de Fc puede tener una mayor unión a un receptor de Fc. La proteína variante de Fc puede tener una mayor unión a los receptores de Fc, Fc γ RIIA. La proteína variante de Fc puede tener una mayor unión a los receptores de Fc, Fc γ RIIB. La proteína variante de Fc puede tener una mayor unión a los receptores de Fc, FcRn. La proteína variante de Fc puede tener una mayor unión a C1q en relación con una molécula similar.

Un anticuerpo anti-CD19 de la invención puede comprender un dominio variante de Fc en el que dicho dominio variante de Fc tiene una mayor afinidad de unión al receptor de Fc gamma IIB en relación a un dominio Fc no variante comparable. Un anticuerpo anti-CD19 de la invención puede comprender un dominio variante de Fc en el que dicho dominio variante de Fc tiene una afinidad por el receptor de Fc gamma IIB que es al menos 2 veces, o al menos 3 veces, o al menos 5 veces, o al menos 7 veces, o al menos 10 veces, o al menos 20 veces, o al menos 30 veces, o al menos 40 veces, o al menos 50 veces, o al menos 60 veces, o al menos 70 veces, o al menos 80 veces, o al menos 90 veces, o al menos 100 veces, o al menos 200 veces mayor que la de un dominio Fc no variante comparable.

La vida media en suero de las proteínas que comprenden regiones Fc puede aumentarse mediante el aumento de la afinidad de unión de la región Fc para el FcRn. La proteína variante de Fc puede tener una mayor vida media en el suero en relación con una molécula comparable.

La "citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo" o "ADCC" se refiere a una forma de citotoxicidad en la que las Ig secretadas unidas a los receptores Fc (FcR) presentes en ciertas células citotóxicas (por ejemplo, asesinas naturales (células NK), neutrófilos y macrófagos) permite a estas células efectoras citotóxicas unirse específicamente a una célula diana portadora de antígeno y posteriormente matar la célula diana con citotoxinas. Los anticuerpos IgG específicos de alta afinidad dirigidos a la superficie de las células diana "arman" a las células citotóxicas y son absolutamente necesarios para tal muerte. La lisis de la célula diana es extracelular, requiere contacto directo célula-célula, y no implica al complemento. Se contempla que, además de los anticuerpos, otras proteínas que comprenden regiones Fc, específicamente las proteínas de fusión de Fc, que tienen la capacidad de unirse específicamente a una célula diana que porta el antígeno será capaz de efectuar la citotoxicidad mediada por células. Por simplicidad, la citotoxicidad mediada por células resultante de la actividad de una proteína de fusión Fc también se refiere en la presente como actividad ADCC.

La capacidad de cualquier proteína variante de Fc particular para mediar la lisis de la célula diana por ADCC puede probarse. Para ensayar la actividad ADCC una proteína variante de Fc de interés se añade a las células diana en combinación con células efectoras inmunes, que pueden activarse por los complejos antígeno-anticuerpo lo que resulta en la citolisis de la célula diana. La citolisis generalmente se detecta por la liberación de uno de los marcadores (por ejemplo, los sustratos radiactivos, los colorantes fluorescentes o las proteínas naturales intracelulares) de las células muertas. Las células efectoras útiles para tales ensayos incluyen las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y las células asesinas naturales (NK). Los ejemplos específicos de los ensayos ADCC *in vitro* se describen en Wisecarver y otros, 1985 79:277-282; Bruggemann y otros, 1987, J. Exp. Med. 166:1351-1361; Wilkinson y otros, 2001, J. Immunol. Methods 25:183-191; Patel y otros, 1995 J Immunol. Methods 184:29-38. La actividad ADCC de la proteína variante de Fc de interés también puede evaluarse *in vivo*, por ejemplo, en un modelo animal tal como el descrito en Clynes y otros, 1998, Proc Natl. Acad Sci Estados Unidos 95:652-656.

Una proteína variante de Fc puede tener una mejor actividad ADCC en relación con una molécula comparable. Una proteína variante de Fc puede tener actividad ADCC que es al menos 2 veces, o al menos 3 veces, o al menos 5 veces o al menos 10 veces o al menos 50 veces o al menos 100 veces mayor que la de una molécula similar. Una proteína

variante de Fc puede tener una mejor unión al receptor de Fc, Fc γ RIIIA y tener una mejor actividad ADCC en relación con una molécula comparable. La proteína variante de Fc puede tener tanto una mayor actividad ADCC como una mayor vida media en suero con respecto a una molécula comparable.

Una proteína variante de Fc puede tener una actividad ADCC reducida con respecto a una molécula comparable. Una proteína variante de Fc puede tener una actividad ADCC que es al menos 2 veces, o al menos 3 veces, o al menos 5 veces o al menos 10 veces o al menos 50 veces o al menos 100 veces menor que la de una molécula comparable. Una proteína variante de Fc puede tener una unión al receptor de Fc, Fc γ RIIIA reducida y una actividad ADCC reducida con respecto a una molécula similar. La proteína variante de Fc puede tener tanto una actividad ADCC reducida como una vida media en el suero mejorada con respecto a una molécula similar.

La "citotoxicidad dependiente del complemento" y la "CDC" se refieren a la lisis de una célula diana en presencia del complemento. La vía de activación del complemento se inicia por la unión del primer componente del sistema de complemento (C1q) a una molécula, un anticuerpo por ejemplo, que forma un complejo con un antígeno cognado. Para evaluar la activación del complemento, puede realizarse un ensayo de CDC, por ejemplo como se describe en Gazzano-Santoro y otros, 1996, J. Immunol. Methods, 202:163. En una modalidad, una proteína variante de Fc tiene una mejor actividad CDC en relación con una molécula comparable. En una modalidad específica, una proteína variante de Fc tiene una actividad CDC que es al menos 2 veces, o al menos 3 veces, o al menos 5 veces o al menos 10 veces o al menos 50 veces o al menos 100 veces mayor que la de una molécula comparable. La proteína variante de Fc puede tener tanto una mayor actividad CDC como una mayor vida media en el suero con respecto a una molécula comparable.

La proteína variante de Fc puede tener una unión reducida a uno o más ligandos Fc en relación con una molécula similar. La proteína variante de Fc puede tener el ligando con relación a una molécula comparable. La proteína variante de Fc puede tener una afinidad por un ligando de Fc que es al menos 2 veces, o al menos 3 veces, o al menos 5 veces, o al menos 7 veces, o al menos un 10 veces, o al menos 20 veces, o al menos 30 veces, o al menos 40 veces, o al menos 50 veces, o al menos 60 veces, o al menos 70 veces, o al menos 80 veces, o al menos 90 veces, o al menos 100 veces, o al menos 200 veces menor que la de una molécula comparable. La proteína variante de Fc puede tener la unión a un receptor de Fc reducida. La proteína variante de Fc puede tener una unión al receptor de Fc, Fc γ RIIIA reducida. Una variante de Fc descrita en la presente puede tener una afinidad por el receptor de Fc, Fc γ RIIIA que es al menos aproximadamente 5 veces menor que la de una molécula comparable, en el que dicha variante de Fc tiene una afinidad por el receptor de Fc, Fc γ RIIB que está dentro de aproximadamente 2 veces la de una molécula comparable. La proteína variante de Fc puede tener una unión al receptor de Fc, FcRn reducida. La proteína variante de Fc puede tener una unión a C1q reducida con respecto a una molécula comparable.

Pueden ofrecerse variantes de Fc en las que la región Fc comprende un residuo de aminoácido que no ocurre naturalmente en una o más posiciones seleccionadas del grupo que consiste de 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 241, 243, 244, 245, 247, 251, 252, 254, 255, 256, 262, 263, 264, 265, 266, 267, 268, 269, 279, 280, 284, 292, 296, 297, 298, 299, 305, 313, 316, 325, 326, 327, 328, 329, 330, 331, 332, 333, 334, 339, 341, 343, 370, 373, 378, 392, 416, 419, 421, 440 y 443 como se enumeran por el índice EU como se establece en Kabat. Opcionalmente, la región Fc puede comprender un residuo de aminoácido que no ocurre naturalmente en posiciones adicionales y/o alternativas conocidas para alguien con experiencia en la materia (ver, por ejemplo, las patentes de los Estados Unidos núms. 5,624,821; 6,277,375; 6,737,056; las publicaciones de patente PCT WO 01/58957, WO 02/06919, WO 04/016750, WO 04/029207, WO 04/035752, WO 04/074455, WO 04/099249, WO 04/063351, WO 05/070963, WO 05/040217, WO 05/092925 y WO 06/020114).

En la presente pueden proporcionarse formulaciones en las que la región Fc comprende un residuo de aminoácido que no ocurre naturalmente en una o más posiciones seleccionadas del grupo que consiste de 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 241, 243, 244, 245, 247, 251, 252, 254, 255, 256, 262, 263, 264, 265, 266, 267, 268, 269, 279, 280, 284, 292, 296, 297, 298, 299, 305, 313, 316, 325, 326, 327, 328, 329, 330, 331, 332, 333, 334, 339, 341, 343, 370, 373, 378, 392, 416, 419, 421, 440 y 443 como se enumeran por el índice EU como se establece en Kabat. Opcionalmente, la región Fc puede comprender un residuo de aminoácido que no ocurre naturalmente en posiciones adicionales y/o alternativas conocidas para alguien con experiencia en la materia (ver, por ejemplo, las patentes de los Estados Unidos núms. 5,624,821; 6,277,375; 6,737,056; las publicaciones de patente PCT WO 01/58957, WO 02/06919, WO 04/016750, WO 04/029207, WO 04/035752, WO 04/074455, WO 04/099249, WO 04/063351, WO 05/070963, WO 05/040217, WO 05/092925 y WO 06/020114).

Puede proporcionarse una variante de Fc en la que la región Fc comprende al menos un residuo de aminoácido que no ocurre naturalmente seleccionado del grupo que consiste de 234D, 234E, 234N, 234Q, 234T, 234H, 234Y, 234I, 234V, 234F, 235A, 235D, 235R, 235W, 235P, 235S, 235N, 235Q, 235T, 235H, 235Y, 235I, 235V, 235F, 236E, 239D, 239E, 239N, 239Q, 239F, 239T, 239H, 239Y, 240I, 240A, 240T, 240M, 241 W, 241 L, 241Y, 241E, 241 R, 243W, 243L 243Y, 243R, 243Q, 244H, 245A, 247L, 247V, 247G, 251F, 252Y, 254T, 255L, 256E, 256M, 262I, 262A, 262T, 262E, 263I,

- 263A, 263T, 263M, 264L, 264I, 264W, 264T, 264R, 264F, 264M, 264Y, 264E, 265G, 265N, 265Q, 265Y, 265F, 265V, 265I, 265L, 265H, 265T, 266I, 266A, 266T, 266M, 267Q, 267L, 268E, 269H, 269Y, 269F, 269R, 270E, 280A, 284M, 292P, 292L, 296E, 296Q, 296D, 296N, 296S, 296T, 296L, 296I, 296H, 269G, 297S, 297D, 297E, 298H, 298I, 298T, 298F, 299I, 299L, 299A, 299S, 299V, 299H, 299F, 299E, 305I, 313F, 316D, 325Q, 325L, 325I, 325D, 325E, 325A, 325T, 325V, 325H, 327G, 327W, 327N, 327L, 328S, 328M, 328D, 328E, 328N, 328Q, 328F, 328I, 328V, 328T, 328H, 328A, 329F, 329H, 329Q, 330K, 330G, 330T, 330C, 330L, 330Y, 330V, 330I, 330F, 330R, 330H, 331G, 331A, 331L, 331M, 331F, 331W, 331K, 331Q, 331E, 331S, 331V, 331I, 331C, 331Y, 331H, 331R, 331N, 331D, 331T, 332D, 332S, 332W, 332F, 332E, 332N, 332Q, 332T, 332H, 332Y, 332A, 339T, 370E, 370N, 378D, 392T, 396L, 416G, 419H, 421K, 440Y y 434W enumerados por el índice EU según lo establecido en Kabat. Opcionalmente, la región Fc puede comprender residuos de aminoácidos que no ocurren naturalmente adicionales y/o alternativos conocidos para alguien con experiencia en la materia (ver, por ejemplo, las patentes de los Estados Unidos núms. 5,624,821; 6,277,375; 6,737,056; las publicaciones de patente PCT WO 01/58957; WO 02/06919; WO 04/016750; WO 04/029207; WO 04/035752 y WO 05/040217).
- 15 Puede proporcionarse una formulación de proteína de la variante de Fc, en la que la región Fc comprende al menos un residuo de aminoácido que no ocurre naturalmente seleccionado del grupo que consiste de 234D, 234E, 234N, 234Q, 234T, 234H, 234Y, 234I, 234V, 234F, 235A, 235D, 235R, 235W, 235P, 235S, 235N, 235Q, 235T, 235H, 235Y, 235I, 235V, 235F, 236E, 239D, 239E, 239N, 239Q, 239F, 239T, 239H, 239Y, 240I, 240A, 240T, 240M, 241W, 241L, 241Y, 241E, 241 R. 243W, 243L, 243Y, 243R, 243Q, 244H, 245A, 247L, 247V, 247G, 251F, 252Y, 254T, 255L, 256E, 256M, 262I, 262A, 262T, 262E, 263I, 263A, 263T, 263M, 264L, 264I, 264W, 264T, 264R, 264F, 264M, 264Y, 264E, 265G, 265N, 265Q, 265Y, 265F, 265V, 265I, 265L, 265H, 265T, 266I, 266A, 266T, 266M, 267Q, 267L, 268E, 269H, 269Y, 269F, 269R, 270E, 280A, 284M, 292P, 292L, 296E, 296Q, 296D, 296N, 296S, 296T, 296L, 296I, 296H, 269G, 297S, 297D, 297E, 298H, 298I, 298T, 298F, 299I, 299L, 299A, 299S, 299V, 299H, 299F, 299E, 305I, 313F, 316D, 325Q, 325L, 325I, 325D, 325E, 325A, 325T, 325V, 325H, 327G, 327W, 327N, 327L, 328S, 328M, 328D, 328E, 328N, 328Q, 328F, 328I, 328V, 328T, 328H, 328A, 329F, 329H, 329Q, 330K, 330G, 330T, 330C, 330L, 330Y, 330V, 330I, 330F, 330R, 330H, 331G, 331A, 331L, 331M, 331F, 331W, 331K, 331Q, 331E, 331S, 331V, 331I, 331C, 331Y, 331H, 331R, 331N, 331D, 331T, 332D, 332S, 332W, 332F, 332E, 332N, 332Q, 332T, 332H, 332Y, 332A, 339T, 370E, 370N, 378D, 392T, 396L, 416G, 419H, 421K, 440Y y 434W enumerados por el índice EU según lo establecido en Kabat. Opcionalmente, la región Fc puede comprender residuos de aminoácidos que no ocurren naturalmente adicionales y/o alternativos conocidos para alguien con experiencia en la materia (ver, por ejemplo, la patente de los Estados Unidos núm. 5,624,821; 6,277,375; 6,737,056; las publicaciones de patente PCT WO 01/58957, WO 02/06919, WO 04/016750, WO 04 / 029207, WO 04/035752 y WO 05/040217).
- 35 Puede proporcionarse una variante de Fc en la que la región Fc comprende al menos un residuo de aminoácido que no ocurre naturalmente en una o más posiciones seleccionadas del grupo que consiste de 239, 330 y 332, enumeradas por el índice EU según lo establecido en Kabat. Puede proporcionarse una variante de Fc en la que la región Fc comprende al menos un residuo de aminoácido que no ocurre naturalmente seleccionado del grupo que consiste de 239D, 330L y 332E, enumerados por el índice EU según lo establecido en Kabat. Opcionalmente, la región Fc puede comprender un aminoácido que no ocurre naturalmente adicional en una o más posiciones seleccionadas del grupo que consiste de 252, 254, y 256, enumeradas por el índice EU como se establece en Kabat. Puede proporcionarse una variante de Fc en la que la región Fc comprende al menos un aminoácido que no ocurre naturalmente seleccionado del grupo que consiste de 239D, 330L y 332E, enumerados por el índice EU como se establece en Kabat y puede proporcionarse al menos un aminoácido que no ocurre naturalmente en una o más posiciones seleccionadas del grupo que consiste de 252Y, 254T y 256E, enumerados por el índice EU como se establece en Kabat.
- 45 Puede proporcionarse una variante de Fc, en la que la región Fc comprende al menos un aminoácido que no ocurre naturalmente en una o más posiciones seleccionadas del grupo que consiste de 234, 235 y 331, enumerados por el índice EU como se establece en Kabat. Puede proporcionarse una variante de Fc, en la que la región Fc comprende al menos un aminoácido que no ocurre naturalmente seleccionado del grupo que consiste de 234F, 235F, 235Y, y 331S, enumerados por el índice EU como se establece en Kabat. Una variante de Fc de la invención puede comprender los residuos de aminoácidos que no ocurren naturalmente 234F, 235F, y 331S, enumerados por el índice EU como se establece en Kabat. Una variante de Fc de la invención puede comprender los residuos de aminoácidos que no ocurren naturalmente 234F, 235Y y 331S, enumerados por el índice EU como se establece en Kabat.
- 55 Opcionalmente, la región Fc puede comprender además aminoácidos adicionales que no ocurren naturalmente en una o más posiciones seleccionadas del grupo que consiste de 252, 254, y 256, enumerados por el índice EU como se establece en Kabat. La presente invención puede proporcionar una variante de Fc, en donde la región Fc comprende al menos un aminoácido que no ocurre naturalmente seleccionado del grupo que consiste de 234F, 235F, 235Y, y 331S, enumerados por el índice EU como se establece en Kabat, y al menos un aminoácido que no ocurre naturalmente en una o más posiciones que se selecciona del grupo que consiste de 252Y, 254T y 256E, enumerados por el índice EU como se establece en Kabat.

La presente invención puede proporcionar una formulación de la proteína variante de Fc donde la región Fc comprende al menos un aminoácido que no ocurre naturalmente en una o más posiciones seleccionadas del grupo que consiste de 239, 330 y 332, enumerados por el índice EU como se establece en Kabat. La presente invención puede proporcionar una formulación de la proteína variante de Fc, donde la región Fc comprende al menos un aminoácido que no ocurre naturalmente seleccionado del grupo que consiste de 239D, 330L y 332E, enumerados por el índice EU como se establece en Kabat. Opcionalmente, la región Fc puede comprender además aminoácidos adicionales que no ocurren naturalmente en una o más posiciones seleccionadas del grupo que consiste de 252, 254, y 256, enumerados por el índice EU como se establece en Kabat. La presente invención puede proporcionar una formulación de la proteína variante de Fc, donde la región Fc comprende al menos un aminoácido que no ocurre naturalmente seleccionado del grupo que consiste de 239D, 330L y 332E, enumerados por el índice EU como se establece en Kabat y al menos un aminoácido que no ocurre naturalmente en una o más posiciones que se seleccionan del grupo que consiste de 252Y, 254T y 256E, enumerados por el índice EU como se establece en Kabat.

La presente invención puede proporcionar una formulación de la proteína variante de Fc, en donde la región Fc comprende al menos un aminoácido que no ocurre naturalmente en una o más posiciones seleccionadas del grupo que consiste de 234, 235 y 331, enumerados por el índice EU como se establece en Kabat. La presente invención puede proporcionar una formulación de la proteína variante de Fc, en donde la región Fc comprende al menos un aminoácido que no ocurre naturalmente seleccionado del grupo que consiste de 234F, 235F, 235Y y 331S, enumerados por el índice EU como se establece en Kabat. Opcionalmente, la región Fc puede comprender además aminoácidos que no ocurren naturalmente adicionales en una o más posiciones seleccionadas del grupo que consiste de 252, 254, y 256, enumerados por el índice EU como se establece en Kabat. La presente invención puede proporcionar una formulación de la proteína variante de Fc, en donde la región Fc comprende al menos un aminoácido que no ocurre naturalmente seleccionado del grupo que consiste de 234F, 235F, 235Y y 331S, enumerados por el índice EU como se establece en Kabat; y al menos un aminoácido que no ocurre naturalmente en una o más posiciones que se seleccionan del grupo que consiste de 252Y, 254T y 256E, enumerados por el índice EU como se establece en Kabat.

Las variantes de Fc de la presente invención pueden combinarse con otras variantes de Fc conocidas tales como las descritas en Ghetie y otros, 1997, Nat. Biotech. 15:637-40; Duncan y otros, 1988, Nature 332:563-564; Lund y otros, 1991; J. Immunol 147:2657-2662; Lund y otros, 1992, Mo. Immunol. 29:53-59; Alegre y otros, 1994, 57:1537-1543 Transplantation; Hutchins y otros, 1995, Proc Natl. Acad Sci Estados Unidos, 92:11980-11984; Jefferis y otros, 1995, Immunol Lett, 44:111-117; Lund y otros, 1995, Faseb J, 9:115-119; Jefferis y otros, 1996, Immunol Lett 54:101-104; Lund y otros, 1996, J Immunol 157:4963-4969; Armour y otros, 1999, Eur J Immunol 29:2613-2624; Idusogie y otros, 2000, J Immunol 164:4178-4184, Ramos y otros, 2000, J Immunol 164:1925-1933; Xu y otros, 2000, Cell Immunol 200:16-26; Idusogie y otros, 2001, J Immunol 166:2571-2575, Shields y otros, 2001, J Biol Chem, 276:6591-6604; Jefferis y otros, 2002, Immunol Lett 82:57-65; Presta y otros, 2002, Biochem Soc Trans 30:487-490; las patentes de los Estados Unidos núms. 5,624,821; 5,885,573; 5,677,425; 6,165,745; 6,277,375; 5,869,046; 6,121,022; 5,624,821; 5,648,260; 6,528,624; 6,194,551; 6,737,056; 6,821,505; 6,277,375, la publicación de patente de los Estados Unidos núm. 2004/0002587 y las publicaciones PCT WO 94/29351, WO 99/58572, WO 00/42072, WO 02/060919, WO 04/029207, WO 04/099249, WO 04/063351. También se incluyen en la presente invención las regiones Fc que comprenden supresiones, adiciones y/o modificaciones. Aun otras modificaciones / sustituciones / adiciones / delecciones del dominio Fc serán fácilmente evidentes para alguien con experiencia en la materia.

Los métodos para generar regiones Fc que no ocurren naturalmente se conocen en la materia. Por ejemplo, pueden generarse sustituciones y/o delecciones de amino ácidos por métodos de mutagénesis, que incluyen, pero no se limitan a, mutagénesis dirigida (Kunkel, Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos, 82:488-492 (1985)), mutagénesis por PCR (Higuchi, PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications", Academic Press, San Diego, pp 177-183 (1990)), y mutagénesis de cassette (Wells y otros, Gene 34:315-323 (1985)), Preferentemente, la mutagénesis dirigida se realiza por el método de la PCR por superposición-extensión (Higuchi, in "PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification", Stockton Press, Nueva York, pp 61-70 (1989)). La técnica de la PCR por superposición-extensión (Higuchi, *ibid.*) también puede usarse para introducir cualquier mutación deseada(s) en una secuencia diana (el ADN de partida). Por ejemplo, la primera ronda de la PCR en el método de superposición-extensión implica la amplificación de la secuencia diana con un cebador exterior (cebador 1) y un cebador de mutagénesis interna (cebador 3), y por separado con un segundo cebador exterior (cebador 4) y un cebador interno (cebador 2), lo que produce dos segmentos de PCR (segmentos A y B). El cebador de mutagénesis interna (cebador 3) se diseña para que contenga desajustes de la secuencia diana y se especifica la mutación deseada(s). En la segunda ronda de la PCR, los productos de la primera ronda de la PCR (segmentos A y B) se amplifican por la PCR por medio del uso de los dos cebadores externos (cebadores 1 y 4). El segmento de la PCR resultante de longitud completa (segmento C) se digiere con enzimas de restricción y el fragmento de restricción resultante se clona en un vector apropiado. Como primer paso de la mutagénesis, el ADN de partida (por ejemplo, de codificación de una proteína de fusión Fc, un anticuerpo o simplemente una región Fc), se clona operativamente en un vector de mutagénesis. Los cebadores están diseñados para reflejar la sustitución de aminoácidos

deseada. Otros métodos útiles para la generación de variantes de regiones Fc se conocen en la materia (ver, por ejemplo, las patentes de los Estados Unidos núms. 5,624,821; 5,885,573; 5,677,425; 6,165,745; 6,277,375; 5,869,046; 6,121,022; 5,624,821; 5,648,260; 6,528,624; 6,194,551; 6,737,056; 6,821,505; 6,277,375, las patentes de los Estados Unidos núms. 2004/0002587 y las publicaciones PCT WO 94/29351, WO 99/58572, WO 00/42072, WO 02/060919, WO 04/029207, WO 04/099249, WO 04/063351).

Una proteína variante de Fc puede comprender una o más glicoformas de ingeniería, es decir, una composición de carbohidratos que se une covalentemente a la molécula que comprende una región Fc. Las glicoformas de ingeniería pueden ser útiles para una variedad de propósitos, que incluyen pero no se limitan a aumentar o reducir la función efectora. Pueden generarse glicoformas de ingeniería por cualquier método conocido para alguien con experiencia en la materia, por ejemplo por medio del uso de cepas de expresión de ingeniería o variantes, por la co-expresión con una o más enzimas, por ejemplo DI N-acetil glucosaminiltransferasa III (GnT11), por la expresión de una molécula que comprende una región Fc en diversos organismos o líneas celulares de varios organismos, o mediante la modificación de los hidratos de carbono(s) después de que se expresa la molécula que comprende la región Fc. Los métodos para generar glicoformas de ingeniería son conocidos en la materia, e incluyen pero no se limitan a los descritos en Umaña y otros, 1999, Nat. Biotechnol 17:176-180; Davies y otros, 20017 Biotechnol Bioeng 74:288-294; Shields y otros, 2002, J Biol Chem 277:26733-26740; Shinkawa y otros, 2003, J Biol Chem 278:3466-3473; la patente de los Estados Unidos núm. 6,602,684; las patentes de los Estados Unidos núms. de serie 10/277, 370; 10/113, 929; PCT WO00/61739A1; PCT WO01/292246A1; PCT WO02/311140A1; PCT WO02/30954A1; la tecnología Potillegent™ (BioWa, Inc, Princeton, Nueva Jersey); la tecnología de ingeniería de glicosilación GlycoMAb™ (Glycart Biotechnology AG, Zurich, Suiza). Ver, por ejemplo, WO 00061739; EA01229125; US20030115614; Okazaki y otros, 2004, JMB, 336: 1239-1249.

Se contempla que una variante de Fc que se describe en la presente puede generarse a partir de, o una región de la variante de Fc que se describe en la presente puede introducirse en cualquier anticuerpo descrito en la presente, que incluye, pero no se limita al anticuerpo monoclonal anti-fluoresceína, 4-4-20 (Kranz y otros, 1982, J. Biol. Chem, 257(12):6987-6995), un anticuerpo humanizado anti-TAG72 (CC49) (Sha y otros, 1994 Biother Cancer 9 (4):341-9), un anticuerpo que se une específicamente a un receptor Eph que incluye pero no se limita a aquellos descritos en las publicaciones PCT núms. WO 04/014292, WO 03/094859 y la solicitud de patente de los Estados Unidos núm. de serie 10/863,729, los anticuerpos que se unen específicamente a la integrina $\alpha V\beta 3$, que incluyen pero no se limitan al, LM609 (Scripps), el anticuerpo monoclonal murino LM609 (publicación PCT WO 89/015155 y la patente de los Estados Unidos núm. 5,753,230), el anticuerpo monoclonal humanizado MEDI-522 (también conocido como VITAXIN®, MedImmune, Inc., Gaithersburg, MD; Wu y otros, 1998, PNAS Estados Unidos 95 (11):6037-6042, las publicaciones PCT WO 90/33919 y WO 00/78815), un anticuerpo contra el interferón alfa como se describe en el documento WO/2005/05059106, un anticuerpo contra el receptor del interferón 1 como se describe en WO/2006/059106, el Erbitux™ (también conocido como IMC-C225) (ImClone Systems Inc.), un anticuerpo monoclonal quimerizado dirigido contra el EGFR; el Herceptin® (Trastuzumab) (Genentech, CA), que es un anticuerpo monoclonal anti-HER2 humanizado para el tratamiento de pacientes con cáncer de mama metastásico; el REOPRO® (abciximab) (Centocor) que es un anti-receptor de la glicoproteína IIb/IIIa en las plaquetas, para la prevención de la formación de coágulos; el Zenapax® (dactilumab) (Roche Pharmaceuticals, Suiza), que es un anticuerpo monoclonal humanizado anti-CD25 inmunosupresor, para la prevención del rechazo agudo del holoinjerto renal. Otros ejemplos son un anti-CD18 F(ab')₂ humanizado (Genentech); el CDP860 que es un anti-CD18 F(ab')₂ humanizado (Celltech, Reino Unido); el PRO542 que es un anticuerpo anti-gp120 del VIH fusionado con el CD4 (Progenics/Genzyme Trangenics); el C14 que es un anticuerpo anti-CD14 (ICOS Pharm); un anticuerpo IgG1 anti-VEGF humanizado (Genentech); el Ovarex™ que es un anticuerpo anti-CA 125 murino (Altarex); el Panorex™ que es un anticuerpo murino IgG2a anti-antígeno de superficie celular 17-IA (Glaxo Wellcome/entocor), el IMC-C225, que es un anticuerpo IgG quimérico anti-EGFR (ImClone System); el Vitaxin™ que es un anticuerpo humanizado anti- integrina $\alpha V\beta 3$ (Applied Molecular Evolution/MedImmune); el Campath 1H/LDP-03 que es un anticuerpo 1gG1 humanizado anti CD52 (Leukosite); el Smart M195 que es un anticuerpo IgG humanizado anti-CD33 (Protein Design Lab/Kanebo); el Rituxan™ que es un anticuerpo IgG1 quimérico anti-CD20 (IDEC Pharm/Genentech, Roche/Zettayaku); el Lymphocide™ que es un anticuerpo IgG humanizado anti-CD22 (Immunomedics); el Smart ID10 que es un anticuerpo humanizado anti-HLA (Protein Design Lab); el Oncolym™ (Lym-1) que es un anticuerpos murino radiomarcado anti-HLA-DR (Techniclone); el anti-CD11a es un anticuerpo IgG1 humanizado (Genentech/Xoma); el ICM3 es un anticuerpo humanizado anti-ICAM3 (ICOS Pharm), el IDEC-114 es un anticuerpo primatizado anti-CD80 (IDEC Pharm / Mitsubishi); el Zevalin™ es un anti-CD20 murino radiomarcado (IDEC/Schering AG), el IDEC-131 es un anticuerpo humanizado anti-CD40L (IDEC/Eisai), el IDEC-151 es un anticuerpo primatizado anti-CD4 (IDEC); el IDEC-152 es un anticuerpo primatizado anti-CD23 (IDEC/Seikagaku); el SMART anti-CD3 es una IgG humanizada anti-CD3 (Protein Design Lab); el 5G1.1 es un anticuerpo humanizado anti- factor 5 del complemento (C5) (Alexion Pharm), el IDEC-151 es un anticuerpo IgG1 anti-CD4 primatizado (IDEC Pharm/SmithKline Beecham); el Mdxcd4 es un anticuerpo humano IgG anti-CD4 (Medarex/Eisai/Genmab); el CDP571 es una IgG4 humanizada anti-TNF-a (Celltech), el LDP-02 es un anticuerpo humanizado anti- $\alpha 4 \beta 7$ (LeukoSite/Genentech); el OrthoClone OKT4A es un anticuerpo IgG humanizado anti-CD4 (Ortho Biotech); el Antova™ es un anticuerpo IgG humanizado anti-CD40L (Biogen); el Antegren™ es un anticuerpo IgG humanizado anti-VLA-4 (Elan), el MDX-33 es un

anticuerpo humano anti-CD64 (Fc γ R) (Medarex/Centeon); el rhuMAb-E25 es un anticuerpo IgG1 humanizado anti-IgE (Genentech/Norvartis/Tanox Biosystems), el IDEC-152 es un anticuerpo primatizado anti-CD23 (IDEC Pharm), el ABX-CBL es anticuerpo IgM murino anti-CD147 (Abgenix); el BTI-322 es un anticuerpo IgG de rata anti-CD2 (Medimmune/Bio trasplante); el Orthoclone/OKT3 es un anticuerpo IgG2a anti-CD3 (Ortho Biotech); el Simulect™ es un anticuerpo IgG1 quimérico anti-CD25 (Novartis Pharm); el LDP-01 es un anticuerpo IgG humanizado anti- β 2-integrina (LeukoSite); el anti-LFA-1 es un F(ab')₂ murino anti-CD18 (Pasteur-Merieux/Immunotech); el CAT-152 es un anticuerpo humano anti-TGF- β 2 (Cambridge- Ab Tech), y el Corsevin M es un anticuerpo quimérico anti-factor VII (Centocor).

Anticuerpos adicionales que pueden comprender una región variante de Fc descrita en la presente pueden enlazar específicamente por ejemplo un antígeno tumoral o de cáncer, los que incluyen, pero no se limitan a, antígeno pancarcinoma KS 1/4 (Pérez y Walker, 1990, J. Immunol 142: 3662-3667; Bumal, 1988, Hybridoma 7 (4):407 - 415), antígeno de carcinoma de ovario (CA125) (Yu y otros, 1991, Cancer Res, 51 (2): 468-475), ácido fosfático prostático (Taylor y otros, 1990, Nucl Acids Res, 18 (16):4928), antígeno específico prostático: (Henttu y Vihko, 1989, Biochem Biophys Res Comm 160 (2):903-910; Israel y otros, 1993, Cancer Res, 53: 227-230), antígeno asociado al melanoma p97 (Estin y otros, 1989, J. Natl Cancer Instit 81 (6):445-446), antígeno gp75 de melanoma (Vijayasardahl y otros, 1990, J. Exp. Med, 171 (4): 1375-1380), antígeno de melanoma de alto peso molecular (HMW-MAA) (Natali y otros, 1987, Cancer 59:55-63; Mittelman y otros, 1990, J. Clin Invest 86: 2136-2144), antígeno de membrana específico de la próstata, antígeno carcinoembrionario (CEA) (Foon y otros, 1994, Proc Am Soc Clin Oncol 13:294), antígeno de mucina polimórfica epitelial, antígeno del glóbulo de grasa de leche humano, antígenos asociados a tumores colorrectales, tales como: CEA, TAG-72 (Yokata y otros, 1992, Cancer Res, 52:3402-3408), O17-1A (Ragnhammar y otros, 1993, Int. J. Cancer 53: 751-758); GICA 19-9 (Herlyn y otros, 1982, J. Clin. Immunol 2: 135), CTA-1 y LEA, antígeno de linfoma de Burkitt 3813, CD19 (Ghetie y otros, 1994, Blood 83: 1329-1336), antígeno de linfoma B humano CD20 (Reff y otros, 1994, Blood 83:435-445), CD33 (Sgouros y otros, 1993, J. Nucl. Med. 34:422-430), antígenos específicos de melanoma tales como el gangliósido GD2 (Saleh y otros, 1993, J. Immunol, 151:3390-3398), gangliósido GD3 (Shitara y otros, 1993, Cancer Immunol Immunotherapy 36:373- 380), gangliósido GM2 (Livingston y otros, 1994, J. Clin. Oncol 12:1036-1044), gangliósido GM3 (Hoon y otros, 1993, Cancer Res, 53:5244-5250), antígeno de superficie celular tipo trasplante tumor-específico (TSTA), antígenos tumorales viralmente inducidos que incluye el antígeno T de los virus de ADN tumoral y los antígenos de la envoltura de los virus de ARN tumorales, antígenos de la alfa-fetoproteína oncofetal, tales como CEA de colon, antígeno oncofetal de tumores de vejiga (Hellstrom y otros, 1985, Cancer Res, 45:2210-2188), antígeno de diferenciación tales como el antígeno de carcinoma de pulmón humano L6, L20 (Hellstrom y otros, 1986, Cancer Res, 46:3917-3923), antígenos de fibrosarcoma, antígeno-Gp37 de leucemia de células T humano (Bhattacharya-Chatterjee y otros, 1988, J. of Immunol, 141:1398-1403), la neoglicoproteína, los esfingolípidos, antígeno de cáncer de mama, tales como EGFR (receptor del factor de crecimiento epidérmico), antígeno HER2 (p185HER2, la mucina polimórfica epitelial (PEM) (Hilkens y otros, 1992, Trends in Bio. Chem. Sci. 17:359), antígeno-APO-1 de linfocito maligno humano (Bernhard y otros, 1989, Science 245: 301-304), antígenos de diferenciación (Feizi, 1985, Nature 314: 53-57), tales como el antígeno I encontrado en eritrocitos fetales, antígeno I de endodermo primario que se encuentra en los eritrocitos adultos, los embriones de preimplantación, I (Ma) que se encuentra en los adenocarcinomas gástricos, M18, M39 que se encuentran en el epitelio mamario, SSEA-1 que se encuentra en las células mieloides, VEP8 y VEP9, MyL, VIM-D5, D 156-22 que se encuentran en el cáncer colorrectal, TRA-1-85 (grupo sanguíneo H), C14 se encuentra en adenocarcinoma de colon, F3 encontrado en el adenocarcinoma pulmonar, AH6 encontrado en el cáncer gástrico, hapteno Y, Ley que se encuentra en las células del carcinoma embrionario, TL5 (grupo sanguíneo A), el receptor de EGF que se encuentra en las células A431, la serie E1 (grupo sanguíneo B) que se encuentra en el cáncer de páncreas, FC10.2 que se encuentra en las células de carcinoma embrionario, antígeno de adenocarcinoma gástrico, CO-514 (del grupo sanguíneo Lea) encontrado en el adenocarcinoma, NS -10 que se encuentra en los adenocarcinomas, CO-43 (grupo sanguíneo Leb) y G49 que se encuentran en el receptor del EGF de las células A431, MH2 (grupo sanguíneo ALeb/Ley) que se encuentra en adenocarcinoma de colon, 19.9 que se encuentran en el cáncer de colon, cáncer gástrico, las mucinas, T5A7 que se encuentra en las células mieloides, R24 que se encuentran en el melanoma, 4.2, GD3, D1.1, OFA-1, GM2, OFA-2, GD2, y M1:22:25:8 que se encuentran en las células de carcinoma embrionario, y SSEA-3 y SSEA-4 que se encuentran en embriones en estado celular 4-8. En una modalidad, el antígeno es un péptido derivado del receptor de células T a partir de un linfoma cutáneo de células T (ver, Edelson, 1998, The Cancer Journal 4:62).

Una variante de Fc descrita en la presente puede generarse a partir de, o una región de una variante de Fc descrita en la presente puede introducirse en cualquier anticuerpo. Además, una región de la variante de Fc descrita en la presente puede usarse para generar una proteína de fusión Fc. Por consiguiente, prácticamente cualquier molécula puede dirigirse y/o incorporarse en un anticuerpo y/o proteína de fusión de Fc que comprende una variante de Fc descrita en la presente, lo que incluye pero no se limita a la siguiente lista de las proteínas, así como la subunidades, los motivos, los dominios y los epítomos pertenecientes a la siguiente lista de proteínas: la renina; una hormona del crecimiento, se incluye la hormona del crecimiento humana y la hormona de crecimiento bovina; el factor de liberación de la hormona del crecimiento; la hormona paratiroidea; la hormona estimulante del tiroides; las lipoproteínas; la antitripsina alfa-1; la cadena A de la insulina; la cadena B de la insulina; la proinsulina; la hormona estimulante del folículo; la calcitonina, la

- hormona luteinizante; el glucagón; los factores de la coagulación, tales como el factor VII, el factor VIIIc, el factor IX, el factor tisular (TF), y el factor de von Willebrand; los factores anticoagulantes tales como la Proteína C; el factor natriurético atrial; el surfactante pulmonar; los activadores del plasminógeno, tales como la uroquinasa o la orina humana o el activador del plasminógeno de tipo tisular (t-PA); la bombesina; la trombina; el factor de crecimiento hematopoyético; el factor de necrosis tumoral alfa y beta; la encefalinasa; el RANTES (regulador de la activación de la células T normalmente expresadas y secretadas); la proteína inflamatoria de macrófagos humanos (MIP-1-alfa); las albúminas de suero tales como la albúmina de suero humano; la sustancia inhibidora de Muellerian; la cadena A de la relaxina; la cadena B de la relaxina; la prorelaxina; el péptido asociado a la gonadotropina de ratón; una proteína microbiana, tal como la beta-lactamasa, la DNasa, la IgE, un antígeno asociado al linfocito T citotóxico (CTLA), tal como el CTLA-4; la inhibina; la activina; el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), los receptores para hormonas o los factores de crecimiento tales como, por ejemplo, el EGFR, el VEGFR; los interferones tales como el interferón alfa (α -IFN), el interferón beta (β -IFN) y el interferón gamma (γ -IFN); los componentes de los receptores de interferón tales como el receptor de interferón 1; la proteína A o D; los factores reumatoides; un factor neurotrófico tal como el factor neurotrófico derivado del hueso (BDNF), la neurotrofina-3, -4, -5, o -6 (NT-3, NT 4, NT-5, o NT -6), o un factor de crecimiento nervioso; el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), el factor de crecimiento de fibroblastos, tal como el α FGF y el β FGF; el factor de crecimiento epidérmico (EGF); un factor de crecimiento transformante (TGF), tal como el TGF-alfa y el TGF -beta, lo que incluye el TGF-1, el TGF-2, el TGF-3, el TGF-4, o el TGF-5; los factores de crecimiento tipo insulina I y II (IGF-I e IGF-II); des (1-3) el IGF (IGF-I de cerebro), las proteínas de unión al factor de crecimiento tipo insulina; las proteínas CD tales como el CD2, el CD3, el CD4, el CD8, el CD11a, el CD14, el CD18, el CD19, el CD20, el CD22, el CD23, el CD25, el CD33, el CD34, el CD40, el CD40L, el CD52, el CD63, el CD64, el CD80 y el CD147, la eritropoyetina, los factores osteoinductivos; las inmunotoxinas; una proteína morfogenética ósea (BMP), un interferón como el interferón-alfa, el beta y gamma, los factores estimulantes de colonias (CSF), como el M-CSF, el GM-CSF, y el G-CSF, las interleucinas (IL), por ejemplo, la IL-1 a la IL-13, el TNF α , el HMGB1; el HMGB2; la superóxido dismutasa; los receptores de las células T; las proteínas de superficie de membrana; el factor de aceleración de la decadencia; el antígeno viral tal como, por ejemplo, una porción de la envoltura del SIDA, por ejemplo, la gp 120; las proteínas de transporte; los receptores de localización; direccionantes; las proteínas reguladoras; las moléculas de adhesión celular, tales como las LFA-1, la Mac 1, la p150.95, la VLA- 4, el ICAM-1, el ICAM-3 y el VCAM, la integrina α 4/p7 y la integrina (Xv/p3 que incluye ya sea una o subunidades de éstas, las subunidades de la integrina alfa tales como la CD49a, la CD49b, la CD49c, la CD49d, la CD49e, la CD49f, la alfa7, la alfa8, la alfa9, la alfaD, la CD11a, la CD11b, la CD51, la CD11c, la CD41, la alfaIIb, la alfaIELb; las subunidades de la integrina beta tales como, la CD29, la CD18, la CD61, la CD104, la beta5, la beta6, la beta7 y la beta8; las combinaciones de las subunidades de integrina, que incluyen pero no se limitan a , α V β 3, α V β 5 y α 4 β 7; un miembro de una vía de la apoptosis; la IgE; los antígenos del grupo sanguíneo; el receptor flk2/flt3, el receptor de la obesidad (OB), el receptor MPL; el CTLA-4; la proteína C; una molécula de quitinasa o tipo quitinasa tal como la YKL-40 y la AMCase; un receptor de Eph tal como el EphA2, el EphA4, el EphB2, etc; un antígeno leucocitario humano (HLA), tal como el HLA-DR; las proteínas del complemento, tales como los receptores del complemento CR1, CIRQ y otros factores del complemento, como C3 y C5; un receptor de glicoproteína tal como la GPIIb α , la GP IIb/IIIa y el CD200, las moléculas co-estimuladoras tales como el CD28/CTLA-4, el ICOS/AILIM, PD-1.
- Las moléculas adicionales que pueden comprender una región variante de Fc descritas en la presente son aquellas que se unen específicamente a antígenos de cáncer, que incluyen, pero no se limitan a, el receptor de ALK (receptor de pleiotropina), la pleiotropina, el antígeno pan-carcinoma KS 1/4, el antígeno de carcinoma de ovario (CA125), fosfato ácido de la próstata, el antígeno específico prostático (PSA), el antígeno p97 asociado a melanoma, el antígeno gp75 de melanoma, el antígeno de melanoma de alto peso molecular, (HMW-MAA); el antígeno prostático específico de membrana; el antígeno carcinoembrionario (CEA); el antígeno de mucina polimórfica epitelial; el antígeno humano de la grasa de glóbulo de la leche; los antígenos colorrectales asociados a tumores tales como: el CEA, el TAG-72 , el CO17-1A, el gangliósido GD2, el gangliósido GD3, el gangliósido GM2 y el gangliósido GM3, el tipo antígeno de trasplante específico del tumor de superficie celular (TSTA), los antígenos tumorales inducidos por virus, que incluyen el antígeno-T, el virus de ADN tumoral y los antígenos de la envoltura de los virus de ARN tumorales; el antígeno oncofetal alfa-fetoproteína, tales como el CEA de colon, la glucoproteína 5T4 trofoblasto y el antígeno oncofetal tumoral de vejiga; el antígeno de diferenciación tal como los antígenos de carcinoma de pulmón L6 y L20; los antígenos de fibrosarcoma; el antígeno-Gp37 de leucemia humana de células T; la neoglicoproteína; los esfingolípidos; los antígenos de cáncer de mama como el EGFR (receptor del factor de crecimiento epidérmico), el NY-BR- 16; el NY-BR-16 y el antígeno HER2 (p185HER2); la mucina polimórfica epitelial (PEM); el antígeno-APO-1 de linfocitos humanos malignos, el antígeno de diferenciación tal como el antígeno I que se encuentra en los eritrocitos fetales; el antígeno I de endodermo primario que se encuentra en los eritrocitos de adultos; los embriones en preimplantación; el I (Ma) que se encuentra en adenocarcinomas gástricos, el M18, el M39 que se encuentran en el epitelio mamario; el SSEA-1 que se encuentra en las células mieloides, el VEP8; el VEP9; el Myl; el VIM-D5, el D156-22 que se encuentran en el cáncer colorrectal, el TRA-1- 85 (el grupo sanguíneo H); el SCP-1 que se encuentra en los testículos y el cáncer de ovario; el C14 que se encuentra en el adenocarcinoma de colon; el F3 que se encuentra en el adenocarcinoma de pulmón; el AH6 que se encuentra en el cáncer gástrico; el hapteno Y, el Ley se encuentra en las células del carcinoma embrionario, el TL5 (grupo sanguíneo A); el receptor de EGF que se encuentra en las células A431; la serie E1 (sangre del grupo B) que se

encuentra en el cáncer de páncreas; el FC10.2 que se encuentra en células de carcinoma embrionario; el antígeno del adenocarcinoma gástrico; el CO-514 (grupo sanguíneo Lea) que se encuentra en el adenocarcinoma; el NS-10 que se encuentra en los adenocarcinomas; el CO-43 (grupo sanguíneo Leb); el G49 se encuentra en el receptor de EGF de las células A431, el MH2 (grupo sanguíneo Aleb / Ley) que se encuentra en adenocarcinoma de colon, el 19.9 que se encuentran en el cáncer de colon, las mucinas de cáncer gástrico; el T5A7 que se encuentra en las células mieloides; el R24 que se encuentran en el melanoma, el 4.2, el GD3, el D1.1, el OFA-1, el GM2, el OFA-2, el GD2, y el M1:22: 25:8 que se encuentran en las células de carcinoma embrionario y el SSEA -3 y SSEA-4 que se encuentran en los embriones en estados de 4 a 8 células, el antígeno cutáneo del linfoma de células T; el antígeno MART-1; el antígeno Sialy Tn (STN), el antígeno de cáncer de colon-NY-CO-45; la variante A del antígeno de cáncer de pulmón NY-LU-12; el antígeno de adenocarcinoma ART1; el antígeno paraneoplásico asociado al carcinoma de cerebro y testículos (antígenos onconeuronales MA2; antígeno neuronal paraneoplásico), el antígeno ventral 2 neuro-oncológico (NOVA2), el gen del antígeno 520 del carcinoma hepatocelular, el antígeno tumoral asociado a la CO-029, los antígenos asociados a tumores MAGE-C1 (antígenos CT7 de cáncer/testículo), el MAGE-B1 (antígeno MAGE-XP), el MAGE-B2 (DAM6), el MAGE-2, el MAGE-4a, el MAGE-4b y el MAGEX2, el antígeno del cáncer testicular (NY-EOS-1); el YKL-40 y los fragmentos de cualquiera de los polipéptidos mencionados anteriormente.

5.14. Glicosilación de los anticuerpos

La glicosilación de anticuerpos que se usan de acuerdo con la invención puede modificarse. Por ejemplo, puede hacerse un anticuerpo aglicosilado (es decir, el anticuerpo carece de glicosilación). La glicosilación puede alterarse, por ejemplo, para aumentar la afinidad del anticuerpo por un antígeno diana. Tales modificaciones de los hidratos de carbono pueden realizarse mediante, por ejemplo, la alteración de uno o más sitios de glicosilación en la secuencia del anticuerpo. Por ejemplo, pueden hacerse una o más sustituciones de aminoácidos que dan como resultado la eliminación de uno o más sitios de glicosilación en el marco de la región variable para eliminar así la glicosilación en dicho sitio. Tal aglicosilación puede aumentar la afinidad del anticuerpo por el antígeno. Este enfoque se describe en mayor detalle en la patente de los Estados Unidos núm. 5,714,350 y 6,350,86. También pueden hacerse una o más sustituciones de aminoácidos que dan como resultado la eliminación de un sitio de glicosilación en la región Fc (por ejemplo, la asparagina 297 de IgG). Además, los anticuerpos aglicosilados pueden producirse en células bacterianas que carecen de la maquinaria de glicosilación necesaria.

También puede hacerse un anticuerpo que tiene un tipo de glicosilación alterada, tal como un anticuerpo hipofucosilado, que tiene una cantidad reducida de residuos fucosil o un anticuerpo que tiene incrementadas las estructuras GlcNAc en dos partes. Se demostró que tales patrones de glicosilación alterados aumentan la capacidad de los anticuerpos de realizar la ADCC. Tales modificaciones de los hidratos de carbono puede realizarse mediante, por ejemplo, la expresión del anticuerpo en una célula hospedera con la maquinaria de glicosilación alterada. Las células con la maquinaria de glicosilación alterada se describen en la materia y pueden usarse como células hospederas en las cuales expresar los anticuerpos recombinantes de la invención para producir con ello un anticuerpo con glicosilación alterada. Ver, por ejemplo, Shields, R.L. y otros, (2002) J. Biol. Chem., 277:26733-26740; Umaña y otros, (1999) Nat. Biotech. 17:176-1, así como, la patente de los Estados Unidos núm. 6,946,292; la patente europea núm. EP 1,176,195; las publicaciones PCT WO 03/035835, WO 99/54342.

5.15. Ingeniería de la región efectora

Puede ser deseable modificar un anticuerpo anti-CD19 de la invención con respecto a la función efectora, para mejorar la eficacia del anticuerpo en el tratamiento de las neoplasias malignas de células B, por ejemplo. Por ejemplo, pueden introducirse residuos de cisteína(s) en la región Fc, lo que permite la formación de enlace disulfuro intercatenario en esta región. El anticuerpo homodimérico así generado tiene una mejor capacidad de internalización y/o una mayor muerte celular dependiente del complemento y/o citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC). Ver, Caron y otros, J. Exp. Med., 176:1191-1195 (1992) y Shopes B., J. Immunol., 148:2918-2922 (1992). Los anticuerpos homodiméricos con mayor actividad anti-tumoral también pueden prepararse por medio del uso de enlaces heterobifuncionales como se describe en Wolff y otros, Cancer Research, 53:2560-2565 (1993). También puede diseñarse por ingeniería un anticuerpo el cual tiene dos regiones Fc y por lo tanto puede tener una mayor capacidad para lisar por complemento y ADCC. Ver, Stevenson y otros, Anti-Cancer Drug Design, 3:219-230 (1989).

Otros métodos de ingeniería de regiones Fc de anticuerpos con el fin de alterar las funciones efectoras se conocen en la materia (por ejemplo, la publicación de patente de los Estados Unidos núm. 20040185045 y la publicación PCT núm. WO 2004/016750, ambas de Koenig y otros, que describen la alteración de la región Fc para mejorar la afinidad de unión por el FcγRIIB en comparación con la afinidad de unión para el FcγRIIA; ver, también, la publicación PCT núm., WO 99/58572 de Armour y otros, WO 99/51642 de Idusogie y otros, y US 6,395,272 de Deo y otros. Los métodos de modificación de la región Fc para disminuir la afinidad de unión a FcγRIIB también se conocen en la materia (por ejemplo, la publicación de patente de los Estados Unidos núm. 20010036459 y la publicación PCT núm. WO 01/79299,

ambas de Ravetch y otros. Los anticuerpos modificados que tienen regiones variantes de Fc con afinidad de unión mejorada para FcγRIIIA y/o FcγRIIA en comparación con una región Fc de tipo salvaje se describen también (por ejemplo, la publicación PCT núm. WO2004/063351, de Stavenhagen y otros).

- 5 Los ensayos *in vitro* conocidos en la materia pueden usarse para determinar si los anticuerpos anti-CD19 que se usan en las composiciones y métodos de la invención son capaces de mediar la ADCC, tales como los que se describen en la presente.

5.16. Fabricación/producción de los anticuerpos anti-cd19

- 10 Una vez que se diseña un anticuerpo anti-CD19 deseado, el anticuerpo anti-CD19 puede producirse a escala comercial por medio del uso de métodos que son bien conocidos en la materia para la fabricación a gran escala de anticuerpos. Por ejemplo, esto puede lograrse por medio del uso de sistemas de expresión recombinantes tales como, pero que no se limitan a, los descritos a continuación.

15 5.17. Sistemas de expresión recombinante

- La expresión recombinante de un anticuerpo o variantes del mismo, generalmente requiere la construcción de un vector de expresión que contiene un polinucleótido que codifica para el anticuerpo. Una vez que se obtiene un polinucleótido de codificación de una molécula de anticuerpo o una cadena pesada o ligera de un anticuerpo, o parte del mismo, el vector para la producción de la molécula de anticuerpo puede producirse por tecnología de ADN recombinante por medio del uso de técnicas bien conocidas en la materia. Ver, por ejemplo, la patente de los Estados Unidos núm. 6,331,415. Así, se describen en la presente los métodos para la preparación de una proteína mediante la expresión de un polinucleótido que contiene una secuencia de nucleótidos de codificación de anticuerpos. Los métodos que son bien conocidos por aquellos con experiencia en la materia pueden usarse para construir vectores de expresión que contienen secuencias de codificación de anticuerpos y señales de control de la transcripción y la traducción apropiadas. Estos métodos incluyen, por ejemplo, las técnicas *in vitro* de ADN recombinante, las técnicas sintéticas, y la recombinación genética *in vivo*. La invención, por lo tanto, proporciona vectores replicables que comprenden una secuencia de nucleótidos de codificación de una molécula de anticuerpo, una cadena pesada o ligera de un anticuerpo, un dominio variable de cadena pesada o ligera de un anticuerpo o una porción del mismo, o una cadena pesada o ligera de la CDR, operativamente ligada a un promotor. Dichos vectores pueden incluir la secuencia de nucleótidos de codificación de la región constante de la molécula de anticuerpo (ver, por ejemplo, la publicación internacional núm. WO 86/05807 y WO 89/01036, y la patente de los Estados Unidos núm. 5,122,464) y el dominio variable del anticuerpo puede clonarse en un vector para la expresión de toda la cadena pesada, toda la ligera, o ambas cadenas, pesada y ligera enteras.

- 35 Pueden hacerse anticuerpos anti-CD19 por medio del uso de la técnica de recombinación homóloga dirigida para producir la totalidad o parte de los anticuerpos anti-CD19 (ver las patentes de los Estados Unidos núms. 6,063,630, 6,187,305, y 6,692,737. Los anticuerpos anti-CD19 pueden hacerse por medio del uso de técnicas de recombinación al azar para producir la totalidad o parte de los anticuerpos anti-CD19 (ver, en las patentes de los Estados Unidos núms. 6,361,972, 6,524,818, 6,541,221, y 6,623,958). Los anticuerpos anti-CD19 también pueden producirse en las células que expresan un anticuerpo a partir de una secuencia genómica de la célula que comprende un locus de inmunoglobulina modificada por medio del uso de la recombinación homóloga sitio específica mediada por Cre (ver, la patente de los Estados Unidos núm. 6,091,001). La línea de células hospederas puede derivarse de la especie humana o no humana, lo que incluye pero no se limita a ratón, y hámster chino. Cuando se desea la producción de anticuerpos humanos o humanizados, la línea de células hospedera debe ser una línea celular humana. Estos métodos pueden usarse ventajosamente para diseñar las líneas celulares estables que permanentemente expresan la molécula de anticuerpo.

- Una vez que el vector de expresión se transfiere a una célula hospedera por técnicas convencionales, las células transfectadas luego se cultivan mediante técnicas convencionales para producir un anticuerpo. Así, la invención incluye células hospedera que contienen un polinucleótido que codifica un anticuerpo de la invención o fragmentos de éstos, o una cadena pesada o ligera de éste, o parte de éste, o un anticuerpo de cadena única de la invención, unido operativamente a un promotor heterólogo. Para la expresión de anticuerpos de doble cadena, los vectores que codifican tanto las cadenas pesada como ligera pueden co-expresarse en la célula hospedera para la expresión de la molécula de inmunoglobulina completa, como se detalla a continuación.

- 55 Una variedad de sistemas hospederos de vectores de expresión pueden usarse para expresar un anticuerpo anti-CD19 o porciones del mismo que pueden usarse en la ingeniería y la generación de anticuerpos anti-CD19 (ver, por ejemplo, la patente de los Estados Unidos núm. 5,807,715). Por ejemplo, células de mamíferos tales como células de ovario de hámster chino (CHO), en conjunción con un vector tal como el principal elemento intermedio promotor temprano del gen del citomegalovirus humano es un sistema de expresión eficaz para los anticuerpos (Foecking y otros, Gene, 45:101 (1986); y Cockett y otros, Bio/Technology, 08:02 (1990)). Además, puede elegirse una cepa de células hospedera que

module la expresión de las secuencias insertadas de anticuerpos, o modifique y procese el producto del gen del anticuerpo en la manera específica deseada. Tales modificaciones (por ejemplo, la glicosilación) y el procesamiento (por ejemplo, la escisión) de los productos de proteína pueden ser importantes para la función de la proteína. Las diferentes células hospederas tienen mecanismos característicos y específicos para el procesamiento post-traducciona

Las líneas celulares humanas desarrolladas para inmortalizar linfocitos humanos pueden usarse para producir recombinantemente anticuerpos monoclonales humanos anti-CD19. En una modalidad, la línea celular humana PER.C6. (Crucell, Holanda) puede usarse para producir recombinantemente anticuerpos monoclonales humanos anti-CD19.

En los sistemas bacterianos, un número de vectores de expresión pueden seleccionarse ventajosamente en dependencia del uso previsto para la molécula de anticuerpo que se expresa. Por ejemplo, cuando se va a producir una gran cantidad de tal anticuerpo, para la generación de composiciones farmacéuticas que comprenden un anticuerpo anti-CD19, son deseables los vectores que dirigen la expresión de altos niveles de productos de proteína de fusión que son fácilmente purificados. Esos vectores incluyen, pero no se limitan al vector de expresión pUR278 de *E. coli* (Ruther y otros, EMBO, 12:1791 (1983)), en el cual la secuencia de codificación del anticuerpo puede ligarse individualmente dentro del marco del vector con la región de codificación lacZ de modo que se produce una proteína de fusión; los vectores pIN (Inouye y Inouye, 1985, Nucleic Acids Res, 13:3101-3109 (1985); Van Heeke & Schuster, 1989, J. Biol. Chem., 24: 5503-5509 (1989)); y similares. También pueden usarse los vectores pGEX para expresar polipéptidos extraños como proteínas de fusión con la glutatión-S-transferasa (GST). En general, tales proteínas de fusión son solubles y pueden purificarse fácilmente a partir de las células lisadas por adsorción y unión a una matriz de afinidad glutatión-agarosa seguido por la elución en presencia de glutatión libre. Los vectores pGEX están diseñados para introducir atrombina y/o sitios de escisión de la proteasa factor Xa en el polipéptido expresado de modo que el producto de gen diana clonado puede liberarse del resto GST.

En un sistema de insectos, el virus de la poliedrosis nuclear *Autographa californica* (AcNPV) se usa como vector para expresar genes extraños. El virus crece en células de *Spodoptera frugiperda*. La secuencia de codificación del anticuerpo puede clonarse individualmente en regiones no esenciales (por ejemplo, el gen de la polihedrina) del virus y se coloca bajo el control de un promotor de AcNPV (por ejemplo, el promotor de la polihedrina).

En las células hospederas de mamífero, pueden usarse un número de sistemas de expresión basados en virus. En los casos en que un adenovirus se usa como un vector de expresión, la secuencia de codificación de los anticuerpos de interés puede ligarse a un complejo de control de la transcripción/traducción del adenovirus, por ejemplo, el promotor tardío y la secuencia líder tripartita. Este gen quimérico puede luego insertarse en el genoma del adenovirus por recombinación *in vitro* o *in vivo*. La inserción en una región no esencial del genoma viral (por ejemplo, la región E1 o E3) dará como resultado un virus recombinante que es viable y capaz de expresar la molécula de anticuerpo en hospedadores infectados (por ejemplo, ver, Logan y Shenk, Proc. Natl. Acad. Sci Estados Unidos, 81:355-359 (1984)). Las señales específicas de iniciación también pueden ser necesarias para la traducción eficiente de las secuencias de codificación de anticuerpos insertadas. Estas señales incluyen el codón de iniciación ATG y secuencias adyacentes. Además, el codón de iniciación debe generalmente estar en marco con el marco de lectura de la secuencia de codificación deseada para asegurar la traducción del inserto completo. Estas señales exógenas traduccionales de control y los codones de iniciación pueden ser de una variedad de orígenes, tanto naturales como sintéticos. La eficiencia de expresión puede mejorarse por la inclusión de elementos potenciadores de la transcripción adecuados, terminadores de la transcripción, etc (ver, por ejemplo, Bittner y otros, Methods in Enzymol, 153:51-544 (1987)).

La expresión estable puede usarse para la producción a largo plazo, de alto rendimiento, de proteínas recombinantes. Por ejemplo, pueden generarse líneas celulares que expresan de manera estable la molécula de anticuerpo. Las células hospederas pueden transformarse con un vector adecuadamente creado por ingeniería que comprende elementos de control de la expresión (por ejemplo, promotor, potenciador, terminadores de la transcripción, sitios de poliadenilación, etc), y un gen marcador seleccionable. Después de la introducción del ADN extraño, las células pueden dejarse crecer durante 1-2 días en un medio enriquecido, y luego se cambian a un medio selectivo. El marcador seleccionable en el plásmido recombinante confiere resistencia a la selección y permite que las células que integraron establemente el plásmido en sus cromosomas crezcan y formen focos que a su vez pueden clonarse y ampliar en líneas celulares. Los plásmidos que codifican un anticuerpo anti-CD19 pueden usarse para introducir el gen/cADN en cualquier línea celular adecuada para la producción en cultivo.

- Pueden usarse un número de sistemas de selección que incluyen, pero no se limitan a, los genes de la timidina quinasa del virus de herpes simple (Wigler y otros, Cell, 11:223 (1977)), la hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa (Szybalska y Szybalski, Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos 48:202 (1992)), y la adenina fosforribosiltransferasa (Lowy y otros, Cell 22:8-17 (1980)) puede emplearse en células tk⁻, hpgrt⁻ o aprT⁻, respectivamente. Además, la resistencia antimetabolito puede usarse como la base de la selección para los siguientes genes: el *dhfr*, que confiere resistencia al metotrexato (Wigler y otros, Proct. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos, 77:357 (1980); O'Hare y otros, Proct. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos 78:1527 (1981)); el *gpt*, que confiere resistencia al ácido micofenólico (Mulligan & Berg, Proct. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos 78:2072-(1-981)); el *neo*, que confiere resistencia al aminoglicósido G-418 (Wu y Wu, Biotherapy 3:87-95 (1991); Tolstoshev, Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 32:573-596 (1993); Mulligan, Science 260:926-932 (1993), y Morgan y Anderson, Ann. Rev. Biochem. 62:191-217 (1993); May, TIB TECH 11(5) :155-2 15 (1993)); y el *hygro*, que confiere resistencia a la higromicina (Santerre y otros, Gene, 30:147 (1984)). Los métodos comúnmente conocidos en la materia de la tecnología del ADN recombinante pueden aplicarse de rutina para seleccionar el clon recombinante deseado, y tales métodos se describen, por ejemplo, en Ausubel y otros, (Eds.), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Nueva York (1993); Kriegler, Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, Stockton Press, Nueva York (1990), y en los capítulos 12 y 13, Dracopoli y otros, (Eds.), Current Protocols en Human Genetics, John Wiley & Sons, Nueva York (1994); Colberre-Garapin y otros, 1981, J. Mol. Biol. 150:1, que se incorporan en la presente como referencia en su totalidad.
- Los niveles de expresión de una molécula de anticuerpo pueden aumentarse mediante la amplificación del vector (para una revisión, ver, Bebbington y Hentschel, The use of vectors based on gene amplification for the expression of cloned genes in mammalian cells in DNA cloning, Vol. 3, Academic Press, Nueva York (1987)). Cuando un marcador en el sistema del vector de expresión del anticuerpo es amplificable, un aumento en el nivel del inhibidor presente en cultivo de la célula hospedera aumentará el número de copias del gen marcador. Dado que la región amplificada está asociada con el gen del anticuerpo, la producción del anticuerpo también aumentará (Crouse y otros, Mol. Cell Biol., 3:257 (1983)). Los niveles de expresión de anticuerpos pueden ser amplificados a través del uso de métodos recombinantes y herramientas conocidas por aquellos con experiencia en la materia de producción de proteínas recombinantes, incluidas las tecnologías que remodelan la cromatina circundante y potencian la expresión del transgén en la forma de un dominio activo transcripcional artificial.
- La célula hospedera puede cotransfectarse con dos vectores de expresión, el primer vector que codifica un polipéptido derivado de una cadena pesada y el segundo vector que codifica un polipéptido derivado de cadena ligera. Los dos vectores pueden contener marcadores seleccionables idénticos o diferentes. Un solo vector que codifica, y es capaz de expresar, ambos polipéptidos de cadena pesada y ligera puede también usarse. En tales situaciones, la cadena ligera se debe colocar 5' de la cadena pesada para evitar un exceso de cadena pesada libre tóxica (Proudfoot, Nature 322:562-65 (1986); y Kohler, 1980, Proct. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos, 77:2197 (1980)). Las secuencias codificantes para las cadenas pesada y ligera pueden comprender ADNc o ADN genómico.
- Una vez que una molécula de anticuerpo se produce por expresión recombinante, puede purificarse por cualquier método conocido en la materia para la purificación de una molécula de inmunoglobulina, por ejemplo, por cromatografía (por ejemplo, intercambio iónico, afinidad, en particular por afinidad por los antígenos específicos en Proteína A o Proteína G, y la cromatografía por tala), la centrifugación, la solubilidad diferencial, o por cualquier otra técnica estándar para la purificación de proteínas. Además, los anticuerpos de la presente invención o sus fragmentos pueden fusionarse con secuencias de polipéptidos heterólogos descritos en la presente o de otro tipo conocido en la materia para facilitar la purificación.

5.17.1. Purificación y aislamiento de los anticuerpos.

- Cuando se usan técnicas recombinantes, el anticuerpo puede producirse intracelularmente, en el espacio periplásmico, o directamente secretarse en el medio. Si el anticuerpo se produce intracelularmente, como un primer paso, los restos de partículas, ya sean células hospederas o fragmentos lisados, se eliminan, por ejemplo, por centrifugación o ultrafiltración. Carter y otros, Bio/Technology, 10:163-167 (1992) describen un procedimiento para aislar anticuerpos que se secretan en el espacio periplásmico de E. coli. Brevemente, la pasta de células se descongela en presencia de acetato sódico (pH 3.5), EDTA, y fluorurofenilmetilsulfonilo (PMSF) durante aproximadamente 30 min. Los restos celulares pueden eliminarse por centrifugación. Cuando el anticuerpo mutante se secreta en el medio, los sobrenadantes procedentes de tales sistemas de expresión generalmente primero se concentran por medio del uso de un filtro para la concentración de proteínas disponible comercialmente, por ejemplo, una unidad de ultrafiltración Amicon o Millipore Pellicon. Puede incluirse un inhibidor de proteasa, tal como el PMSF en cualquiera de las etapas anteriores para inhibir la proteólisis y pueden incluirse antibióticos para evitar el crecimiento de contaminantes adventicios.

La composición de anticuerpos que se prepara a partir de las células puede purificarse por medio del uso, por ejemplo, de la cromatografía en hidroxilapatita, la cromatografía de interacción hidrofóbica, la cromatografía de intercambio iónico, la electroforesis en gel, la diálisis y/o la cromatografía de afinidad ya sea sola o en combinación con otras etapas de purificación. La idoneidad de la proteína A como un ligando de afinidad depende de la especie y el isotipo de cualquier dominio Fc de inmunoglobulina que esté presente en el anticuerpos mutante. La proteína A puede usarse para purificar los anticuerpos basados en las cadenas pesadas humanos $\gamma 1$, $\gamma 2$, o $\gamma 4$ (Lindmark y otros, J. Immunol. Methods, 62:1-13 (1983)). La proteína G se recomienda para todos los isotipos de ratón y para $\gamma 3$ humana (Guss y otros, EMBO J., 5:15671575 (1986)). La matriz a la cual está unido el ligando de afinidad es frecuentemente agarosa, pero otras matrices están disponibles. Las matrices mecánicamente estables tales como el vidrio de poro controlado o poli(estirenodivinil)benceno permiten velocidades de flujo más rápido y tiempos más cortos de procesamiento que los que pueden lograrse con agarosa. Cuando el anticuerpo comprende un dominio CH3, la resina Bakerbond ABX (JT Baker, Phillipsburg, NJ) es útil para la purificación. Otras técnicas para la purificación de proteína tales como el fraccionamiento en una columna de intercambio iónico, la precipitación con etanol, HPLC de fase reversa, la cromatografía sobre sílice, la cromatografía en heparina, la cromatografía de Sepharose en una resina de intercambio aniónico o catiónico (por ejemplo, una columna de ácido poliaspártico), el cromatoforo, la SDS-PAGE, y la precipitación con sulfato de amonio también están disponibles en función del anticuerpo que se va a recuperar.

Después de cualquier etapa(s) de purificación preliminar, la mezcla que comprende el anticuerpo de interés y los contaminante puede someterse a cromatografía de interacción hidrofóbica de bajo pH por medio del uso de un tampón de elución a un pH entre aproximadamente 2.5-4.5, y se realiza a bajas concentraciones de sal (por ejemplo, desde aproximadamente 0-0.25 M de sal).

5.18. Anticuerpos anti-CD19 terapéuticos

Un anticuerpo anti-CD19 usado en las composiciones y métodos de la invención puede ser un anticuerpo humanizado que puede mediar la apoptosis de células de linaje B y/o la ADCC humana, o puede seleccionarse a partir de anticuerpos anti-CD19 conocidos que pueden mediar la apoptosis de células de linaje B y/o la ADCC humana. Un anticuerpo anti-CD19 puede ser un anticuerpo anti-CD19 monoclonal, humanizado. Un anticuerpo anti-CD19 que se usa en las composiciones y métodos de la invención puede ser un anticuerpo humanizado del isotipo IgG1 o IgG3 humano o cualquier alelo IgG1 o IgG3 encontrado en la población humana. Un anticuerpo anti-CD19 usado en las composiciones y métodos de la invención puede ser un anticuerpo humanizado del isotipo IgG2 o IgG4 humano o cualquier alelo IgG2 o IgG4 encontrado en la población humana.

Mientras que esos anticuerpos pueden generarse por medio del uso de las técnicas descritas anteriormente, en otras modalidades de la invención, los anticuerpos murinos HB 12A y HB12B como se describen en la presente u otros anticuerpos anti-CD19 comercialmente disponibles pueden quimerizarse, humanizarse, o convertirse en anticuerpos humanos.

Por ejemplo, los anticuerpos anti-CD19 conocidos que pueden usarse incluyen, pero no se limitan a, el HD37 (IgG1, kappa) (Dako North America, Inc "Carpinteria, CA), el BU12 (Callard y otros, J. Immunology, 148 (10):2983-7 (1992)), el 4G7 (IgG1) (Meeker y otros, Hibridoma, 3(4):305-20 (1984 Winter)), el J4.119 (Beckman Coulter, Krefeld, Alemania), el B43 (PharMingen, San Diego, CA), el SJ25C1 (BD PharMingen, San Diego, CA), el FMC63 (IgG2a) (Zola y otros, Immunol. Cell. Biol. 69 (PT6):411-22 (1991); Nicholson y otros, Mol. Immunol., 34:1157-1165 (1997); Pietersz y otros, Cancer Immunol. Immunotherapy, 41:53-60 (1995)), el 89B (B4) (IgG1) (Beckman Coulter, Miami, FL; Nadler y otros, J. Immunol. 131:244-250 (1983)), y/o el HD237 (IgG2b) (Cuarto Taller Internacional sobre Antígenos de Diferenciación de Leucocitos Humanos, Viena, Austria, 1989; y Pezzutto y otros, J. Immunol, 138 (9):2793-2799 (1987)).

El anticuerpo puede ser una variante con isotipo cambiado de un anticuerpo conocido (por ejemplo, a un isotipo IgG1 o IgG3 humano) tales como los descritos anteriormente.

Los anticuerpos anti-CD19 que se usan en las composiciones y métodos de la invención pueden ser anticuerpos desnudos, inmunoconjugados o proteínas de fusión. Los anticuerpos anti-CD19 descritos anteriormente para su uso en las composiciones y métodos de la invención pueden ser capaces de reducir o eliminar las células B y la inmunoglobulina circulante en un humano tratado con el mismo. La depleción de las células B puede ser sobre las células B circulantes, o en los tejidos particulares, tales como, pero que no se limitan a, la médula ósea, el bazo, los tejidos linfoides asociados al intestino, y/o los ganglios linfáticos. Esa depleción puede conseguirse a través de varios mecanismos, tales como la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo (ADCC) y/o mediante el bloqueo de la interacción del CD19 con su ligando previsto, y/o la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC), la inhibición de la proliferación de células B y/o la inducción de la muerte de las células B (por ejemplo, a través de la apoptosis). Por "depleción" de las células B se entiende una reducción en la circulación de las células B y la células B en el tejido específico(s) de al menos aproximadamente 25%, 40%, 50%, 65%, 75%, 80%, 85 %, 90%, 95% o más,

Virtualmente todas las células B detectables pueden depletarse de la circulación y/o tejido(s) particular. Por "depleción" de inmunoglobulina (Ig) circulante se entiende una reducción en al menos aproximadamente 25%, 40%, 50%, 65%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o más, Virtualmente toda la Ig detectable puede eliminarse de la circulación.

5 5.18.1. Selección de anticuerpos por unión al CD19 humano.

Pueden usarse ensayos de unión para identificar los anticuerpos que se unen al antígeno CD19 humano. Los ensayos de unión pueden realizarse ya sea como ensayos de unión directa o como ensayos de competencia por la unión. La unión puede detectarse mediante ELISA estándar o ensayos estándar de citometría de flujo. En un ensayo de unión directa, un anticuerpo candidato se prueba por su unión al antígeno CD19 humano. En ciertas modalidades, los ensayos de selección comprenden, en un segundo paso, la determinación de la capacidad de causar la muerte celular o la apoptosis de las células B que expresan el CD19 humano. Los ensayos de competencia de unión, por otro lado, evalúan la capacidad de un anticuerpo candidato para competir con un anticuerpo anti-CD19 conocido u otro compuesto que se une al CD19 humano.

En un ensayo de unión directa, el antígeno CD19 humano se pone en contacto con un anticuerpo candidato bajo condiciones que permiten la unión del anticuerpo candidato al antígeno CD19 humano. La unión puede tener lugar en solución o en una superficie sólida. El anticuerpo candidato puede marcarse previamente para la detección. Cualquier compuesto detectable puede usarse para el marcaje, tal como, pero no limitado a, un isótopo luminiscente, fluorescente o radiactivo o un grupo que contiene los mismos, o un marcador no isotópico, tal como una enzima o colorante. Después de un período de incubación suficiente para que tenga lugar la unión, la reacción se expone a condiciones y manipulaciones que eliminan el anticuerpo en exceso o unido inespecíficamente. Típicamente, se trata de un lavado con un tampón apropiado. Por último, se detecta la presencia de un complejo CD19-anticuerpo.

En un ensayo de competencia de unión, se evalúa un anticuerpo candidato por su capacidad para inhibir o desplazar la unión de un anticuerpo anti-CD19 conocido (u otro compuesto) al antígeno CD19 humano. Un enlazador de CD19 conocido marcado puede mezclarse con el anticuerpo candidato, y se coloca bajo condiciones en las que la interacción entre ellos normalmente se produce, con y sin la adición del anticuerpo candidato. La cantidad de enlazador de CD19 conocido marcado que se une al CD19 humano puede compararse con la cantidad unida en presencia o ausencia del anticuerpo candidato.

El ensayo de unión puede llevarse a cabo con uno o más componentes inmovilizados sobre una superficie sólida para facilitar la formación y detección del complejo anticuerpo antígeno. El soporte sólido puede ser, pero no se limita a, fluoruro de polivinilideno, policarbonato, poliestireno, polipropileno, polietileno, vidrio, nitrocelulosa, dextrano, nailon, poliácridamida y agarosa. La configuración de soporte puede incluir perlas, membranas, micropartículas, la superficie interior de un recipiente de reacción, tal como una placa de microtitulación, tubo de ensayo u otros recipientes de reacción. La inmovilización del CD19 humano, u otro componente, puede lograrse mediante uniones covalentes o no covalentes. En una modalidad, la unión puede ser indirecta, es decir, a través de un anticuerpo unido. En otra modalidad, el antígeno CD19 humano y los controles negativos se marcan con un epítipo, tal como la glutatión S-transferasa (GST) de manera que la fijación a la superficie sólida puede medirse por un anticuerpo comercialmente disponible, tal como el anti-GST (Santa Cruz Biotechnology).

Por ejemplo, un ensayo de afinidad de unión puede realizarse por medio del uso del antígeno CD19 humano que está inmovilizado a un soporte sólido. Típicamente, el componente inmovilizado de la reacción de unión, en este caso el anticuerpo anti-CD19 candidato, se marca para permitir la detección. Una variedad de métodos de marcaje están disponibles y pueden usarse, tales como el luminiscente, el cromóforo, el fluorescente, o el isótopo radiactivo o un grupo que contiene los mismos, y marcadores no isotópicos, tales como enzimas o colorantes. El anticuerpo anti-CD19 candidato puede marcarse con un fluoróforo tal como isotiocianato de fluoresceína (FITC, disponible de Sigma Chemicals, St. Louis). Tal ensayo de afinidad de unión puede realizarse por medio del uso del antígeno CD19 humano inmovilizado sobre una superficie sólida. Los anticuerpos anti-CD19 se incuban con el antígeno y se detecta la unión específica de anticuerpos por métodos conocidos en la materia que incluyen, pero no se limitan a, los análisis Biacore, métodos de ELISA, FMET y RIA.

Finalmente, el marcaje que queda sobre la superficie sólida puede detectarse por cualquier método de detección conocido en la materia. Por ejemplo, si el anticuerpo anti-CD19 candidato está marcado con un fluoróforo, puede usarse un fluorímetro para detectar los complejos.

El antígeno CD19 humano puede añadirse a los ensayos de unión en forma de células intactas que expresan el antígeno CD19 humano, o membranas aisladas que contienen el antígeno CD19 humano. Así, la unión directa al antígeno CD19 humano puede probarse en células intactas en cultivo o en modelos animales, en presencia y ausencia del anticuerpo anti-CD19 candidato. Un anticuerpo anti-CD19 candidato marcado puede mezclarse con células que expresan el

antígeno CD19 humano, o con extractos crudos obtenidos a partir de tales células, y el anticuerpo anti-CD19 candidato puede añadirse. Las membranas aisladas pueden usarse para identificar anticuerpos anti-CD19 candidatos que interactúan con el CD19 humano. Por ejemplo, en un experimento típico que usa membranas aisladas, las células pueden modificarse genéticamente para expresar el antígeno CD19 humano. Las membranas pueden cosecharse mediante técnicas estándar y usarse en un ensayo de unión *in vitro*. El anticuerpo anti-CD19 candidato marcado (por ejemplo, anticuerpo marcado fluorescente) está unido a las membranas y se ensaya para la actividad específica; la unión específica se determina por comparación con los ensayos de unión que se realizan en presencia de un exceso de anticuerpo anti-CD19 candidato no marcado (frío). El antígeno CD19 humano soluble también puede expresarse recombinantemente y usarse en ensayos no basados en células para identificar anticuerpos que se unen al antígeno CD19 humano. Los polipéptidos de CD19 humanos recombinantemente expresados pueden usarse en los ensayos de selección no basados en células. Los péptidos correspondientes a una o más de las porciones de unión del antígeno CD19 humano, o proteínas de fusión que contienen una o más de las porciones de unión del antígeno CD19 humano también pueden usarse en sistemas de selección no basados en células para identificar anticuerpos que se unen a las porciones del antígeno CD19 humano. En ensayos no basados en células el CD19 humano recombinante expresado está unido a un sustrato sólido tal como un tubo de ensayo, pozo de microtitulación o una columna, por medios bien conocidos para aquellos con experiencia en la materia (ver, Ausubel y otros, *Supra*). Los anticuerpos de prueba se ensayaron para determinar su capacidad para unirse al antígeno CD19 humano.

La reacción de unión también puede llevarse a cabo en solución. En este ensayo, al componente marcado se le permite interactuar con su pareja de unión(s) en solución. Si las diferencias de tamaño entre el componente marcado y su pareja de unión(s) permiten tal separación, la separación puede lograrse al pasar los productos de la reacción de unión a través de un ultrafiltro cuyos poros permiten el paso del componente marcado no unido pero no el de su pareja de unión(s) o del componente marcado unido a su pareja(s). La separación también puede lograrse por medio del uso de cualquier reactivo capaz de capturar una pareja de unión del componente marcado de la solución, tal como un anticuerpo contra la pareja de unión y así sucesivamente.

Por ejemplo, una genoteca de fagos puede seleccionarse al pasar fago a partir de una genoteca de fagos continua a través de una columna que contiene el antígeno CD19 humano purificado, o un derivado, análogo, fragmento o dominio del mismo, ligado a una fase sólida, tal como perlas de plástico. Al alterar la astringencia de la solución de lavado, es posible enriquecerla en fagos que expresan péptidos con afinidad elevada por el antígeno CD19 humano. El fago aislado de la columna puede clonarse y medir la afinidad directamente. Al saber qué anticuerpos y sus secuencias de aminoácidos confieren la unión más fuerte al antígeno CD19 humano, los modelos de ordenadores pueden usarse para identificar los contactos moleculares entre el antígeno CD19 y el anticuerpo candidato.

El soporte sólido puede ser una membrana que contiene el antígeno CD19 humano unido a una placa de microtitulación. Los anticuerpos candidatos, por ejemplo, pueden unirse a células que expresan genotecas de anticuerpos que se cultivan bajo condiciones que permiten la expresión de los miembros de la genoteca en la placa de microtitulación. Se cosechan los miembros de las genotecas que se unen al CD19 humano. Tales métodos, se describen generalmente a modo de ejemplo en Parmley y Smith, 1988, *Gene*, 73:305-318; Fowlkes y otros, 1992, *BioTechniques*, 13:422-427; publicación PCT núm. WO94/18318, y en las referencias citadas anteriormente. Los anticuerpos identificados con unión al antígeno humano CD19 pueden ser de cualquiera de los tipos o modificaciones de los anticuerpos descritos anteriormente.

5.18.2. Selección de los anticuerpos con función efectora de ADCC humana.

Los anticuerpos de la clase IgG humana, que tienen características funcionales tales como una larga vida media en el suero y la capacidad de mediar diversas funciones efectoras se usan en ciertas modalidades de la invención (*Monoclonal Antibodies: Principles and Applications*, Wiley-Liss, Inc., Capítulo 1 (1995)). Los anticuerpos humanos de clase IgG se clasifican en las siguientes 4 subclases: IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. Un gran número de estudios se llevan a cabo para la ADCC y la CDC como funciones efectoras de los anticuerpos de clase IgG, y se informó que entre los anticuerpos de la clase IgG humana, la subclase IgG1 tiene la mayor actividad ADCC y CDC en humanos (*Chemical Immunology*, 65, 88 (1997)).

La expresión de la actividad ADCC y la actividad CDC por los anticuerpos de la subclase IgG1 humana en general involucra la unión de la región Fc del anticuerpo a un receptor para un anticuerpo (en lo sucesivo como "FcγR") existente en la superficie de las células efectoras tales como las células asesinas, las células asesinas naturales o los macrófagos activados. Pueden enlazarse varios componentes del complemento. En cuanto a la unión, se sugiere que varios residuos de aminoácidos en la región de bisagra y el segundo dominio de la región C (en lo sucesivo como "dominio Cγ2 ") del anticuerpo son importantes (*Eur. J. Immunol.*, 23, 1098 (1993), *Immunology*, 86, 319 (1995), *Chemical Immunology*, 65, 88 (1997)) y que una cadena de azúcar en el dominio Cγ2 (*Chemical Immunology*, 65, 88 (1997)) también es importante.

Los anticuerpos anti-CD19 pueden modificarse con respecto a la función efectora, por ejemplo, con el fin de mejorar la ADCC y/o la citotoxicidad del anticuerpo dependiente del complemento (CDC). Esto puede lograrse mediante la introducción de una o más sustituciones de aminoácidos en la región Fc de un anticuerpo. También puede introducirse un residuo de cisteína(s) en la región Fc, lo que permite la formación de un enlace disulfuro intercatenar en esta región. De esta manera puede generarse un anticuerpo homodimérico que puede tener una mayor capacidad de internalización y una muerte celular mediada por el complemento y ADCC incrementadas (Caron y otros, J. Exp. Med. 176:1191-1195 (1992) y Shopes, J. Immunol., 148:2918-2922 (1992)). También pueden usarse enlazadores heterobifuncionales para generar anticuerpos homodiméricos con mayor actividad anti-tumoral (Wolff y otros, Cancer Research, 53:2560-2565 (1993)). Los anticuerpos también pueden diseñarse para tener dos o más regiones Fc lo que resulta una capacidad mejorada para la lisis por complemento y la ADCC (Stevenson y otros, Anti-Cancer Drug Design, (3) 219-230 (1989)).

Se conocen en la materia otros métodos de ingeniería de regiones Fc de anticuerpos con el fin de alterar las funciones efectoras (por ejemplo, la publicación de patente de los Estados Unidos núm. 20040185045 y la publicación PCT núm. WO 2004/016750, ambas de Koenig y otros, las cuales describen la alteración de la región Fc para mejorar la afinidad de unión de Fc al Fc γ RIIB en comparación con la afinidad de unión para el Fc γ RIIA; ver también la publicación PCT núm. WO 99/58572 de Armour y otros, WO 99/51642 de Idusogie y otros, y US 6,395,272 de Deo y otros. También se conocen en la materia métodos para modificar la región Fc para disminuir la afinidad de unión al Fc γ RIIB (por ejemplo, la publicación de patente de los Estados Unidos núm. 20010036459 y la publicación PCT núm. WO 01/79299, ambas de Ravetch y otros). También se describieron anticuerpos modificados que tienen regiones Fc variantes con una mayor afinidad de unión por Fc γ RIIA y/o Fc γ RIIB en comparación con una región Fc de tipo salvaje (por ejemplo, la publicación PCT núm. WO2004/063351, de Stavenhagen y otros).

Se encontraron al menos cuatro tipos diferentes de Fc γ R que se denominan respectivamente, Fc γ RI (CD64), Fc γ RII (CD32), Fc γ RIII (CD16), y Fc γ RIV. En humanos, los Fc γ RII y Fc γ RIII se clasifican en Fc γ RIIA y Fc γ RIIB, y Fc γ RIIIa y Fc γ RIIIb, respectivamente. El Fc γ R es una proteína de membrana que pertenece a la superfamilia de las inmunoglobulinas, Fc γ RII, Fc γ RIII, y Fc γ RIV tienen una cadena α que tiene una región extracelular que contiene dos dominios del tipo inmunoglobulina, el Fc γ RI tiene una cadena α con una región extracelular que contiene tres dominios de tipo inmunoglobulina, como un componente constitutivo, y la cadena α está implicada en la actividad de unión de la IgG. Además, Fc γ RI y Fc γ RIII tienen una cadena γ o ζ como un componente constitutivo la cual tiene una función de transducción de señales en asociación con la cadena α (Annu. Rev. Immunol., 18, 709 (2000) , Annu. Rev. Immunol., 19, 275 (2001)). El Fc γ RIV se describió por Bruhns y otros, Clin. Inves., Med., (Canadá) 27:3 D (2004).

Para evaluar la actividad ADCC de un anticuerpo anti-CD19 de interés, puede usarse un ensayo *in vitro* de la ADCC, tal como el que se describe en las patentes de los Estados Unidos núms. 5,500,362 ó 5,821,337. El ensayo también puede realizarse por medio del uso de un kit disponible comercialmente, por ejemplo CytoTox 96[®] (Promega). Las células efectoras útiles para tales ensayos incluyen, pero no se limitan a las células mononucleares de sangre periférica (PBMC), las células asesinas naturales (NK), y las líneas de células NK. También pueden servir como células efectoras las líneas celulares de NK que expresan un receptor de Fc transgénico (por ejemplo CD16) y el polipéptido de señalización asociado (por ejemplo, el FC ϵ RI- γ) (ver, por ejemplo el documento WO 2006/023148 A2 de Campbell). Por ejemplo, puede probarse la capacidad de cualquier anticuerpo particular para mediar la lisis de la célula diana por la activación del complemento y/o la ADCC. Las células de interés se cultivan y marcan *in vitro*; el anticuerpo se añade al cultivo celular en combinación con las células inmunes que pueden activarse por los complejos antígeno-anticuerpo; es decir, las células efectoras implicadas en la respuesta ADCC. El anticuerpo también puede probarse para la activación del complemento. En cualquier caso, la citólisis de las células diana se detecta por la liberación de la marca de las células lisadas. El grado de lisis de la célula diana también puede determinarse mediante la detección de la liberación de proteínas citoplasmáticas (por ejemplo LDH) en el sobrenadante. De hecho, los anticuerpos pueden seleccionarse por medio del uso de suero del propio paciente como una fuente de complemento y/o células del sistema inmune. Los anticuerpos que son capaces de mediar la ADCC humana en el ensayo *in vitro* pueden usarse terapéuticamente en ese paciente en particular. La actividad ADCC de la molécula de interés también puede evaluarse *in vivo*, por ejemplo, en un modelo animal tal como el descrito en Clynes y otros, Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos 95:652-656 (1998). Además, las técnicas para modular (es decir, aumentar o disminuir) el nivel de la ADCC, y opcionalmente de la actividad CDC, de un anticuerpo son bien conocidos en la materia. Ver, por ejemplo, la patente de los Estados Unidos núm. 6,194,551. Los anticuerpos de la presente invención pueden ser capaces o pueden modificarse para tener la capacidad de inducir la ADCC y/o la CDC. Los ensayos para determinar la función ADCC pueden practicarse por medio del uso de células efectoras humanas para evaluar la función ADCC humana. Estos ensayos también pueden incluir los destinados a la detección de anticuerpos que inducen, median, mejoran, bloquean la muerte celular por mecanismos de necrosis y/o apoptosis. Tales métodos que incluyen ensayos que usan tintes viables, métodos de detección y análisis de caspasas, y ensayos de medición de la rotura del ADN pueden usarse para evaluar la actividad apoptótica de las células cultivadas *in vitro* con un anticuerpo anti-CD19 de interés.

Por ejemplo, los ensayos de Anexina V o de marcaje de extremos truncados por dUTP mediado por TdT (TUNEL) pueden llevarse a cabo como se describe en Decker y otros, Blood (Estados Unidos) 103:2718-2725 (2004) para detectar la actividad apoptótica. El ensayo de TUNEL implica cultivar la célula de interés con dUTP marcado con fluoresceína para su incorporación en las roturas de la cadena de ADN. Las células se procesan entonces para su análisis por citometría de flujo. El ensayo de Anexina V detecta la aparición de fosfatidilserina (PS) en el exterior de la membrana plasmática de las células apoptóticas por medio del uso de un conjugado con Anexina V conjugada a fluoresceína que reconoce específicamente las moléculas de PS expuestas. Al mismo tiempo, un colorante viable tal como yoduro de propidio puede usarse para excluir células apoptóticas tardías. Las células se tiñen con la Annexin V marcada y se analizan por citometría de flujo.

5.18.3. Inmunoconjugados y proteínas de fusión

Los agentes terapéuticos o toxinas pueden conjugarse a anticuerpos anti-CD19 humanizados para su uso en composiciones y métodos de la invención. Estos conjugados pueden generarse como proteínas de fusión. Los ejemplos de agentes terapéuticos y toxinas incluyen, pero no se limitan a, los miembros de la familia de las moléculas enedina, tales como caliceamicina y esperamicina. Las toxinas químicas también pueden tomarse del grupo que consiste de duocarmicina (ver, por ejemplo, la patente de los Estados Unidos núm. 5,703,080, la patente de los Estados Unidos núm. 4,923,990), el metotrexato, la doxorubicina, el melfalan, el clorambucil, el ARA-C, la vindesina, la mitomicina C, el cisplatino, el etopósido, la bleomicina y el 5-fluorouracilo. Los ejemplos de agentes quimioterapéuticos también incluyen la adriamicina, la doxorubicina, el 5-fluorouracilo, el arabinósido de citosina (Ara-C), la ciclofosfamida, el tiotepa, el taxotere (docetaxel), el busulfán, la citoxina, el Taxol, el metotrexato, el cisplatino, el melfalán, la vinblastina, la bleomicina, el etopósido, la ifosfamida, la mitomicina C, la mitoxantrona, la vincristina, la vinorelbina, el carboplatino, el tenipósido, la daunomicina, la carminomicina, la aminopterina, la dactinomicina, las mitomicinas, las esperamicinas (ver, la patente de los Estados Unidos núm. 4,675,187), el melfalán y otras mostazas relacionadas con nitrógeno.

Los anticuerpos anti-CD19 pueden conjugarse a un agente citostático, citotóxico o inmunosupresor en el que el agente citostático se selecciona del grupo constituido por un enedin, un lexitropsin, un duocarmicin, un taxano, una puomicina, una dolastatina, un maitansinoide, y un alcaloide de la vinca. En ciertas modalidades, más específicas, el agente citotóxico es el paclitaxel, el docetaxel, el CC-1065, el SN-38, el topotecan, el morfolino-doxorrubicina, la rizoxina, la cianomorfolino-doxorrubicina, la dolastatina 10, la ecinomicina, la combretastatina, la caliceamicina, la maitansina, el DM-1, la auristatina E, la AEB, la AEVB, la AEFP, la MMAE (ver, en la solicitud de patente de los Estados Unidos núm. 10/983, 340), o el netropsin.

El agente citotóxico de un conjugado anticuerpo anti-CD19-agente citotóxico de la invención puede ser un agente anti-tubulina. El agente citotóxico puede seleccionarse del grupo que consiste de un alcaloide de la vinca, un lotoxin podofil, un taxano, un derivado de bacatina, un criptofisin, un maitansinoide, una combretastatina, y una dolastatina. El agente citotóxico puede ser la vincristina, la vinblastina, la vindesina, la vinorelbina, la VP-16, la camptotecina, el paclitaxel, el docetaxel, la epitilona A, la epitilona B, el nocodazol, la coichicina, la colcimida, la estramustina, la cemadotina, la discodermolida, la maitansina, el DM-1, el AEFP, la auristatina E, la AEB, la AEVB, la AEFP, la MMAE o el eleuterobin.

Un anticuerpo anti-CD19 puede conjugarse con el agente citotóxico a través de un enlazador, donde el enlazador es un péptido enlazador. Un anticuerpo anti-CD19 puede conjugarse con el agente citotóxico a través del enlazador, donde el enlazador es un enlazador phe-lys, un enlazador hidrazona, o un enlazador de disulfuro.

El anticuerpo anti-CD19 de un conjugado anti-CD19-agente citotóxico puede conjugarse al agente citotóxico mediante un enlazador, donde el enlazador es hidrolizable a pH menor de 5.5. El enlazador puede ser hidrolizable a un pH menor de 5.0.

El anticuerpo anti-CD19 de un conjugado anti-CD19-agente citotóxico puede conjugarse al agente citotóxico mediante un enlazador, donde el enlazador es escindible por una proteasa. La proteasa puede ser una proteasa lisosomal. La proteasa puede ser, entre otras, una proteasa asociada a la membrana, una proteasa intracelular, o una proteasa endosomal.

Otras toxinas que pueden usarse en inmunoconjugados de la invención incluyen lectinas venenosas, toxinas de plantas tales como la ricina, la abrina, la modicina, la botulínica, y las toxinas diftéricas. Por supuesto, combinaciones de las diversas toxinas también pueden acoplarse a una molécula de anticuerpo, y se logra de esta forma una citotoxicidad variable. Los ejemplos ilustrativos de las toxinas que se emplean adecuadamente en terapias de combinación de la invención son la ricina, la abrina, la ribonucleasa, la ADNasa I, las enterotoxinas estafilocócicas-A, la hierba carmín, la anti-proteína viral, la gelonina, la toxina difterina, la exotoxina de Pseudomonas, y la endotoxina de Pseudomonas, ver, por ejemplo, Pastan y otros, Cell, 47:641 (1986) y Goldenberg y otros, Cancer Journal for Clinicians, 44:43 (1994). Las toxinas enzimáticamente activas y fragmentos de éstas que pueden usarse incluyen la cadena A de la difteria, los

fragmentos activo de no-unión de la toxina diftérica, la cadena A de la exotoxina (de *Pseudomonas aeruginosa*), la cadena A de la ricina, la cadena A de la abrina, la cadena A de la modicina, la alfa-sarcin, las proteínas de *Aleurites fordii*, las proteínas de diantina, las proteínas de *Phytolaca american* (PAPI, PAPII, y PAPS), el inhibidor de la *Momordica charantia*, la curcina, el crotino, el inhibidor de la *Sapaonaria officinalis*, la gelonina, la mitogelina, la restrictocina, la fenomicina, la enomicina y los tricotecenos, ver, por ejemplo, el documento WO 93/21232 publicado el 28 de octubre de 1993.

Las toxinas y los agentes quimioterapéuticos adecuados se describen en Remington's Pharmaceutical Sciences, 19^{na} Ed. (Mack Publishing Co. 1995), y en Goodman y Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics 7^{ma} Ed. (MacMillan Publishing Co. 1985). Aquellos con experiencia en la materia conocen otras toxinas adecuadas y/o agentes quimioterapéuticos.

La presente invención además abarca anticuerpos (lo que incluye fragmentos de anticuerpo o variantes de los mismos) que comprenden o se conjugan con un agente radioactivo adecuado para fines de diagnóstico. Los ejemplos de materiales radiactivos adecuados incluyen, pero no se limitan a, yodo (.sup.121I, .sup.123I, .sup.125I, .sup.131I), carbono (.sup.14C), azufre (.sup. 35S), tritio (.sup. 3H), indio (.sup. 111In, .sup.112In, .sup.113mIn, .sup.115mIn), tecnecio (.sup. 99Tc, .sup. 99mTc), talio (.sup. 201Tl), galio (.sup. 68Ga, .sup.67Ga), paladio (.sup.103Pd), molibdeno (.sup. 99Mo), xenón (.sup. 135Xe), flúor (.sup. 18F), .sup.153Sm, .sup.177Lu, .sup.159Gd, .sup.149Pm, .sup.140La, .sup.175Yb, .sup.166Ho, .sup. 90Y, .sup.47Sc, .sup.186Re, .sup.188Re, .sup.142Pr, .sup.105Rh, y .sup.97Ru.

Adicionalmente, un anticuerpo anti-CD19 de la invención (se incluye un scFv u otras moléculas que comprenden, o, alternativamente, consisten de, fragmentos de anticuerpos o variantes de éstos), puede acoplarse o conjugarse con un ion metálico radiactivo que se usa para fines terapéuticos. Los ejemplos adecuados de iones radiactivos incluyen, pero no se limitan a, los emisores alfa tales como .sup.213Bi u otros radioisótopos tales como, .sup.103Pd, .sup.135Xe, .sup.131I, .sup.68Ge, .sup.57Co, .sup.65Zn, .sup.85Sr, .sup.32p, .sup.35S, .sup. 90Y, .sup.153Sm, .sup.153Gd, .sup.169Yb, .sup.51Cr, .sup.54mn, .sup.75Se, .sup.113Sn, .sup.90Y, .sup.117Tm, .sup.186Re, .sup.188Re y, .sup.166Ho. Un anticuerpo o fragmento de éste puede unirse a quelantes macrocíclicos que quelan iones radiometálicos, que incluyen pero no se limitan al .sup.177Lu, .sup.90Y, .sup.166Ho, y .sup.153Sm, a polipéptidos. El quelato macrocíclico puede ser ácido 1,4,7,10-tetraaza-ciclododecano N,N',N'',N''' tetracético (DOTA). El DOTA puede unirse al anticuerpo de la invención o fragmentos de éste a través de un enlazador. Los ejemplos de enlazadores útiles para conjugar DOTA a un polipéptido se conocen comúnmente por aquellos con experiencia en la materia, ver, por ejemplo, DeNardo y otros, Clin. Cancer Res., 4 (10) :2483-90; 1998, Peterson y otros, Bioconjug. Chem., 10 (4):553-7, 1999 y Zimmerman y otros, Nucl. Med. Biol, 26(8):943-50, 1999.

Un anticuerpo anti-CD19 de la presente invención también puede usarse en ADEPT por la conjugación del anticuerpo a una enzima activadora de profármaco, la cual convierte el profármaco (por ejemplo, un agente quimioterapéutico peptidilo, ver, WO81/01145) en un fármaco anti-cáncer activo. Ver, por ejemplo, WO 88/07378 y la patente de los Estados Unidos núm. 4,975,278. El componente enzimático del inmunoconjugado útil para ADEPT incluye cualquier enzima capaz de actuar sobre un profármaco de forma que la convierte a su forma citotóxica más activa.

Las enzimas que son útiles incluyen, pero no se limitan a, la fosfatasa alcalina útil para convertir profármacos que contienen fosfato en fármacos libres, la arilsulfatasa útil para convertir profármacos que contienen sulfato en fármacos libres; citosina desaminasa útil para convertir la 5-fluorocitosina no tóxica en el fármaco anti-cáncer 5-fluorouracilo; las proteasas, tales como la proteasa serratina, la termolisina, la subtilisina, las carboxipeptidasas y las cathepsinas (tales como la cathepsinas B y L), que son útiles para convertir profármacos que contienen péptido en fármacos libres; las D-alanilcarboxipeptidasas, útiles para convertir profármacos que contienen sustituyentes de D-aminoácidos; las enzimas que escinden carbohidratos tales como la β -galactosidasa y la neuraminidasa útiles para convertir profármacos glicosilados en fármacos libres; la β -lactamasa útil para la conversión de fármacos derivatizados con α -lactámicos en fármacos libres, y la penicilina amidasa, tales como la penicilina V amidasa o la penicilina G amida, útiles para convertir fármacos derivatizados a sus nitrógenos amínicos con fenoxiacetilo o fenilacetilo, respectivamente, en fármacos libres. Los anticuerpos con actividad enzimática, también conocidos en la materia como "aczimas", pueden usarse también para convertir los profármacos en fármacos activos libres (ver, por ejemplo, Massey, Nature 328:457-458 (1987)). Los conjugados anticuerpo-aczima pueden prepararse como se describe en la presente para la entrega de la aczima como se desee a las partes de un humano afectadas por un tumor maligno de células B.

Los anticuerpos de esta invención pueden unirse covalentemente a las enzimas por técnicas bien conocidas en la materia tales como el uso de los reactivos heterobifuncionales entrelazantes discutidos anteriormente. Las proteínas de fusión que comprenden al menos la región de unión al antígeno del anticuerpo anti-CD19 ligada a al menos una porción funcionalmente activa de una enzima pueden construirse por medio del uso de las técnicas de ADN recombinante bien conocidas en la materia (ver, por ejemplo, Neuberger y otros, Nature, 312:604-608 (1984)).

Las modificaciones covalentes de un anticuerpo anti-CD19 se incluyen dentro del alcance de esta invención. Pueden hacerse por síntesis química o por escisión enzimática o química del anticuerpo, si es aplicable. Otros tipos de modificaciones covalentes de un anticuerpo anti-CD19 se introducen en la molécula al hacer reaccionar los residuos de aminoácidos diana con un agente orgánico de derivatización que es capaz de reaccionar con cadenas laterales seleccionadas o con los residuos N- o C- terminales.

Los residuos cisteinilo reaccionan comúnmente con α -haloacetatos (y las aminas correspondientes), tales como ácido cloroacético o cloroacetamida, para rendir derivados carboximetilo o carboxiamidometilo. De manera similar, también pueden usarse reactivos de yodo. Los residuos cisteinilo también se derivatizan por reacción con bromotrifluoroacetona, ácido α -bromo- β -(5-imidozilo)propiónico, fosfato de cloroacetilo, N-alquilmaleimidas, disulfuro de 3-nitro-2-piridilo, 2-metilpiridil disulfuro, p-cloromercuribenzoato, 2-cloromercuri-4-nitrofenol, o cloro-7-nitrobenzoico-2-oxa-1,3-diazol.

Los residuos histidilo se derivatizan por reacción con el dietilpirocarbonato a pH 5.5-7.0 ya que este agente es relativamente específico para la cadena lateral de histidilo. El bromuro de para-bromofenacilo es útil también; la reacción puede realizarse en cacodilato sódico 0.1 M a pH 6.0.

Los residuos de lisilo y los amino-terminales reaccionan con anhídridos de ácido succínico o carboxílico. La derivatización de estos agentes tiene el efecto de revertir la carga de los residuos lisinilo. Otros reactivos adecuados para derivatizar los residuos que contienen α -amino y/o residuos que contienen ε -amino incluyen imidoésteres tales como el picolinimidato de metilo, el fosfato de piridoxal, el piridoxal, el cloroborohidruro, el ácido trinitrobenzenosulfónico, la O-metilisourea, la 2,4 pentanodiona, y la reacción con glioxilato catalizada por la transaminasa.

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

La modificación específica de los residuos tirosilo puede hacerse, con interés particular en la introducción de marcadores espectrales en los residuos de tirosilo por reacción con compuestos de diazonio aromáticos o tetranitrometano. Más comúnmente, N-acetilimidizol y tetranitrometano se usan para formar las especies O-acetil tirosilo y derivados 3-nitro, respectivamente. Los residuos tirosilo se yodan por medio del uso de ^{125}I o ^{131}I para preparar proteínas marcadas para su uso en radioinmunoensayos.

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

Los residuos glutaminilo y asparaginilo están frecuentemente deamidados a los correspondientes residuos aspartilo y glutamilo, respectivamente. Estos residuos se desamidán en condiciones neutras o básicas. La forma desamidada de estos residuos cae dentro del alcance de esta invención.

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

Otro tipo de modificación covalente implica acoplar químicamente o enzimáticamente glicósidos al anticuerpo. Estos procedimientos son ventajosos ya que no requieren la producción del anticuerpo en una célula hospedera con capacidades para N- u O- glicosilaciones. En dependencia del modo de acoplamiento que se usa, el azúcar(s) puede unirse a (a) arginina e histidina, (b) grupos carboxilo libres, (c) grupos sulfhidrilo libres de cisteína tales como los de la cisteína (d) grupos hidroxilo libres tales como los de serina, treonina, o hidroxiprolina, (e) residuos aromáticos tales como los de la fenilalanina, tirosina, triptófano, o (f) el grupo amida de la glutamina. Estos métodos se describen en WO87/05330 publicado el 11 de septiembre de 1987, y en Aplin y Wriston, CRC Crit. Rev. Biochem., pp, 259-306 (1981).

5.19. Combinaciones quimioterapéuticas

Un AcM anti-CD19 puede administrarse en combinación con uno o más agentes quimioterapéuticos adicionales. Por ejemplo, "CVB" (ciclofosfamida 1.5 g/m², etopósido 200-400 mg/m², y carmustina 150-200 mg/m²) pueden usarse en las terapias de combinación de la invención. CVB es un tratamiento que se usa para tratar el linfoma no Hodgkin (Patti y otros, Eur. J. Haematol, 51:18 (1993)). Aquellos con experiencia en la materia conocen bien otros regímenes de

combinación de quimioterapéuticos adecuados. Ver, por ejemplo, Freedman y otros, "No-Hodgkin Linfomas", en Cancer Medicine, Volumen 2, 3ra edición, Holland y otros, (Eds.), pp 2028-2068 (Lea & Febiger 1993). Como un ejemplo, los regímenes quimioterapéuticos de primera generación para el tratamiento de los linfomas no Hodgkin de grado intermedio incluyen C-MOPP (ciclofosfamida, vincristina, procarbazona y prednisona) y CHOP (ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina y prednisona). Un régimen quimioterapéutico de quimioterapia de segunda generación útil es m-BACOD (metotrexato, bleomicina, doxorubicina, ciclofosfamida, vincristina, dexametasona y leucovorina), mientras que el régimen de tercera generación adecuado es MACOP-B (metotrexato, doxorubicina, ciclofosfamida, vincristina, prednisona, bleomicina y leucovorina). Otros fármacos útiles adicionales incluyen fenil butirato y brostatin-1.

El cáncer o uno o más síntomas del mismo pueden prevenirse, tratarse, manejarse o mejorarse mediante la administración de un AcM anti-CD19 en combinación con la administración de uno o más tratamientos tales como, pero no limitados a, las quimioterapias, radioterapias, tratamientos hormonales, y/o terapias/inmunoterapias biológicas.

Un anticuerpo de la invención puede usarse en un tratamiento que comprende el uso de uno o más antagonistas de la angiogénesis tales como, pero que no se limitan a: la angiostatina (fragmento del plasminógeno), la antitrombina III antiangiogénica; la angiozima; el ABT-627; el Bay 12-9566; el Benefin; el bevacizumab; el BMS-275291; el inhibidor derivado de cartílago (CDI); el CAI; el fragmento de complemento CD59; el PAC-7055; el Col 3; la combretastatina A-4; la endostatina (fragmento de colágeno XVIII); el fragmento de fibronectina; la Gro-beta; la halofuginona; las heparinasas; el fragmento de heparina el hexasacárido; el HMV833; la gonadotropina coriónica humana (hCG); el IM-862; el interferón alfa/beta/gamma; la proteína inducible por interferón (IP-10); la interleucina-12; la Krigle 5 (fragmento del plasminógeno); el Marimastat; los inhibidores de las metaloproteinasas (TIMP); el 2-metoxiestradiol; el MMI 270 (CGS 27023A); el AcM IMC-1C11; el Neovastat; el NM-3; el Panzem; el PI-88; el inhibidor de la ribonucleasa de placenta; el inhibidor del activador de plasminógeno; el factor plaquetario 4 (PF4) el Prinomastat; el fragmento de 16kD de la prolactina; las proteínas relacionadas con la proliferina (PRP); la PTK 787/ZK 222594; los retinoides; el Solimastat; la escualamina; el SS 3304; el SU 5416; el SU6668; el SU11248; el tetrahidrocortisol-S; el tetratiomolibdato; la talidomida; la trombospodina-1 (TSP-1); el TNP-470; el factor de crecimiento transformante-beta (TGF- β); la Vasculostatina; la Vasostatina (fragmento calreticulina); el ZD6126; el ZD 6474; los inhibidores de la farnesil transferasa (FTI); y los bifosfonatos (tales como pero que no se limitan a, el alendronato, clodronato, etidronato, ibandronato, pamidronato, risedronato, tiludronato, y zoledronato).

Un anticuerpo de la invención puede usarse en el tratamiento que abarca el uso de uno o más agentes inmunomoduladores, tales como pero no limitados a, los agentes quimioterapéuticos y los agentes inmunomoduladores no quimioterapéuticos. Los ejemplos no limitantes de agentes quimioterápicos incluyen el metotrexato, la ciclosporina A, la leflunomida, el cisplatino, la ifosfamida, los taxanos tales como el taxol y el paclitaxol, los inhibidores de la topoisomerasa I (por ejemplo, el CPT-11, el topotecan, el 9-CA, y el GG-211), la gemcitabina, la vinorelbina, el oxaliplatino, el 5-fluorouracilo (5-FU), la leucovorina, la vinorelbina, el Temodal, la citocalasina B, la gramicidina D, la emetina, la mitomicina, el etopósido, el tenoposido, la vincristina, la vinblastina, la colchicina, la doxorubicina, la daunorubicina, el dihidroxi antracina dione, la mitoxantrona, la mitramicina, la actinomicina D, la 1-dehidrotestosterona, los glucocorticoides, la procaina, la tetracaina, la lidocaína, el propranolol, y homólogos de puromicina y citoxan. Los ejemplos de agentes inmunomoduladores no quimioterápicos incluyen, pero no se limitan a, los anticuerpos anti-receptor de células T (por ejemplo, anticuerpos anti-CD4 (por ejemplo, el cMT412 (Boeinger), el IDEC-CE9.1[®] (IDEC y SKB), el AcM 4162W94, Orthoclone y el OKTcdr4a (Janssen-Cilag)), los anticuerpos anti-CD3 (por ejemplo, Nuviron (Product Design Labs), el OKT3 (Johnson & Johnson), o el Rituxan (IDEC)), los anticuerpos anti-CD5 (por ejemplo, un inmunoconjugado de un anti-CD5 unido a ricina), los anticuerpos anti-CD7 (por ejemplo, el CHH-380 (Novartis)), los anticuerpos anti-CD8, los anticuerpos monoclonales del ligando anti-CD40 (por ejemplo, el IDEC-131 (IDEC)), el anticuerpo anti-CD52 (por ejemplo, Campath 1H (Ilex)), los anticuerpos anti-CD2 (por ejemplo, el MEDI-507 (MedImmune, Inc., publicación internacional núm. WO 02/098370 y WO 02/069904), los anticuerpos anti-CD11a (por ejemplo, Xanelim (Genentech)), y los anticuerpos anti-B7 (por ejemplo, el IDEC-114) (IDEC)); los anticuerpos contra los receptores de citocinas (por ejemplo, los anticuerpos anti-receptor de IFN, los anticuerpos anti-receptor de IL-2 (por ejemplo, el Zenapax (Protein Design Labs)), los anticuerpos anti-receptor de IL-4, los anticuerpos anti-receptores de IL-6, los anticuerpos anti-receptor de IL-10, los anticuerpos anti-receptor de IL-12), los anticuerpos anti-citocinas (por ejemplo, los anticuerpos anti-IFN, los anticuerpos anti-TNF- α , los anticuerpos anti-IL-1 β , los anticuerpos anti-IL-6, los anticuerpos anti-IL-8 (por ejemplo, el ABX-IL-8 (Abgenix)), los anticuerpos anti-IL-12 y los anticuerpos anti-IL-23)); el CTLA4-inmunoglobulina; el LFA-3TIP (Biogen, publicación internacional núm. WO93/08656 y la patente de los Estados Unidos núm. 6,162,432); los receptores de citoquinas solubles (por ejemplo, el dominio extracelular de un receptor de TNF- α o un fragmento de éste, el dominio extracelular de un receptor de IL-1 β o un fragmento de éste, y el dominio extracelular de un receptor de IL-6 o un fragmento de éste); las citocinas o los fragmentos de éstos (por ejemplo, la interleucina (IL) -2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL -8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-15, IL-23, el TNF- α , el TNF- β , interferón (IFN)- α , IFN- β , el IFN- γ , y el GM-CSF), y los anticuerpos anti-citoquinas (por ejemplo, los anticuerpos anti-IL-2, los anticuerpos anti-IL-4, los anticuerpos anti-IL-6, los anticuerpos anti-IL-10, los anticuerpos anti-IL-12, los anticuerpos anti-IL-15, los anticuerpos anti-TNF- α y los anticuerpos anti-IFN- γ), y los anticuerpos que inmunoespecíficamente se unen a los antígenos

asociados a tumores (por ejemplo, Herceptin®). En ciertas modalidades, un agente inmunomodulador es un agente inmunomodulador que no es un agente quimioterapéutico. En otras modalidades un agente inmunomodulador es un agente inmunomodulador que no es una citoquina o un factor hemapoietico tal como la IL-1, IL-2, IL-4, IL-12, IL-15, el TNF, IFN- α , IFN- β , IFN- γ , M-CSF, G-CSF, IL-3 o eritropoyetina. En otras modalidades, un agente inmunomodulador es un agente que no es un agente quimioterapéutico, una citoquina o un factor hemapoietico.

La invención puede abarcar el uso de uno o más agentes anti-inflamatorios, tales como, pero que no se limitan a, los fármacos anti-inflamatorios no esteroideos (AINE), los fármacos anti-inflamatorios esteroideos, los agonistas beta, los agentes anticolinérgicos y las metil xantinas. Algunos ejemplos de AINE incluyen, pero no se limitan a, la aspirina, el ibuprofeno, el celecoxib (Celebrex™), el diclofenaco (Voltaren™), el etodolaco (Lodine™), el fenoprofeno (Nalfon™), la indometacina (Indocin™), el ketoralac (Toradol™), la oxaprozina (Daypro™), la nabumentona (Relafen™), el sulindac (Clinoril™), el tolmentin (Tolectin™), el rofecoxib (Vioxx™), el naproxeno (Aleve™, Naprosyn™), el cetoprofeno (Actron™) y la nabumetona (Relafen™). Tales AINE funcionan mediante la inhibición de la enzima ciclooxigenasa (por ejemplo, la COX-1 y/o COX-2). Los ejemplos de fármacos anti-inflamatorios no esteroideos incluyen, pero no se limitan a, los glucocorticoides, la dexametasona (Decadron™), la cortisona, la hidrocortisona, la prednisona (Deltasone™), la prednisolona, la triamcinolona, la azulfidina, y la eicosanoides como las prostaglandinas, los tromboxanos y los leucotrienos.

Un anticuerpo de la invención puede usarse en un tratamiento que comprende el uso de uno o más agentes antivirales (por ejemplo, la amantadina, la ribavirina, la rimantadina, el aciclovir, el famciclovir, el foscarnet, el ganciclovir, la trifluridina, la vidarabina, la didanosina, la estavudina, la zalcitabina, la zidovudina, el interferón), los antibióticos (por ejemplo, la dactinomicina (antes actinomicina), la bleomicina, la mitramicina, y la antramizina (AMC)), los antieméticos (por ejemplo, el alprazolam, la dexametasona, la domperidona, el dronabinol, el droperidol, el granisetron, el haloperidol, el lorazepam, la metilprednisolona, la metoclopramida, la nabilona, el ondansetrón, la proclorperazina), los antifúngicos (por ejemplo, la anfotericina, el clotrimazol, el econazol, el fluconazol, la flucitosina, la griseofulvina, el itraconazol, el ketoconazol, el miconazol y la nistatina), los agentes antiparasitarios (por ejemplo, la dehidroemetina, el furoato de diloxanida, la emetina, la mefloquina, el melarsoprol, el metronidazol, el nifurtimox, la paromomicina, la pentabidina, el isetionato de pentamidina, la primaquina, la quinacrina, la quinidina) o una combinación de éstos.

Los ejemplos específicos de agentes anticancerígenos que pueden usarse en diversas modalidades de la invención, lo que incluye las composiciones farmacéuticas y las formas de dosificación y los kits, pero no se limitan a: la acivicin; la aclarubicin; el hidrocloreto de acodazol; la acronina; la adozelesina; la aldesleucina; la altretamina; la ambomicina; el acetato de ametantrona; la aminoglutetimidina; la amsacrina; el anastrozol; la antramizina, la asparaginasa, el asperlin; la azacitidina; la azetepa; la azotomicina; el batimastat; el benzodepa; la bicalutamida; el hidrocloreto de bisantreno; el dimesilato de bisnafide; el bizelesin; el sulfato de bleomicina; el brequinar sódico; la bropirimina, el busulfán, la cactinomicina; la calusterona; la caracemida; el carbetímero, el carboplatino, la carmustina, el hidrocloreto de carubicin; el carzelesin; el cedefingol; el clorambucilo; la cirolemicina, el cisplatino, la cladribina, el mesilato de crisnatol, la ciclofosfamida, la citarabina, la dacarbazina, la dactinomicina, el mesilato de dezaguanina; el hidrocloreto de daunorubicina; la decitabina; el dexormaplatino; la dezaguanina; el mesilato de dezaguanina; la diazicuona, el docetaxel, la doxorubicina, el hidrocloreto de doxorubicina; el droloxifeno; el citrato de droloxifeno; el propionato de dromostanolona; la duazomicina; el edatrexato; el hidrocloreto de eflornitina; la elsamitrucina; el enloplatin; el enpromate; la epipropidina; el hidrocloreto de epirubicina; el erbulozol; el clorhidrato de esorubicin; el estoprin; el clorhidrato de fadrozol; la fazarabina; la fenretinida; la floxuridina; el fosfato de fludarabina, el fluorouracilo, la flurocitabina; la fosquidona; el sodio fostriecin; la gemcitabina; el hidrocloreto de gemcitabina; la hidroxiurea; el clorhidrato de idarubicina; la ifosfamida; la ilmofofina; la interleuquina II (lo que incluye la interleucina II recombinante, o rIL2), el interferón alfa-2a; el interferón alfa-2b; el interferón alfa-n1; el interferón alfa-N3; el interferón beta-I a, el interferón gammy-I b; el ioplatino; el clorhidrato de irinotecan; el acetato de lanreotide, el letrozol, el acetato de leuprolide, el hidrocloreto de liarozol; el sodio el lometrexol; la lomustina; el hidrocloreto de losoxantrone; el masoprocol; la maitansina; el hidrocloreto de mecloretamina, el acetato de megestrol, el acetato de melengestrol, el melfalán; el menogaril, la mercaptopurina, el metotrexato; el metotrexato de sodio; la metoprina; la meturedopa; la mitindomide; el mitocarcin; el mitocromin; la mitogillin; el mitomalcin; la mitomicina; el mitosper; el mitotano; el hidrocloreto de mitoxantrona; el ácido micofenólico; el nocodazol; la nogalamicina; el ormaplatin; el oxisuran; el paclitaxel; la pegaspargasa; la peliomicina; el pentamustin; el sulfato de peplomycin; la perfosfamida; el pipobroman; el piposulfan; el hidrocloreto de piroxantrona; la plicamicina; el plomestan; el porfímero sódico; la porfíromicina; la prednimustina; el clorhidrato de procarbazona; la puomicina; el hidrocloreto de puomicina; el pirazofurin; el riboprin; la rogletimida; el safingol; el hidrocloreto de safingol; la semustina; el simtrazen; el esparfosato de sodio; la sparsomicina; el hidrocloreto de espirogermanio; la espiromustina; el espiroplatin; el estreptonigrin; la estreptozocina; el sulofenur; la talisomicina; la tecogalan sódica; el tegafur; el hidrocloreto de teloxantrona; la temoporfina; el tenipósido; la teroxirona; la testolactona; la tiampirina; la tioguanina; el tiotepa; la tiazofurina; la tirapazamina, el citrato de toremifeno, el acetato de trestolone; el fosfato de triciribina; el trimetrexato; el trimetrexato glucuronato; la triptorelina; el hidrocloreto de tubulozol, la mostaza de uracilo; la uredepa; la vaporeotida; la verteporfina, el sulfato de vinblastina; el sulfato de vincristina, la vindesina, el sulfato de vindesina, el

sulfato de vinepidina; el sulfato de vinglicinato, el sulfato vinleurosina; el tartrato de vinorelbina, el sulfato de vinrosidina; el sulfato de vinzolidina; el vorozol; el zeniplatin; el zinostatin; el hidrocloreto de zorubicina. Otros fármacos contra el cáncer incluyen, pero no se limitan a: la 20-epi-1, 25 dihidroxivitamina D3, el 5-etiniluracilo; la abiraterona; la aclarubicina; el acil fulvene; el adecipenol; la adozelesina; la aldesleukina; los antagonistas de ALL-TK; la altretamina; la ambamustina; el Amidox; la amifostina, el ácido aminolevulínico; la amrubicina; la amsacrina; la anagrelida; el anastrozol; el andrografolide; los inhibidores de la angiogénesis; los D antagonista; los G antagonista; el elantarelix; la proteína morfogenética-1 anti-dorsalzin; el antiandrógeno, el carcinoma de próstata; el antiestrógeno; el antineoplaston, los oligonucleótidos antisentido, el afidicolin glicinato; los moduladores de genes de la apoptosis; el ácido apurínico; el ara-CDP-DL- PTBA; la arginina deaminasa; la asulacrina; el atamestano; la atrimustina; la axinastatina 1; la axinastatin 2; la axinastatin 3; el azasetron; la azatoxina; la azatirosina; los derivados de bacatina III; el balanol; el batimastat; los antagonistas de BCR/ABL; las benzoclorinas; la benzoilstaurosporina; los derivados beta-lactámicos; la beta-aletina; la beta-clamicina B; el ácido betulínico, los inhibidores de la bFGF; la bicalutamida; el bisantreno; la bisaziridinilespermina; la bisnafida; el bistrateno A; la bizelesina; el breflate; la bropirimina; el budotitano; la sulfoximina butionina; el calcipotriol; la calfofina C; los derivados de la camptotecina; la viruela del canario; la IL-2; la capecitabina; la carboxamida-amino-triazol; el carboxiamidotriazol; el CaRest M3; CARN 700; el inhibidor derivado de cartílago; el carzelesin; los inhibidores de la caseína quinasa (CICO); la castanospermina; la cecropina B; el cetorelix; el chlorlins; la sulfonamida cloroquinolaxalina; el cicaprost, la cis-porfirina, la cladribina, los análogos de clomifeno, el clotrimazol, la colismicina A; la colismicina B; la combretastatina A4; los analógicos de combretastatina; el conagenin; la crambescidina 816; el crisnatol; la criptocina 8; los derivados de la criptocina A; la curacina A; las ciclopentantraquinonas; el cicloplatan; la cipemicina; el ocfofato de citarabina; el factor citolítico; la citostatina; el dacliximab; la decitabina; la deshidrodidemina B; la deslorelinea; la dexametasona; la dexifosfamida; el dextrazoxano; el dexverapamil; la diazicuona; la didemina B; el didox; la dietilnorspermina; la dihidro-5-azacidina, la dihidrotaxol, el 9 -, dioxamicina; la difenil espiromustina; el docetaxel; el docosanol; el dolasetrón; la doxifluridina; el droloxifeno, el dronabinol, la duocarimicina SA; el ebselen; la ecomustina; la edelfosina; el edrecolomab, la efornitina, la elemena; el emitefur, la epirubicina, la epristerida; el análogo de la estramustina; los agonistas de los estrógenos, los antagonistas de los estrógenos; el etanidazol; el fosfato de etopósido, el exemestano; el Fadrozol; la fazarabina; la fenretinida, el filgrastim, la finasterida, el flavopiridol; la flezelastina; la fluasterona, la fludarabina, el hidrocloreto de fluorodaunorubicin; el forfenimex; el formestano; el fostriecin; la fotemustina; el gadolinio texapirina, el nitrato de galio; la galocitabina; el ganirelix, los inhibidores de la gelatinasa, la gemcitabina, los inhibidores de la glutatión; el hepsulfam; la heragulina; el hexametileno de bisacetamida; la hipericina, el ácido ibandrónico, la idarubicina; el idoxifeno; la idramantona; la ilmofofina; la ilomastata; las imidazoacridonas, imiquimod, los péptidos inmunoestimulantes; el inhibidor del receptor del factor de crecimiento insulínico tipo -1, los agonistas del interferón, los interferones, las interleuquinas; el iobenguano; el iododoxorubicin; el ipomeanol, 4 -; el iroplact; la irsogladina; el isobengazol; la isohomohalicondrina B; el itasetron; la jasplakinolida; el kahalalido F; el triacetato de lamelarina-N; la lanreótida; la leinamicina; el lenograstim; el sulfato de lentinan; la leptostatina; el letrozol; el factor inhibidor de la leucemia, el interferón alfa leucocitario; el leuprolide+estrógenos+progesterona; el leuporelin, el levamisol, el liarozol; los análogos lineales de la poliamina; el péptido disacárido lipofílico; los compuestos lipofílicos de platino; la lisoclinamida 7; el lobaplatin; la lombricina; el lometrexol; la lonidamina; la losoxantrona; los inhibidores de la HMG-CoA reductasa (por ejemplo, pero no limitado a, la lovastatina, la pravastatina, la fluvastatina, la simvastatina, y la atorvastatina); la loxoribina; el lurtotecan; la texapirina de lutecio; la lisofilina; los péptidos líticos; la maitansina; la manostatina A; el marimastat; el masoprocol; el maspin; los inhibidores de matrilisina, los inhibidores de metaloproteinasas de la matriz; menogaril; lam merbarona; la meterelina; la metioninasa, la metoclopramida, el inhibidor del MIF, la mifepristona, la miltefosina; la mirimostina; el ARN de doble cadena no coincidente; la mitoguazona; el mitolactol; los análogos de mitomicina; la mitonafida; el mitotoxin, el factor de crecimiento de fibroblastos-saporina; la mitoxantrona; la mofarotena; el molgramostim; el anticuerpo monoclonal, la gonadotropina coriónica humana; el monofosforil lípido A + de la pared celular de micobacterium sk; el mopidamol y el inhibidor del gen de la resistencia a múltiples fármacos; la terapia basada en el supresor de tumores múltiples I; el agente mostaza contra el cáncer; el micaperoxido B, el extracto de la pared celular de micobacterias; la miriaporona, la N-acetilidinalina, las N- benzamidas sustituidas; la nafarelinea; el nagrestip; la naloxona + pentazocina; el napavin; el nafterpin; el nartograstim; el nedaplatin; la nemorubicina; el ácido neridróico; la endopeptidasa neutral; la nilutamida; la nisamicina; los moduladores del óxido nítrico; los antioxidantes; el nitróxido de nitrellin; la O6-bencilguanina, la octreotida; la okicenona; los oligonucleótidos; la onapristona, el ondansetrón, el ondansetrón; la oracina; el inductor de citoquinas por vía oral; el ormaplatin; la osaterona; el oxaliplatino; la oxaunomicina, el paclitaxel, los análogos de paclitaxel, los derivados de paclitaxel; la palauamina; la palmitoilirizoxina; el ácido pamidróico; el panaxitriol; el panomifeno; la parabactina; la pazeliptina; la pegaspargas; la peldesina; el polisulfato sódico de pentosano; la pentostatina; el pentrozol; el perflubron; la perfosfamida; el alcohol perfílico; la fenazinomina, el fenilacetato, los inhibidores de la fosfatasa; el picibanil; el clorhidrato de pilocarpina; la pirarubicina; la piritrexima; el placetin A; el placetin B, el inhibidor del activador del plasminógeno, el complejo de platino; los compuestos de platino; los complejos de platino-triamina, el sodio porfímero; la porfíromicina, la prednisona, la propilo bis acridona; la prostaglandina J2; los inhibidores del proteasoma, el inmunomodulador basado en la proteína A, el inhibidor de la proteína quinasa C, la proteína quinasa C, las microalgas, los inhibidores de la proteína tirosina fosfatasa; los inhibidores de la fosforilasa de nucleósidos de purina; las purpurinas; la pirazoloacridina; el conjugado de hemoglobina piridoxilada con polioxitileno; los antagonistas de raf; el raltitrexed; el ramosetrón; los inhibidores de la

proteína ras farnesil transferasa, los inhibidores de ras, el inhibidor ras-GAP; la reteliptina desmetilada, el renio 186 Re etidronato; la rizoxina; los ribozimas; la retinamida RII; la rogletimida; la rogitukina; la romurtida; el roquinimex; la rubiginona B1; el ruboxil; el safingol; el saintopin; el SarCNU; el sarcófitol A; la sargramostima; los Sdi 1 miméticos; la emustina; el inhibidor 1 derivado de la senescencia; los oligonucleótidos directos, los inhibidores de transducción de señales, los moduladores de la transducción de señales; el antígeno de simple cadena de unión a proteína; el sizofirán; el sobuzoxano; el borocaptato de sodio; el fenilacetato de sodio; el solverol; las proteínas de unión a la somatomedina; el sonermin, el ácido sparfósico; la spicamicina D; la espiromustina; la esplenopentina; la espongistatina 1; la escualamina, el inhibidor de las células madre, los inhibidores de la división de las células madre; la estiapiamida; los inhibidores de la estromelisina; la sulfinosina; el antagonista del péptido intestinal vasoactivo superactivo; la suradista; la suramina; la suainsonina; los glicosaminoglicanos sintéticos; la talimustina; el metioduro de tamoxifeno; la tauomustina; el tazaroteno; el sodio tecogalan; el tegafur; el telurapirilium, los inhibidores de la telomerasa, la temoporquina, la temozolomida, el tenipósido; el tetraclorodecaóxido; la tetrazomina; la taliblastina; la tiocoralina; la trombopoyetina; la trombopoyetina mimética; la timalfasina, el agonista del receptor de timopoyetina; el timotrinan, la hormona estimulante de la tiroides, etiopurpurina de etilo de estaño; la tirapazamina; el bicloruro de titanoceno; el topsentin, el toremifeno, el factor de células madre totipotentes, los inhibidores de la traducción, la tretinoína; la triacetiluridina; la triciribina; el trimetrexato; la triptorelina; el tropisetron; la turosterida; los inhibidores de la tirosina quinasa, las tirfostinas; los inhibidores UBC; el ubenimex; el factor inhibidor del crecimiento derivado del seno urogenital; los antagonistas del receptor de uroquinasa; la vapreotida; el variolin B; el sistema de vectores, la terapia génica de eritrocitos; el velaresol; la veramina; el verdins; la verteporfina, la vinorelbina, el vinxaltin; el Vitaxin®; el vorozol; la zanoterona; el zeniplatin; el zilascorb y la zinostatina stimalamer. Otros fármacos contra el cáncer son el 5-fluorouracilo y la leucovorina. Estos dos agentes pueden ser útiles cuando se usan en los métodos que emplean talidomida y un inhibidor de la topoisomerasa. Un agente anti-cáncer puede no ser un agente quimioterapéutico.

Un AcM anti-CD19 de la invención puede usarse en combinación con la administración de uno o más tratamientos, tales como, pero que no se limitan a, los agentes anti-cáncer, tales como los descritos en la Tabla 1, para el tratamiento de cáncer de mama, ovario, melanoma, próstata, colon y pulmón como se describió anteriormente. Cuando se usa en una terapia de combinación, las dosis y/o la frecuencia de administración que se enumera en la Tabla 2 pueden disminuirse.

Tabla 2. Agentes contra el cáncer

Agente terapéutico	Dosis / Administración / Formulación		
clorhidrato de doxorubicina (Adriamicina RDF ® y Adriamicina PFS ®)	intravenoso	60-75 mg/m ² en el día 1	intervalos de 21 días
hidrocloruro de epirubicina (Ellence TM)	intravenoso	100-120 mg/m ² en el día 1 de cada ciclo o se divide en partes iguales y se da en los días 1-8 del ciclo	ciclos de 3-4 semanas
fluorouracilo	intravenoso	presentación: viales de 5 ml y 10 ml (que contienen 250 y 500 mg de fluorouracilo respectivamente)	
docetaxel (Taxotere®)	intravenoso	60 a 100 mg/m ² durante 1 hora	una vez cada 3 semanas
paclitaxel (Taxol®)	intravenoso	175 mg/m ² durante 3 horas	cada 3 semanas para 4 cursos (administrado secuencialmente a la combinación de quimioterapia con doxorubicina)
citrato de tamoxifeno (Nolvadex ®)	oral (tableta)	20-40 mg, dosis mayores de 20 mg se deben dar en dosis dividida (mañana y por la noche)	diario
leucovorina de calcio para inyección	inyección intravenosa o intramuscular	presentación: viales de 350 mg	la dosis no se sabe a partir del texto PDR 3610

acetato de luprolide (Lupron ®)	inyección subcutánea única	1 mg (0,2 ml o 20 unidades de la marca)	una vez al día
flutamida (Eulexin ®)	oral (capsula)	50 mg (cápsulas que contienen 125 mg de flutamida cada una)	3 veces al día a intervalos de 8 horas (dosis total diaria de 750 mg)
nilutamida (Nilandron ®)	oral (tableta)	300 mg o 150 mg (tabletas que contienen 50 o 150 mg de nilutamida cada una)	300 mg una vez al día durante 30 días seguido por 150 mg una vez al día
bicalutamida (Casodex ®):	Oral (tableta)	50 mg (tabletas que contienen 50 mg de bicalutamida cada una)	una vez al día
progesterona	inyección	USP en aceite de sésamo 50 mg l	
ketoconazol (Nizoral ®)	crema	crema al 2% que se aplica una vez o dos veces al día según los síntomas	
prednisona	oral (tableta)	la dosificación inicial puede variar de 60mg a 5mg por día en dependencia de la enfermedad específica tratada.	
estramustina fosfato de sodio (Emcyt ®)	oral (cápsulas)	14 mg/kg de peso corporal (es decir, una tableta de 140 mg para cada 10 kg o 22 lb de peso corporal)	al día administrado en 3 o 4 dosis divididas
etopósido o VP-16	intravenoso	5 ml de la solución de 20 mg/ml (100 mg)	
dacarbazina (DTIC-Dome ®)	intravenoso	2- 4.5mg/Kg	una vez al día por 10 días. puede repetirse a intervalos de 4 semanas
polifeprosán 20 con implante de carmustina (BCNU) (nitrosourea) (Gliadel ®)	oblea colocada en la cavidad de resección	8 obleas, cada una contiene 7.7mg de carmustina, para un total de 61.6 mg, si el tamaño y la forma de la cavidad de resección lo permite	
Cisplatino	inyección	[n/a en PDR 861] presentaciones: solución de 1 mg/ml en vial multi-dosis de 50 ml y 100 ml	
mitomicina	inyección	suministrada en viales de 5 mg y 20 mg (que contienen 5 mg y 20 mg de mitomicina)	
gemcitabina HCl (Gemzar ®)	intravenoso	para NSCLC se investigaron 2 esquemas y no se determinó el óptimo. Esquema de de 4 semanas de administración por vía intravenosa a 1000 mg/m ² durante 30 minutos, en el esquema de 3 semanas la gemcitabina administrada por vía intravenosa a 1250	Esquema de 4 semanas-días 1,8 y 15 de cada ciclo de 28-días. Cisplatino 100 mg/m ² intravenoso el día 1 después de la infusión de Gemzar. Esquema de 3 semanas de días 1 y 8 de cada ciclo de 21 días. El cisplatino en

		mg/m ² durante 30 minutos	dosis de 100 mg/m ² administrado por vía intravenosa después de la administración de gemcitabina el día 1.
carboplatin (Paraplatin®)	intravenoso	Terapia de un solo agente: 360 mg/m ² I.V. en el día 1 (infusión de 15 minutos o más) Otros cálculos de dosis: Terapia de combinación con ciclofosfamida, recomendación del ajuste de dosis, fórmula de dosificación, etc.	Cada 4 semanas
ifosamida (Ifex ®)	intravenoso	1.2 mg/m ² diarios	5 días consecutivos, repetir cada 3 semanas o después de la recuperación de la toxicidad hematológica
topotecan clorhidrato (Hycamtin ®)	Intravenosa	1.5 mg/m ² por infusión intravenosa más de 30 minutos diarios	5 días consecutivos, se comienza el día 1 de un curso de 21 días
bifosfonatos, alendronate, Pamidronato Risedronato	Intravenosa u oral, se toma con agua 6-8 oz	60 mg o 90 mg única infusión durante 4 - 24 horas para corregir la hipercalcemia en pacientes con cáncer de 5 mg/d diarios durante 2 años y luego 10 mg/d durante 9 meses para prevenir o controlar la resorción ósea. 5.0 mg para prevenir o controlar la resorción ósea.	
lovastatina (Mevacor™)	oral	10 a 80 mg/día en dosis única o dosis dividida.	

Un AcM anti-CD19 puede usarse en combinación con terapias de radiación que comprenden el uso de rayos X, rayos gamma y otras fuentes de radiación para destruir las células cancerosas. En modalidades particulares, el tratamiento de radiación se administra en forma de radiación de haz externo o teleterapia en el que la radiación se dirige desde una fuente remota. En otras modalidades, el tratamiento de radiación se administra como terapia interna o braquiterapia en donde una fuente radioactiva se coloca dentro del cuerpo cerca de las células cancerosas o una masa tumoral.

Las terapias de cáncer y sus dosis, vías de administración y uso recomendado son conocidos en la materia y se describen en la literatura tal como Physicians Desk Reference (56 ed., 2002).

5.20. Composiciones farmacéuticas

La invención se refiere también a las composiciones inmunoterapéuticas y el tratamiento de las enfermedades y trastornos de células B en seres humanos, tales como, pero no se limitan a, tumores malignos de células B, a las composiciones inmunoterapéuticas y el tratamiento y la prevención de la GVHD, el rechazo del injerto, y el trastorno linfoproliferativo posterior al trasplante en receptores humanos de trasplantes, y a las composiciones inmunoterapéuticas y el tratamiento de enfermedades y los trastornos autoinmunes en seres humanos, por medio del uso de anticuerpos terapéuticos que se unen al antígeno CD19 y pueden mediar la ADCC humana.

La presente invención se refiere a las composiciones farmacéuticas que comprenden anticuerpos humanizados, anti-CD19 de isotipo IgG1 o IgG3 humano. La presente invención se refiere también a las composiciones farmacéuticas que comprenden anticuerpos humanizados anti-CD19 de isotipo IgG2 o IgG4 humano que pueden mediar la ADCC humana.

En ciertas modalidades, la presente invención se refiere también a las composiciones farmacéuticas que comprenden anticuerpos monoclonales humanizados, anti-CD19 que se pueden producir por los métodos conocidos en la materia.

- 5 Las formulaciones y regímenes terapéuticos se describen para el tratamiento de seres humanos diagnosticados con tumores malignos de células B que se derivan de células B y sus precursores, incluyendo pero no se limitan a, leucemias linfoblásticas agudas (ALL), linfomas de Hodgkin, linfomas no-Hodgkin, leucemias linfocíticas crónicas de células B (CLL), mieloma múltiple, linfomas foliculares, linfomas de células del manto, leucemias pro-linfocíticas, leucemias de células pilosas, leucemias linfocítica aguda comunes y algunas leucemias linfoblásticas agudas nulas.
- 10 Los anticuerpos anti-CD19 pueden mediar la ADCC, la citotoxicidad celular dependiente del complemento, o la apoptosis. Las composiciones y métodos de la presente invención tienen también la ventaja de dirigirse a una población más amplia de células B que otras inmunoterapias dirigidas a células B. Por ejemplo, los anticuerpos anti-CD19 de la presente invención pueden ser eficaces para dirigirse a las células de la médula ósea, las células B circulantes y las células B maduras, que secretan anticuerpos. Como consecuencia, las composiciones de la invención pueden ser
- 15 eficaces para reducir o depletar las células B circulantes, así como inmunoglobulina circulante.

Como consecuencia, en un aspecto, la invención proporciona las composiciones para el tratamiento y la prevención de la GVHD, el rechazo del injerto, y el trastorno linfoproliferativo posterior al trasplante, que se asocian con complicaciones menores y/o menos graves que los agentes terapéuticos y regímenes menos dirigidos. En una modalidad, las

20 composiciones y métodos de la invención se usan con dosis de agentes terapéuticos tradicionales inferiores a las que se posibilitarían en ausencia de las composiciones de la invención. En otra modalidad, las composiciones de la invención obvian la necesidad de una forma más intensa de terapia, tales como la radioterapia, la quimioterapia de dosis alta, o la esplenectomía.

- 25 Los anticuerpos anti-CD19 y las composiciones pueden administrarse a un paciente receptor del trasplante antes de o posterior al trasplante, solo o en combinación con otros agentes o regímenes terapéuticos para el tratamiento o prevención de la GVHD y el rechazo del injerto. Por ejemplo, anticuerpos anti-CD19 y composiciones pueden usarse para depletar los aloanticuerpos de un receptor del trasplante antes o posterior al trasplante de un injerto alogénico. Los anticuerpos anti-CD19 y composiciones pueden usarse también para depletar las células que producen anticuerpos a
- 30 partir del injerto ex vivo, antes del trasplante, o en el donante, o como profilaxis contra la GVHD y el rechazo de injerto.

5.21. Formulaciones farmacéuticas, administración y dosificación

- 35 Las formulaciones farmacéuticas de la invención contienen como ingrediente activo anticuerpos anti-CD19 humanos, humanizados o quiméricos. Las formulaciones contienen el anticuerpo desnudo, inmunoconjugado, o proteína de fusión en una cantidad eficaz para producir la respuesta deseada en una unidad de peso o volumen adecuado para la administración a un paciente humano, y de preferencia son estériles. La respuesta se puede, por ejemplo, medir por la determinación de los efectos fisiológicos de la composición de anticuerpo anti-CD19, tales como, pero no se limitan a,
- 40 depleción de células B circulantes, depleción de células B de tejido, regresión de un tumor maligno de células B, o disminución de síntomas de la enfermedad. Alguien con experiencia en la materia conocerá otros ensayos y los podrá emplear para medir el nivel de la respuesta.

5.21.1. Formulaciones farmacéuticas

- 45 Una composición de anticuerpo anti-CD19 puede formularse con un vehículo farmacéuticamente aceptable. El término "farmacéuticamente aceptable" significa uno o más materiales no tóxicos que no interfieren con la eficacia de la actividad biológica de los ingredientes activos. Las preparaciones de este tipo pueden contener de forma rutinaria, sales, agentes tamponantes, conservantes, vehículos compatibles, y opcionalmente otros agentes terapéuticos. Las preparaciones farmacéuticamente aceptables de este tipo pueden contener también de forma rutinaria rellenos sólidos o líquidos
- 50 compatibles, diluyentes o sustancias de encapsulación que son adecuadas para la administración en un humano. Cuando se usan en medicina, las sales deben ser farmacéuticamente aceptables, pero las sales farmacéuticamente inaceptables pueden usarse convenientemente para preparar las sales farmacéuticamente aceptables de éstas y no se excluyen del alcance de la invención. Las sales farmacológicamente y farmacéuticamente aceptables de este tipo incluyen, pero no se limitan a, aquellas preparadas a partir de los ácidos siguientes: clorhídrico, bromhídrico, sulfúrico,
- 55 nítrico, fosfórico, maleico, acético, salicílico, cítrico, bórico, fórmico, malónico, succínico y similares. También, las sales farmacéuticamente aceptables se pueden preparar como sales de metal alcalino o alcalino térreo, tales como sales de sodio, potasio o calcio. El término "vehículo" denota un ingrediente orgánico o inorgánico, natural o sintético, con el que el ingrediente activo se combina para facilitar la aplicación. Los componentes de las composiciones farmacéuticas son capaces también de mezclarse junto con los anticuerpos de la presente invención, y entre sí, de manera tal que no exista
- 60 interacción que pueda perjudicar sustancialmente la eficacia farmacéutica deseada.

Las composiciones de los anticuerpos anti-CD19 se pueden preparar para el almacenamiento al mezclar el anticuerpo o el inmunoconjugado que tiene el grado de pureza deseado con vehículos, excipientes o estabilizantes opcionales fisiológicamente aceptables (Remington's Pharmaceutical Sciences, 16^{va} edición, Editor Osol, A. (1999)), en la forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. Los vehículos, excipientes, o estabilizadores aceptables, no son tóxicos para los receptores a las dosis y concentraciones empleadas, e incluyen tampones tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes incluyendo ácido ascórbico y metionina; conservantes (tal como cloruro de octadecildimetilbencil amonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio; fenol, alcohol butílico o bencílico; alquil parabenos tales como metil o propil parabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); polipéptido de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 residuos); proteínas, tales como albúmina sérica, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrofílicos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina, o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos que incluyen glucosa, manosa, o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; azúcares tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contra-iones que forman sales tal como sodio; complejos metálicos (por ejemplo, complejos de proteína-Zn); y/o tensioactivos no iónicos tales como TWEEN, PLURONICS™ o polietileno glicol (PEG).

Las composiciones de los anticuerpos anti-CD19 pueden contener también, opcionalmente, conservantes adecuados, tales como: cloruro de benzalconio; clorobutanol; parabenos y timerosal.

Las composiciones de los anticuerpos anti-CD19 pueden presentarse convenientemente en forma de dosis unitaria y pueden prepararse por cualquiera de los métodos bien conocidos en la materia de farmacia. Todos los métodos incluyen la etapa de poner el agente activo en asociación con un vehículo que constituye uno o más ingredientes accesorios. En general, las composiciones de anticuerpos anti-CD19 se preparan al poner de manera uniforme e íntima el compuesto activo en asociación con un vehículo líquido, un vehículo sólido finamente dividido, o ambos, y después, si es necesario, conformar el producto.

Las composiciones adecuadas para la administración parenteral comprenden convenientemente una preparación estéril acuosa o no acuosa del anticuerpo anti-CD19, que de preferencia es isotónica con la sangre del receptor. Esta preparación puede formularse de acuerdo con métodos conocidos por medio del uso de agentes de dispersión o hidratación y agentes de suspensión adecuados. La preparación inyectable estéril puede ser también una solución o suspensión inyectable estéril en un diluyente o disolvente no tóxico parenteralmente aceptable, por ejemplo, como una solución en 1,3-butanodiol. Entre los vehículos y disolventes aceptables que pueden emplearse se encuentran el agua, solución de Ringer y solución isotónica de cloruro de sodio. Además, los aceites fijos estériles se emplean convencionalmente como un medio disolvente o de suspensión. Para este propósito cualquier aceite fijo blando puede emplearse incluyendo los mono-o di-glicéridos sintéticos. Además, los ácidos grasos tal como ácido oleico pueden usarse en la preparación de inyectables. La formulación de vehículo adecuada para la administración oral, subcutánea, intravenosa, intramuscular, etc se puede encontrar en Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, Pensilvania. En determinadas modalidades, la formulación del vehículo adecuado para diversas vías de administración puede ser igual o similar a aquella que se describió para RITUXAN™. Ver, Physicians' Desk Reference (Medical Economics Company, Inc., Montvale, Nueva Jersey, 2005), págs. 958-960 y 1354-1357, las composiciones de anticuerpos anti-CD19 pueden formularse para la administración intravenosa con cloruro de sodio, citrato de sodio dihidratado, polisorbato 80 y agua estéril, donde el pH de la composición se ajusta a aproximadamente 6.5. Aquellos con experiencia en la materia están conscientes de que la inyección vía intravenosa proporciona un modo útil de administración debido a la rigurosidad de la circulación en la distribución rápida de anticuerpos. La administración intravenosa, sin embargo, está sujeta a la limitación por una barrera vascular que comprende las células endoteliales de la vasculatura y la matriz subendotelial. Todavía, la barrera vascular es un problema más notable para la absorción de los anticuerpos terapéuticos por tumores sólidos. Los linfomas tienen tasas de flujo sanguíneo relativamente altas, contribuyendo a la entrega eficaz de anticuerpos por las vías de administración intralinfáticas, tales como inyección subcutánea o intramuscular, o por cateterización de vasos linfáticos, que proporcionan también un medio útil para el tratamiento de linfomas de células B. Los anticuerpos anti-CD19 de las composiciones y métodos de la invención se auto-administran por vía subcutánea. La composición puede formularse como un fármaco liofilizado o en un tampón líquido (por ejemplo, PBS y/o citrato) a aproximadamente 50 mg/ml.

La presente formulación también puede contener más de un compuesto activo según sea necesario para la indicación en particular que se trata, de preferencia aquellos con actividades complementarias que no se afectan negativamente entre sí. Por ejemplo, puede ser deseable proporcionar además un agente inmunosupresor. Las moléculas de este tipo se presentan adecuadamente en combinación con cantidades que son eficaces para el propósito pretendido.

Los ingredientes activos pueden atraparse también en microcápsulas preparadas, por ejemplo, por técnicas de coacervación o por polimerización interfacial, por ejemplo, hidroximetilcelulosa o microcápsula de gelatina y microcápsula de poli-(metilmetacrilato), respectivamente, en sistemas coloidales de entrega de fármacos coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en

macroemulsiones. Las técnicas de este tipo se describen en Remington's Pharmaceutical Sciences 16^{va} edición, Editor Osol, A. (1980).

5 Las formulaciones que se usan para la administración *in vivo* son típicamente estériles. Esto se lleva a cabo fácilmente mediante filtración a través de membranas de filtración estériles.

Las preparaciones de liberación sostenida pueden prepararse. Los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen las matrices semipermeables de polímeros hidrofóbicos sólidos que contienen un anticuerpo anti-CD19, cuyas matrices se encuentran en forma de artículos conformados, *por ejemplo*, películas o microcápsula. 10 Los ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(2-hidroxietilmetacrilato), o poli(vinilalcohol)), poliláctidos (la patente de los Estados Unidos núm. 3,773,919), copolímeros de ácido L-glutámico y γ -etil-L-glutamato, etileno acetato de -vinilo no degradable, copolímeros degradables de ácido láctico-ácido glicólico tales como el LUPRON DEPOTTM (microesferas inyectables compuestas de copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolida), y ácido poli-D(-)-3-hidroxibutírico. Mientras que los polímeros tales como etileno acetato 15 de vinilo y ácido láctico-ácido glicólico permiten la liberación de moléculas por más de 100 días, determinados hidrogeles liberan proteínas durante períodos de tiempo más cortos. Cuando los anticuerpos encapsulados permanecen en el cuerpo durante un tiempo largo, pueden desnaturalizarse o agregar como resultado de la exposición a la humedad a 37°C, lo que resulta en una pérdida de actividad biológica y posibles cambios en la inmunogenicidad.

20 Estrategias racionales se pueden diseñar para la estabilización en dependencia del mecanismo involucrado. Por ejemplo, si se descubre que el mecanismo de agregación es la formación intermolecular del enlace SS a través del intercambio de tio-disulfuro, la estabilización puede lograrse mediante la modificación de los residuos sulfhídricos, liofilización a partir de soluciones ácidas, control del contenido de humedad, uso de aditivos apropiados, y desarrollo de composiciones específicas de la matriz polimérica. En determinadas modalidades, los vehículos farmacéuticamente 25 aceptables que se usan en las composiciones de la invención no afectan la ADCC o la CDC humanas.

Las composiciones de anticuerpos anti-CD19 descritas en la presente pueden formularse también como inmunoliposomas. Un "liposoma" es una vesícula pequeña compuesta de diversos tipos de lípidos, fosfolípidos y/o 30 agente tensioactivo que es útil para la entrega de un fármaco (tal como los anticuerpos anti-CD19 descritos en la presente) a un humano. Los componentes del liposoma se disponen comúnmente en una formación de bicapa, similar a la disposición de lípidos de las membranas biológicas. Los liposomas que contienen los anticuerpos de la invención se preparan por métodos conocidos en la materia, tales como los descritos por Epstein y otros, Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos, 82:3688 (1985); Hwang y otros, Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos, 77:4030 (1980), y las patentes de los Estados Unidos núms. 4,485,045 y 4,544,545. Los liposomas con el tiempo de circulación mejorado se describen 35 en la patente de los Estados Unidos núm. 5,013,556. Los liposomas particularmente útiles se pueden generar por el método de evaporación en fase reversa con una composición lipídica que comprende fosfatidilcolina, colesterol y fosfatidiletanolamina derivado de PEG (PEG-PE). Los liposomas se extruden a través de filtros de tamaño de poro definido para producir liposomas con el diámetro deseado. El anticuerpo de la presente invención se puede conjugar a los liposomas como se describió por Martin y otros, J. Biol. Chem., 257:286-288 (1982) a través de una reacción de 40 intercambio de disulfuro. Un agente terapéutico se puede contener también dentro del liposoma. Ver, Gabizon y otros, J. National Cancer Inst., (19)1484 (1989).

Algunas de las formulaciones farmacéuticas incluyen, pero no se limitan a:

45 (a) Un concentrado líquido estéril, libre de conservantes para la administración vía intravenosa (iv) del anticuerpo anti-CD19, que se suministra a una concentración de 10 mg/ml ya sea en viales de uso único de 100 mg (10 ml) o 500 mg (50 ml). El producto se puede formular para la administración i.v. por medio del uso de cloruro de sodio, citrato de sodio dihidratado, polisorbato y agua estéril para inyección. Por ejemplo, el producto se puede formular en 9.0 mg/ml de cloruro de sodio, 7.35 mg/ml de citrato de sodio dihidratado, 0.7 mg/ml de polisorbato 80 y agua estéril para inyección. El 50 pH se ajusta a 6.5.

(b) Un polvo estéril, liofilizado en viales de vidrio de uso único para inyección vía subcutánea (s.c.). El producto se puede formular con sacarosa, hidrocloreto de L-histidina monohidratado, L-histidina y polisorbato 20. Por ejemplo, cada vial de 55 uso único puede contener 150 mg de anticuerpo anti-CD19, 123.2 mg de sacarosa, 6.8 mg de hidrocloreto de L-histidina monohidratado, 4.3 mg de L-histidina, y 3 mg de polisorbato 20. La reconstitución del vial de uso único con 1.3 ml de agua estéril para inyección produce aproximadamente 1.5 ml de solución para entregar 125 mg por 1.25 ml (100 mg/ml) de anticuerpo.

(c) Un polvo liofilizado estéril, libre de conservantes para inyección vía intravenosa (i.v.). El producto se puede formular 60 con α -trehalosa dihidratada, L-histidina HCl, histidina y polisorbato 20 USP. Por ejemplo, cada vial puede contener 440 mg de anticuerpo anti-CD19, 400 mg de α -trehalosa dihidratada, 9.9 mg de L-histidina HCl, 6.4 mg de L-histidina, y 1.8

mg de polisorbato 20, USP. La reconstitución con 20 ml de agua bacteriostática para inyección (BWFI), USP, conteniendo 1.1% de alcohol bencilo como conservante, produce una solución multidosis que contiene 21 mg/ml de anticuerpo a un pH aproximadamente de 6.

(d) Un polvo estéril, liofilizado para infusión vía intravenosa en el que se formula un anticuerpo anti-CD19 con sacarosa, polisorbato, fosfato monobásico de sodio monohidratado, y fosfato de sodio dibásico dihidratado. Por ejemplo, cada vial de uso único puede contener 100 mg de anticuerpo, 500 mg de sacarosa, 0.5 mg de polisorbato 80, 2.2 mg de fosfato de sodio monobásico monohidratado, y 6.1 mg de fosfato de sodio dibásico dihidratado. No se presentan conservantes. A continuación de la reconstitución con 10 ml de agua estéril para inyección, USP, el pH resultante es aproximadamente 7.2.

(e) Una solución estéril, libre de conservantes para la administración vía subcutánea suministrada en una jeringuilla de 1 ml de uso único, precargada. El producto se puede formular con cloruro de sodio, fosfato de sodio monobásico dihidratado, fosfato de sodio dibásico dihidratado, citrato de sodio, ácido cítrico monohidratado, manitol, polisorbato 80 y agua para inyección, USP. El hidróxido de sodio puede adicionarse para ajustar el pH a aproximadamente 5.2. Por ejemplo, cada jeringuilla se puede formular para entregar 0.8 ml (40 mg) de fármaco. Cada 0.8 ml contiene 40 mg de anticuerpo anti-CD19, 4.93 mg de cloruro de sodio, 0.69 mg de fosfato de sodio monobásico dihidratado, 1.22 mg de fosfato de sodio dibásico dihidratado, 0.24 mg de citrato de sodio, 1.04 de ácido cítrico monohidratado, 9.6 mg de manitol, 0.8 mg de polisorbato 80 y agua para inyección, USP.

(f) Un polvo liofilizado estéril, libre de conservantes, contenido en un vial de uso único que se reconstituye con agua estéril para inyección (SWFI), USP, y se administra como una inyección vía subcutánea (s.c.). El producto se puede formular con sacarosa, hidrócloruro de histidina monohidratado, L-histidina, y polisorbato. Por ejemplo, un vial de 75 mg puede contener 129.6 mg o 112.5 mg de un anticuerpo anti-CD19, 93.1 mg de sacarosa, 1.8 mg de hidrócloruro de L-histidina monohidratado, 1.2 mg de L-histidina, y 0.3 mg de polisorbato 20, y se diseña para entregar 75 mg del anticuerpo en 0.6 ml después de la reconstitución con 0.9 ml de SWFI, USP. Un vial de 150 mg puede contener 202.5 mg o 175 mg de anticuerpo anti-CD19, 145.5 mg de sacarosa, 2.8 mg de hidrócloruro de L-histidina monohidratado, 1.8 mg de L-histidina, y 0.5 mg de polisorbato 20, y se diseña para entregar 150 mg del anticuerpo en 1.2 ml después de la reconstitución con 1.4 ml de SWFI, USP.

(g) Un producto estéril, liofilizado para reconstitución con agua estéril para inyección. El producto se puede formular como viales de uso único para inyección vía intramuscular (IM) usando manitol, histidina y glicina. Por ejemplo, cada vial de uso único puede contener 100 mg de anticuerpo anti-CD19, 67.5 mg de manitol, 8.7 mg de histidina y glicina 0.3 mg, y se diseña para entregar 100 mg de anticuerpo en 1.0 ml cuando se reconstituye con 1.0 ml de agua estéril para inyección. Como otro ejemplo, cada vial de uso único puede contener 50 mg de anticuerpo anti-CD19, 40.5 mg de manitol, 5.2 mg de histidina y glicina 0.2 mg, y se diseña para proporcionar 50 mg de anticuerpo cuando se reconstituye con 0.6 ml de agua estéril para inyección.

(h) Una solución estéril, libre de conservantes para inyección por vía intramuscular (IM), suministrada a una concentración de 100 mg/ml. El producto se puede formular en viales de uso único con histidina, glicina, y agua estéril para inyección. Por ejemplo, cada vial de uso único se pueden formular con el anticuerpo de 100 mg, 4.7 mg de histidina, y 0.1 mg de glicina en un volumen de 1.2 ml diseñado para entregar 100 mg de anticuerpo en 1 ml. Como otro ejemplo, cada vial de uso único se puede formular con 50 mg de anticuerpo, 2.7 mg de histidina y 0.08 mg de glicina en un volumen de 0.7 ml o 0.5 ml diseñado para entregar 50 mg de anticuerpo en 0.5 ml.

En determinadas modalidades, la composición farmacéutica de la invención es estable a 4°C. Una composición farmacéutica de la invención puede ser estable a temperatura ambiente.

5.21.2. Vida media del anticuerpo

La vida media de un anticuerpo anti-CD19 de las composiciones y métodos de la invención puede ser al menos aproximadamente 4 a 7 días. La media de la vida media de un anticuerpo anti-CD19 de las composiciones y métodos de la invención puede ser al menos aproximadamente 2 a 5 días, 3 a 6 días, 4 a 7 días, 5 a 8 días, de 6 a 9 días, 7 a 10 días, 8 a 11 días, 8 a 12, 9 a 13, 10 a 14, 11 a 15, 12 a 16, 13 a 17, 14 a 18, 15 a 19, o 16 a 20 días. La vida media de un anticuerpo anti-CD19 de las composiciones y métodos de la invención puede ser al menos aproximadamente 17 a 21 días, 18 a 22 días, 19 a 23 días, 20 a 24 días, 21 a 25 días, 22 a 26 días, 23 a 27 días, 24 a 28 días, 25 a 29 días o 26 a 30 días. La vida media de un anticuerpo anti-CD19 de las composiciones y métodos de la invención puede ser aproximadamente de hasta 50 días. Las vidas medias de los anticuerpos de las composiciones y métodos de la invención pueden prolongarse con los métodos conocidos en la materia. La prolongación de este tipo puede reducir a su vez la cantidad y/o frecuencia de la dosificación de las composiciones de anticuerpos. Los anticuerpos con vidas medias

mejoradas *in vivo* y los métodos para su preparación se describen en la patente de los Estados Unidos núm. 6,277,375, y las publicaciones internacionales núms. WO 98/23289 y WO 97/3461.

La circulación sérica *in vivo* de los anticuerpos anti-CD19 puede prolongarse también por la unión de moléculas de polímeros inertes tales como polietilenglicol de alto peso molecular (PEG) a los anticuerpos con o sin un enlazador multifuncional ya sea a través de la conjugación sitio-específico del PEG al N- o C-terminal de los anticuerpos o a través de los grupos épsilon-amino presentes en los residuos de lisilo. La derivación lineal o ramificada del polímero que resulte en pérdida mínima de la actividad biológica se usará. El grado de conjugación puede ser estrechamente controlado por SDS-PAGE y espectrometría de masas para asegurar la conjugación apropiada de moléculas de PEG a los anticuerpos. El PEG no reactivo se puede separar de los conjugados anticuerpos-PEG por cromatografía de exclusión molecular o por intercambio iónico. Los anticuerpos derivados de PEG se pueden probar para la actividad de unión, así como para la eficacia *in vivo* por medio del uso de los métodos conocidos por aquellas personas con experiencia en la materia, por ejemplo, por los inmunoensayos que se describen en la presente.

Además, los anticuerpos de las composiciones y métodos de la invención se pueden conjugar con albúmina para preparar el anticuerpo más estable *in vivo* o que tenga una vida media más larga *in vivo*. Las técnicas se conocen bien en la materia, *ver, por ejemplo*, las publicaciones internacionales núms. WO 93/15199, WO 93/15200, y WO 01/77137; y la patente europea núm. EP 413, 622.

5.21.3. Administración y dosificación

La administración de las composiciones de la invención a un paciente humano puede ser por cualquier vía, que incluyen, pero no se limitan a, la administración intravenosa, intradérmica, transdérmica, subcutánea, intramuscular, inhalación (*por ejemplo*, a través de un aerosol), bucal (*por ejemplo*, sublingual), tópica (*es decir*, tanto las superficies de la piel y mucosas, incluyendo superficies de las vías respiratorias), intratecal, interarticular, intraplural, intracerebral, infra-arterial, intraperitoneal, oral, intralinfática, intranasal, rectal o vaginal, por perfusión a través de un catéter regional, o mediante inyección intralesional dirigida. Las composiciones de la invención pueden administrarse por presión intravenosa o infusión intravenosa administradas por el período definido (*por ejemplo*, 0.5 a 2 horas). Las composiciones de la invención se pueden entregar mediante medios peristálticos o en forma de un depósito, a pesar de que la vía más adecuada en cualquier caso dado dependerá, como es bien conocido en la materia, de factores tales como la especie, edad, sexo y condición general del individuo, la naturaleza y gravedad de la afección que se trata y/o de la naturaleza de la composición en particular (*es decir*, dosis, formulación) que está siendo administrada. La vía de administración puede ser a través de infusión en bolo o continua durante un período de tiempo, una vez o dos veces por semana. La vía de administración puede ser por inyección vía subcutánea, opcionalmente una o dos veces semanal. Las composiciones y/o métodos de la invención pueden administrarse en un régimen ambulatorio.

La dosis de una composición que comprende el anticuerpo anti-CD19 puede medirse en unidades de mg/kg de peso corporal del paciente. La dosis de una composición que comprende el anticuerpo anti-CD19 puede medirse en unidades de mg/kg de peso corporal magro del paciente (*es decir*, peso corporal menos el contenido de grasa corporal). La dosis de una composición que comprende el anticuerpo anti-CD19 puede medirse en unidades de mg/m² de área de superficie corporal del paciente. La dosis de una composición que comprende el anticuerpo anti-CD19 se mide en unidades de mg por dosis administrada a un paciente. Cualquier medición de dosis puede usarse junto con las composiciones y métodos de la invención y las unidades de dosificación pueden convertirse por medios estándares en la materia.

Aquellas personas con experiencia en la materia apreciarán que las dosis se pueden seleccionar en base a un número de factores que incluyen la edad, el sexo, la especie y la afección del individuo (*por ejemplo*, el estadio de tumor maligno de células B), el grado deseado de depleción celular, la enfermedad que se trata y/o el anticuerpo en particular o fragmento de unión al antígeno que se usa y se puede determinar por alguien con experiencia en la materia. Por ejemplo, las cantidades efectivas de las composiciones de la invención pueden extrapolarse de curvas dosis-respuesta derivadas de sistemas de prueba *in vitro* o de sistemas de prueba en modelo animal (*por ejemplo*, la rata algodонера o mono). Los modelos y métodos para la evaluación de los efectos de los anticuerpos se conocen en la materia (Wooldridge y otros, Blood, 89(8): 2994-2998 (1997)), que se incorpora como referencia en la presente en su totalidad). Para tumores malignos de células B, los regímenes terapéuticos estándares en la materia para la terapia con anticuerpo se pueden usar con composiciones y métodos de la invención.

Los ejemplos de regímenes de dosificación que se pueden usar incluyen, pero no se limitan a, diariamente, tres veces por semana (intermitente), semanalmente, o cada 14 días. En determinadas modalidades, la dosificación de regímenes incluye, pero no se limita a, dosificación mensual o dosificación cada 6-8 semanas.

Aquellas personas con experiencia en la materia apreciarán que las dosis son generalmente superiores y/o mayor la frecuencia de administración para el tratamiento inicial en comparación con los regímenes de mantenimiento.

Los anticuerpos anti-CD19 pueden unirse a las células B y pueden resultar en la depleción eficaz (*es decir*, en dosis baja) de células B (como se describió en la presente). Los grados superiores de unión pueden alcanzarse cuando la densidad del CD19 humano sobre la superficie de las células B de un paciente sea alta. Las dosis del anticuerpo (opcionalmente en un vehículo farmacéuticamente aceptable como parte de una composición farmacéutica) pueden ser al menos aproximadamente 0.0005, 0.001, 0.05, 0.075, 0.1, 0.25, 0.375, 0.5, 1, 2.5, 5, 10, 20, 37.5, o 50 mg/m² y/o menos que aproximadamente 500, 475, 450, 425, 400, 375, 350, 325, 300, 275, 250, 225, 200, 175, 150, 125, 100, 75, 60, 50, 37.5, 20, 15, 10, 5, 2.5, 1, 0.5, 0.375, 0.1, 0.075 ó 0.01 mg/m². La dosis puede ser entre aproximadamente 0.0005 a aproximadamente 200 mg/m², entre aproximadamente 0.001 y 150 mg/m², entre aproximadamente 0.075 y 125 mg/m², entre aproximadamente 0.375 y 100 mg/m², entre aproximadamente 2.5 y 75 mg/m², entre aproximadamente 10 y 75 mg/m², y entre aproximadamente 20 y 50 mg/m². La dosis del anticuerpo anti-CD19 que se usa puede ser al menos aproximadamente 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5, 5, 5.5, 6, 6.5, 7, 7.5, 8, 8.5, 9, 9.5, 10, 10.5, 11, 11.5, 12, 12.5, 13, 13.5, 14, 14.5, 15, 15.5, 16, 16.5, 17, 17.5, 18, 18.5, 19, 19.5, 20, 20.5 mg/kg de peso corporal de un paciente. La dosis del anticuerpo desnudo anti-CD19 usado puede ser al menos aproximadamente 1 a 10, 5 a 15, 10 a 20, o 15 a 25 mg/kg de peso corporal de un paciente. La dosis del anticuerpo anti-CD19 usado puede ser al menos aproximadamente 1 a 20, 3 a 15, o 5 a 10 mg/kg de peso corporal de un paciente. La dosis del anticuerpo anti-CD19 usado puede ser al menos aproximadamente 5, 6, 7, 8, 9, o 10 mg/kg de peso corporal de un paciente. Una unidad de dosis única del anticuerpo (opcionalmente en un vehículo farmacéuticamente aceptable como parte de una composición farmacéutica) puede ser al menos aproximadamente 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78, 80, 82, 84, 86, 88, 90, 92, 94, 96, 98, 100, 102, 104, 106, 108, 110, 112, 114, 116, 118, 120, 122, 124, 126, 128, 130, 132, 134, 136, 138, 140, 142, 144, 146, 148, 150, 152, 154, 156, 158, 160, 162, 164, 166, 168, 170, 172, 174, 176, 178, 180, 182, 184, 186, 188, 190, 192, 194, 196, 198, 200, 204, 206, 208, 210, 212, 214, 216, 218, 220, 222, 224, 226, 228, 230, 232, 234, 236, 238, 240, 242, 244, 246, 248, o 250 microgramos/m². La dosis puede ser de hasta 1 g por unidad de dosis única.

Todas las dosis anteriores son ejemplares y se pueden usar junto con las composiciones de la invención, sin embargo, donde un anticuerpo anti-CD19 se usa junto con una toxina o agente radioterapéutico pueden preferirse las dosis inferiores descritas anteriormente. Si el paciente tiene niveles bajos de densidad de CD19, pueden preferirse las dosis inferiores descritas anteriormente.

Los anticuerpos y/o composiciones de esta invención se pueden administrar a una dosis inferior que 375 mg/m²; a una dosis inferior que aproximadamente 37.5 mg/m², a una dosis inferior que 0.375 mg/m², y/o a una dosis entre aproximadamente 0.075 mg/m² y aproximadamente 125 mg/m². Los regímenes de dosis pueden comprender dosis bajas, administradas en intervalos repetidos. Por ejemplo, las composiciones de la invención se pueden administrar en una dosis inferior que aproximadamente 375 mg/m² en intervalos de aproximadamente cada 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 125, 150, 175, o 200 días.

La dosis especificada puede dar lugar a la depleción de las células B en el ser humano tratado al usar las composiciones y los métodos de la invención durante un período de al menos aproximadamente 1, 2, 3, 5, 7, 10, 14, 20, 30, 45, 60, 75, 90, 120, 150 ó 180 días o más. Las células pre-B (que no expresan inmunoglobulina de superficie) pueden depletarse. Las células B maduras (que expresan inmunoglobulina de superficie) pueden depletarse. Todos los tipos de linfomas de células B pueden presentar depleción. Cualquiera de estos tipos de células B se puede usar para medir la depleción de las células B. La depleción de las células B se puede medir en los fluidos corporales tales como suero sanguíneo, o en tejidos tales como médula ósea. Las células B pueden depletarse por al menos 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% ó 100% en comparación con los niveles de células B en el paciente que se trata antes del uso de composiciones y métodos de la invención. Las células B pueden depletarse al menos 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, o 100% en comparación con los niveles típicos estándares de células B para los humanos. Los niveles típicos estándares de células B para los humanos se determina por medio del uso de pacientes similares al paciente que se trata con respecto a la edad, sexo, peso, y otros factores.

Una dosis de aproximadamente 125 mg/m² o menos de un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno puede dar lugar a la depleción de las células B durante un período de al menos aproximadamente 7, 14, 21, 30, 45, 60, 90, 120, 150, o 200 días. Una dosis de aproximadamente 37.5 mg/m² o menos puede depletar las células B durante un período de al menos aproximadamente 7, 14, 21, 30, 45, 60, 90, 120, 150, o 200 días. Una dosis de aproximadamente 0.375 mg/m² o menos puede dar lugar a la depleción de las células B durante al menos aproximadamente 7, 14, 21, 30, 45 o 60 días. Una dosis de aproximadamente 0.075 mg/m² o menos puede dar lugar a la depleción de las células B durante un período de al menos aproximadamente 7, 14, 21, 30, 45, 60, 90, 120, 150, o 200 días. Una dosis de aproximadamente 0.01 mg/m², 0.005 mg/m² o incluso 0.001 mg/m² o menos puede dar lugar a la depleción de las células B durante al menos aproximadamente 3, 5, 7, 10, 14, 21, 30, 45, 60, 90, 120, 150, o 200 días. La dosis se puede administrar por cualquier vía adecuada, pero se administra opcionalmente mediante una vía subcutánea.

Como otro aspecto, la invención proporciona el descubrimiento de que la depleción de las células B y/o el tratamiento de trastornos de las células B se puede alcanzar a dosis inferiores de anticuerpos o fragmentos anticuerpos que se emplean en los métodos actualmente disponibles. De este modo, el tratamiento puede ser la depleción de las células B y/o el tratamiento de un trastorno de las células B, que comprende administrar a un humano, una cantidad eficaz de un anticuerpo que se une específicamente al CD19, donde una dosis de aproximadamente 500, 475, 450, 425, 400, 375, 350, 325, 300, 275, 250, 225, 200, 175, 150, 125, 100, 75, 60, 50, 37.5, 20, 10, 5, 2.5, 1, 0.5, 0.375, 0.25, 0.1, 0.075, 0.05, 0.001, 0.0005 mg/m² o menos dan lugar a una depleción de las células B (células B circulantes y/o tejido) de 25%, 35%, 50%, 60%, 75%, 80%, 85 %, 90%, 95%, 98% o más durante un período de al menos aproximadamente 3, 5, 7, 10, 14, 21, 30, 45, 60, 75, 90, 120, 150, 180, o 200 días o más largo. Una dosis de aproximadamente 125 mg/m² ó 75 mg/m² o menos puede dar lugar a la depleción de al menos aproximadamente 50%, 75%, 85% o 90% de las células B durante al menos aproximadamente 7, 14, 21, 30, 60, 75, 90, 120, 150 ó 180 días. Una dosis de aproximadamente 50, 37.5 ó 10 mg/m² puede dar lugar a la depleción de al menos aproximadamente un 50%, 75%, 85% o 90% de las células B durante al menos aproximadamente 7, 14, 21, 30, 60, 75, 90, 120 ó 180 días. Una dosis de aproximadamente 0.375 ó 0.1 mg/m² puede dar lugar a la depleción de al menos aproximadamente un 50%, 75%, 85% o 90% de las células B durante al menos aproximadamente 7, 14, 21, 30, 60, 75 ó 90 días . Una dosis de aproximadamente 0.075, 0.01, 0.001, o 0.0005 mg/m² puede dar lugar a la depleción de al menos aproximadamente un 50%, 75%, 85% o 90% de las células B durante al menos aproximadamente 7, 14, 21, 30 ó 60 días.

La dosis se puede aumentar o reducir para mantener una dosis constante en la sangre o en un tejido, tal como, pero no limitado a, la médula ósea. La dosis se puede aumentar o reducir en aproximadamente 2%, 5%, 8%, 10%, 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, y 95% para mantener un nivel deseado de un anticuerpo de las composiciones y métodos de la invención.

La dosis se puede ajustar y/o la velocidad de infusión se puede reducir en base a la respuesta inmunogénica del paciente a las composiciones de la invención.

De acuerdo con un aspecto de la invención, una dosis de carga de un anticuerpo anti-CD19 y/o composición de la invención se puede administrar primero seguida por una dosis de mantenimiento hasta que el tumor maligno de células B que se trata progresa o seguido de un curso de tratamiento definido (*por ejemplo*, CAMPATH™, MYLOTARG™, o RITUXAN™, el último de los cuales permite a los pacientes que sean tratados durante un número determinado de dosis que se ha incrementado como los datos adicionales que se generaron).

Un paciente puede tratarse previamente con las composiciones de la invención para detectar, minimizar la respuesta inmunogénica, o minimizar los efectos adversos de las composiciones de la invención.

5.21.4. Prueba de toxicidad

La tolerancia, toxicidad y/o eficacia de las composiciones y/o regímenes de tratamiento de la presente invención se pueden determinar por procedimientos farmacéuticos estándares en cultivos celulares o animales experimentales, *por ejemplo*, para la determinación de la LD50 (dosis letal para el 50% de la población), la ED50 (la dosis terapéuticamente eficaz en 50% de la población), y IC50 (la dosis eficaz para alcanzar una inhibición del 50%). En una modalidad, la dosis es una dosis eficaz para alcanzar al menos un 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, o 99% de depleción de las células B circulantes o inmunoglobulina circulante, o ambas. La relación de dosis entre los efectos tóxicos y terapéuticos es el índice terapéutico y se puede expresar como la relación LD50/ED50. Las terapias que presentan índices terapéuticos grandes pueden preferirse. Aunque las terapias que presentan efectos tóxicos secundarios pueden usarse, se debe tener cuidado al diseñar un sistema de entrega que dirige a agentes de este tipo hacia las células que expresan CD19 para minimizar el daño potencial de las células CD19 negativas y, de ese modo, reducir los efectos secundarios.

Los datos que se obtienen de los ensayos de cultivo de células y estudios en animales se pueden usar en la formulación de un intervalo de dosis de las composiciones y/o los regímenes de tratamiento para uso en humanos. La dosis de los agentes de este tipo puede estar dentro de un intervalo de concentraciones circulantes que incluyen la ED50 con poca o ninguna toxicidad. La dosis puede variar dentro de este intervalo dependiendo de la forma de dosificación empleada y la vía de administración utilizada. Para cualquier terapia usada en los métodos de la invención, una dosis terapéuticamente eficaz se puede estimar por modelos animales apropiados. En dependencia de las especies del modelo animal, la dosis se puede aumentar para uso humano, de acuerdo con las fórmulas aceptadas en la materia, *por ejemplo*, según se proporcionó por Freireich y otros., Quantitative comparison of toxicity of anticancer agents in mouse, rat, monkey, dog, and human, Cancer Chemotherapy Reports, NCI 1966 40:219-244. Los datos que se obtienen de ensayos de cultivo celular pueden ser útiles para predecir la toxicidad potencial. Los estudios con animales se pueden usar para formular una dosis específica para conseguir un intervalo de concentración plasmática circulante que incluye el IC50 (es decir, la concentración del compuesto prueba que alcanza una inhibición máxima media de los síntomas) como se determinó en el cultivo celular. La información de este tipo se puede usar para determinar con mayor precisión las dosis útiles en los

humanos. Los niveles plasmáticos de fármacos pueden medirse, por ejemplo, por cromatografía líquida de alto rendimiento, ELISA, o por ensayos basados en células.

5.22. Diagnóstico del paciente, estadificación y regímenes terapéuticos en la oncología

De acuerdo con determinados aspectos de la invención, se selecciona el régimen de tratamiento y dosis usada con las composiciones en base al número de factores incluyendo, pero no se limitan a, el estadio de la enfermedad o trastorno de células B que se trata. Los regímenes de tratamiento apropiados se pueden determinar por alguien con experiencia en la materia para los estadios particulares de una enfermedad o trastorno de células B en un paciente o población de pacientes. Las curvas de dosis-respuesta se pueden generar por medio del uso de los protocolos estándares en la materia para determinar la cantidad eficaz de las composiciones de la invención para el tratamiento de los pacientes que tienen diferentes estadios de una enfermedad o trastorno de células B. En general, los pacientes con estadios más avanzadas de una enfermedad o trastorno de células B necesitarán dosis más altas y/o dosis más frecuentes que pueden administrarse durante periodos de tiempo más largos en comparación con los pacientes que tienen un estadio inicial de la enfermedad o trastorno de células B.

Los anticuerpos anti-CD19, composiciones y métodos de la invención pueden practicarse para tratar las enfermedades de células B, incluyendo los tumores malignos de células B. El término "tumor maligno de células B" incluye cualquier tumor maligno que se deriva de una célula del linaje de células B. Los tumores malignos de células B ejemplares incluyen, pero no se limitan a: linfoma no Hodgkin (NHL) de células del subtipo de células B incluyendo NHL de bajo grado/folicular, NHL linfocítico pequeño (SL), NHL folicular de grado intermedio, NHL difuso de grado intermedio, NHL inmunoblástico de alto grado, NHL linfoblástico de alto grado, NHL de célula pequeña no hendida de alto grado; linfoma de células del manto, y NHL de enfermedad voluminosa; linfoma de Burkitt; mieloma múltiple; leucemia linfoblástica aguda de células pre-B y otros tumores malignos que se derivan de precursores tempranos de células B; leucemia linfocítica aguda común (ALL); leucemia linfocítica crónica (CLL) incluyendo CLL de inmunoglobulina mutada y CLL de inmunoglobulina sin mutación; leucemias de células pilosas; leucemia linfoblástica aguda nula; macroglobulinemia de Waldenstrom; linfoma difuso de células B grandes (DLBCL), incluyendo DLBCL de células similares a B centro germinales (GCB), DLBCL de células similares a B activadas (ABC), y DLBCL tipo 3; leucemia pro-linfocítica; enfermedad de cadena ligera; plasmocitoma; mieloma osteosclerótico; leucemia de célula plasmática; gammopatía monoclonal de significado incierto (MGUS); mieloma múltiple quiescente (SMM), mieloma múltiple indolente (IMM); linfoma de Hodgkin incluyendo el tipo clásico y de predominio linfocítico nodular; linfoma linfoplasmacítico (LPL), y linfoma de zona marginal, incluyendo el linfoma de tejido linfoide asociado a la mucosa gástrica (MALT).

La invención se puede emplear para tratar tumores malignos de células B maduras (es decir, expresa Ig en la superficie celular) incluyendo pero no se limita a linfoma folicular, linfoma de células del manto, linfoma de Burkitt, el mieloma múltiple, linfoma difuso de células B grandes (DLBCL), incluyendo DLBCL de células similares a B centro germinales (GCB), DLBCL de células similares a B activadas (ABC), y DLBCL tipo 3, linfoma de Hodgkin incluyendo el tipo clásico y de predominio linfocítico nodular, linfoma linfoplasmacítico (LPL), y linfoma de zona marginal, incluyendo el linfoma de tejido linfoide asociado a la mucosa gástrica (MALT), y leucemia linfocítica crónica (CLL) incluyendo CLL de inmunoglobulina mutada y CLL de inmunoglobulina sin mutación.

Además, CD19 se expresa más temprano en el desarrollo de células B que, por ejemplo, CD20, y por lo tanto es particularmente adecuado para el tratamiento de tumores malignos de células pre-B y células B inmaduras (es decir, no expresan Ig en la superficie celular), por ejemplo, en la médula ósea. Los tumores malignos ilustrativos de células pre-B y células B inmaduras incluyen, pero no se limitan a, leucemia linfoblástica aguda.

La invención puede practicarse para tratar tumores extraganglionares.

5.22.1. Diagnóstico y estadificación de tumores malignos de células B

La progresión del cáncer, tal como una enfermedad o trastorno de células B capaz de la formación de tumor (por ejemplo, linfoma no-Hodgkin, linfoma difuso de células B grandes, linfoma folicular, y linfoma de Burkitt) se caracteriza típicamente por el grado en que el cáncer se ha diseminado a través del cuerpo y con frecuencia se divide en los siguientes cuatro estadios que se pronostican a partir del resultado. Estadio I: El cáncer se localiza en un tejido en particular y no se ha diseminado a los ganglios linfáticos. Estadio II: El cáncer se ha diseminado a los ganglios linfáticos cercanos, es decir, metástasis. Estadio III: El cáncer se encuentra en los ganglios linfáticos dentro de regiones del cuerpo alejadas de los tejidos de origen y puede comprender una masa o múltiples tumores a diferencia de uno. Estadio IV: El cáncer se ha extendido a una parte distante del cuerpo. La estadio de un cáncer se puede determinar por las observaciones clínicas y métodos de prueba que son bien conocidos por aquellas personas con experiencia en la materia. Las estadios del cáncer que se describieron anteriormente se usan tradicionalmente junto con el diagnóstico clínico de los cánceres que se caracterizan por la formación de tumores, y puede usarse en conjunción con las

composiciones y métodos de la presente invención para tratar enfermedades y trastornos de células B. Típicamente el estadio temprano de la enfermedad significa que la enfermedad se mantiene localizada en una parte de un cuerpo del paciente o que no ha metastatizado.

Con respecto a las enfermedades y trastornos de células B que no forman tumor, tal como, pero no se limitan a, mieloma múltiple, difieren los criterios para determinar el estadio de la enfermedad. El Sistema de estadificación de Durie-Salmon se ha usado ampliamente. En este sistema de estadificación, el estadio clínico de la enfermedad (estadio I, II o III) se basa en diversas medidas, que incluyen los niveles de la proteína M, el número de lesiones óseas líticas, los valores de hemoglobina y los niveles séricos de calcio. Los estadios se dividen además de acuerdo a la función renal (riñón) (clasificados como A o B). De acuerdo al Sistema de estadificación de Durie-Salmon el estadio I (masa celular baja) se caracteriza por todo lo siguiente: valor de hemoglobina >10 g/dl; valor de calcio sérico normal o ≤ 12 mg/dl; rayos-x de hueso, estructura ósea normal (escala 0) o sólo plasmocitoma óseo solitario; y baja tasa de producción del componente M: valor de IgG <5 g/dl, valor de IgA <3 g/dl, proteína de Bence Jones <4 g/24 h. Los pacientes en estadio I típicamente no se relacionaron con el deterioro de órganos o tejidos o síntomas. El estadio II (masa celular intermedia) se caracteriza por no ajustarse ni en el estadio I ni en el estadio III. El estadio III (masa celular alta) se caracteriza por uno o más de lo siguiente: valor de hemoglobina <8.5 g/dl; valor de calcio sérico >12 mg/dl; lesiones óseas líticas avanzadas (escala 3); y alta tasa de producción del componente M: valor de IgG >7 g/dl, valor de IgA >5 g/dl, proteína de Bence Jones >12 g/24 h subclasificación (ya sea A o B), donde A es la función renal relativamente normal (valor de creatinina sérica <2.0 mg/dl) y B es la función renal anormal (valor de la creatinina sérica ≥ 2.0 mg/dl).

Otro sistema de estadificación para el mieloma es el Sistema de Estadificación Internacional (ISS) para mieloma. Este sistema puede discriminar más eficazmente entre grupos de estadificación y se basa en niveles séricos de beta 2-microglobulina ($\beta 2$ -M) y albúmina medidos fácilmente. De acuerdo al ISS para mieloma, el Estadio I se caracteriza por $\beta 2$ -M <3.5 y albúmina ≥ 3.5 , el Estadio II se caracteriza por $\beta 2$ -M <3.5 y albúmina <3.5 o $\beta 2$ -M 3.5-5.5, y el Estadio III se caracteriza por $\beta 2$ -M >5.5 (Fundación de Investigación para Mieloma Múltiple, Nueva Canaán, Connecticut).

El estadio de un tumor maligno de células B en un paciente es una determinación clínica. Como se indicó anteriormente, con respecto a los tumores sólidos, la distribución, ubicación y número de tumores son los principales factores en la determinación clínica del estadio. La determinación del estadio en pacientes con tumores malignos que no forman tumores de células B puede ser más complejo requiriendo de mediciones a nivel sérico como se describió anteriormente.

Las descripciones anteriores de los estadios de enfermedades y trastornos de células B no son limitativas. Otras características conocidas en la materia para el diagnóstico de enfermedades y trastornos de células B se pueden usar como criterios para determinar por paciente los estadios de enfermedades o trastornos de células B.

5.22.2. Criterios clínicos para el diagnóstico de tumores malignos de células B

Los criterios de diagnóstico para diferentes tumores malignos de células B se conocen en la materia. Históricamente, el diagnóstico se basa típicamente en una combinación de apariencia microscópica y el inmunofenotipo. Más recientemente, las técnicas moleculares, tal como el perfil de expresión génica se han aplicado para desarrollar definiciones moleculares de tumores malignos de células B (ver, por ejemplo, Shaffer y otros, Nature 2:920-932 (2002)). Los métodos ejemplares para el diagnóstico clínico de tumores malignos de células B en particular se proporcionan a continuación. Otros métodos adecuados serán evidentes para aquellos con experiencia en la materia.

5.22.2.1. NHL folicular

En general, la mayoría de los NHL (con la excepción de linfoma de células del manto) tienen muy mutado los genes de inmunoglobulina que parecen ser el resultado de la hipermutación somática (SHM). Las anomalías genéticas más comunes en los NHL son las translocaciones y mutaciones en el gen *BCL6*.

El NHL folicular es con frecuencia un linfoma de células B indolente con un patrón de crecimiento folicular. Es el segundo linfoma más común en los Estados Unidos y Europa Occidental. La edad media en la que esta enfermedad se presenta es de 60 años y existe un ligero predominio del sexo femenino. La linfadenopatía indolora es el síntoma más común. Las pruebas indican con frecuencia la afectación de la médula ósea y, a veces la sangre periférica. El NHL folicular se divide en grados citológicos en base a la relación de células grandes en el folículo con los grados formando un continuo desde la célula folicular pequeña escindida a predominio de células grandes. (Ver, S. Freedman, y otros, Follicular Lymphoma, págs. 367-388, en Non-Hodgkin's Lymphomas, P. Mauch y otros, ediciones., Lippincott Williams & Wilkins, Filadelfia, Pensilvania (2004); T. Lister y otros, Follicular Lymphoma, págs. 309-324, en Malignant Lymphoma, B. Hancock y otros, ediciones, Oxford University Press, Nueva York, N.Y. (2000)).

La mayoría de NHL folicular se caracteriza por una translocación entre los cromosomas 14 y 18 que resulta en la sobreexpresión de *BCL2*. El NHL folicular se caracteriza también tanto por SHM como SHM continua y un perfil de expresión génica similar al de las células B de centro germinal (CG) (ver, por ejemplo, Shaffer y otros, *Nature* 2:920-932 (2002)), que son células potenciales de origen para este tumor maligno. Los reordenamientos de la cadena pesada y ligera son típicos. Las células tumorales de esta enfermedad expresan inmunoglobulina de superficie monoclonal con la mayoría expresando IgM. Casi todas las células tumorales de NHL folicular expresan los antígenos CD19, CD20, CD22, CD79a, CD21, CD35 y CD10, pero carecen de la expresión de CD5 y CD43. La infiltración paratrabecular con células pequeñas hendidas se observa en la médula ósea. (Ver, S. Freedman, y otros, *Follicular Lymphoma*, págs. 367-388, en *Non-Hodgkin's Lymphomas*, P. Mauch y otros, ediciones., Lippincott Williams & Wilkins, Filadelfia, Pensilvania (2004); T. Lister y otros, *Follicular Lymphoma*, págs. 309-324, en *Malignant Lymphoma*, B. Hancock y otros, ediciones, Oxford University Press, Nueva York, N.Y. (2000)).

El diagnóstico de NHL folicular en general, se basa en la biopsia de un ganglio extirpado para evaluar la arquitectura del tejido y las características citológicas. Las aspiraciones con aguja fina no son adecuadas en general, ya que con este procedimiento es menos probable proporcionar tejidos que se puedan evaluar y fracasa al proporcionar suficiente tejido para pruebas adicionales. Las biopsias bilaterales de médula ósea se indican también ya que la afectación puede ser irregular. Procedimientos de diagnóstico adicionales incluyen rayos-x de tórax, análisis por tomografía axial computarizada (CT) de tórax, abdomen, cuello y pelvis, hemograma completo y perfil químico. La citometría de flujo e inmunohistoquímica se pueden usar para distinguir entre NHL folicular y otros linfomas de células B maduras. (Ver, S. Freedman, y otros, *Follicular Lymphoma*, págs. 367-388, en *Non-Hodgkin's Lymphomas*, P. Mauch y otros, ediciones., Lippincott Williams & Wilkins, Filadelfia, Pensilvania (2004); T. Lister y otros, *Follicular Lymphoma*, págs. 309-324, en *Malignant Lymphoma*, B. Hancock y otros, ediciones, Oxford University Press, Nueva York, N.Y. (2000)).

5.22.2.2. Linfoma de células del manto

El linfoma de células del manto se localiza en la región del manto de los folículos secundarios y se caracteriza por un patrón de crecimiento nodular y/o difuso. Los pacientes con linfoma de células del manto tienen la edad media de 60-65 años con la enfermedad afectando predominantemente a masculinos. Para los propósitos de diagnóstico, la característica de presentación habitual es una linfadenopatía generalizada. Además, el bazo se dilata con frecuencia. Este linfoma de células B se relaciona con un t(11;14) entre el locus IgH y el gen de ciclina D1, lo que resulta en la sobreexpresión de ciclina D1. Más del 50% de los casos muestran anomalías cromosómicas adicionales. El linfoma de células del manto no se caracteriza típicamente por SHM. (Ver, W. Hiddemann y otros, *Mantle Cell Lymphoma*, págs. 461-476, en *Non-Hodgkin's Lymphomas*, P. Mauch y otros, ediciones., Lippincott Williams & Wilkins, Filadelfia, Pensilvania (2004); D. Weisenburger y otros., *Mantle Cell Lymphoma*, págs. 28-41, en *Malignant Lymphoma*, B. Hancock y otros, ediciones., Oxford University Press, Nueva York, N.Y. (2000)).

El inmunofenotipaje (citometría de flujo o sección congelada) por inmunohistoquímica de las células del linfoma celular del manto muestra que ellas casi siempre son monoclonales, portadoras de IgM de superficie. Las células del linfoma celular del manto se observaron también que portan IgD de superficie. Las células expresan los antígenos CD19, CD20, CD22 y CD24, pero no CD23. Expresan también antígenos de superficie CD5, pero no de CD10, que las distingue de los linfomas verdaderos de células centro folicular que casi siempre son CD5 negativo. Con frecuencia, se encuentra incluida en la afectación extraganglionar la infiltración de médula ósea y tumores del hígado y tracto gastrointestinal. La anemia leve y expresión leucémica no es rara con el linfoma de células del manto. (Ver, Lal y otros, *Role of Fine Needle Aspiration in Lymphoma*, págs. 181-220, en W. Finn y otros., ediciones, *Hematopathology in Oncology*, Kluwer Academic Publishers, Norwell, Massachusetts (2004); W. Hiddemann y otros, *Mantle Cell Lymphoma*, págs. 461-476, en *Non-Hodgkin's Lymphomas*, P. Mauch y otros, ediciones, Lippincott Williams & Wilkins, Filadelfia, Pensilvania (2004)).

El diagnóstico de linfoma de células del manto involucra el examen de la sangre periférica, así como las biopsias de médula ósea y ganglios linfáticos. Además, los estudios citogenéticos y de inmunofenotipo son útiles en el diagnóstico diferencial. (Ver, W. Hiddemann, y otros, *Mantle Cell Lymphoma* pp. 461-476, en *Non-Hodgkin's Lymphomas*, P. Mauch, y otros, ediciones, Lippincott Williams & Wilkins, Filadelfia, Pensilvania (2004); D. Weisenburger, y otros, *Mantle Cell Lymphoma*, págs. 28-41, en *Malignant Lymphoma*, B. Hancock, y otros, ediciones., Oxford University Press, Nueva York, N.Y. (2000)).

5.22.2.3. Linfoma de Burkitt

El linfoma de Burkitt es un linfoma de células B agresivo típicamente se observa en niños y adultos jóvenes, y se asocia generalmente con enfermedad voluminosa de la mandíbula y/o abdomen. Aproximadamente el 20% de los pacientes tienen afectación de la médula ósea. Una forma endémica del linfoma de Burkitt involucra la infección de células malignas por virus de Epstein-Barr (EBV); la forma esporádica es independiente de la infección por EBV. Una translocación de *c-myc* a los loci de inmunoglobulina, que resulta en la desregulación del gen *c-myc*, es característico de

esta enfermedad (t (8;14) (q24;q32)). Interesantemente, las supresiones de las secuencias de *c-myc* parece que se involucran en la forma esporádica de la enfermedad, mientras que la forma endémica involucra por lo general mutaciones puntuales o inserciones. (Ver, V. Pappa, y otros, Molecular Biology, págs. 133-157, en Malignant Lymphoma, B. Hancock, y otros, ediciones, Oxford University Press, Nueva York, N.Y. (2000)). El linfoma de Burkitt se caracteriza también por SHM, y las células malignas tienen un perfil de expresión génica similar a las células B de GC, lo que sugiere que este tumor maligno se deriva de las células B de GC.

El inmunofenotipo del linfoma de Burkitt muestra que las células de esta enfermedad expresan CD19, CD20, CD22 y CD79a, pero no CD5, CD23, ciclina D o desoxinucleotidil transferasa terminal. Con frecuencia, estas células son positivas para CD10 y *BCL6* y negativas por lo general para *BCL2*. (Ver, I. Magrath, y otros, Burkitt's Lymphoma, págs. 477-501, en Non-Hodgkin's Lymphomas, P. Mauch, y otros, ediciones, Lippincott Williams & Wilkins, Filadelfia, Pensilvania (2004)).

El linfoma de alto grado de células B similar a Burkitt es un linfoma límite entre el linfoma de Burkitt y el linfoma de células B grandes. Las células de este linfoma expresan CD19, CD20, y CD22, pero se ausenta con frecuencia la expresión de CD10, que está casi siempre presente en el verdadero linfoma de Burkitt. Debido a esta y otras características, algunos creen que este linfoma se debe clasificar como un linfoma difuso de células B grandes. (Ver, K. MacLennan, Diffuse Aggressive B cell Lymphoma, págs. 49-54, en Malignant Lymphoma, B. Hancock, y otros, ediciones, Oxford University Press, Nueva York, N.Y. (2000)).

El diagnóstico del linfoma de Burkitt se basa en general, en la detección de la translocación asociada con este linfoma, de este modo se realiza generalmente el análisis citogenético convencional. Las técnicas de reacción en cadena de la polimerasa a larga distancia e hibridación fluorescente de in situ (FISH) se usaron para detectar las uniones Ig-myc en las translocaciones y otras alteraciones genéticas asociadas con esta enfermedad. (Ver, R. Siebert, y otros, Blood 91:984-990 (1998); T. Denyssevy, y otros, Leukemia, 16:276-283 (2002)).

5.22.2.4. Linfoma difuso de células B grandes (DLBCL)

El DLBCL es el más común linfoma no Hodgkin y puede derivar de un linfoma de células B pequeñas, linfoma folicular o linfoma de zona marginal. Típicamente, los pacientes se presentan con linfadenopatía; sin embargo, un gran por ciento de pacientes presenta también en sitios extraganglionares, siendo el más común con afectación gastrointestinal. La afectación de la médula ósea se observa en aproximadamente el 15% de los pacientes. (Ver, Armitage, y otros, Diffuse Large B cell Lymphoma, págs. 427-453, en Non-Hodgkin's Lymphomas, P. Mauch, y otros, ediciones, Lippincott Williams & Wilkins, Filadelfia, Pensilvania (2004)). La heterogeneidad en las características clínicas, biológicas y morfológicas de este grupo de linfomas lo hace difícil de subclasificar. Sin embargo, dos subgrupos diferentes se identificaron uno con los genes que expresan la característica de las células B centro germinal (GC-DLBCL) y el otro con genes que se sobreexpresan en las células B de sangre periférica. Las tasas de supervivencia son significativamente mejores para los pacientes con GC-DLBCL que aquellos con DLBCL de células B activadas tipo (ABC). (Ver, W. Chan, Archives of Pathology and Laboratory Medicine 128(12): 1379-1384 (2004)).

Los DLBCL expresan los antígenos de superficie celular CD19, CD20, CD22 y CD79a. CD10 se expresa en la gran mayoría de los casos y la expresión CD5 se observa en aproximadamente el 10% de los casos. (Ver, K. MacLennan, Diffuse Aggressive B cell Lymphoma, págs. 49-54, en Malignant Lymphoma, B. Hancock, y otros, ediciones, Oxford University Press, Nueva York, N.Y. (2000)). El DLBCL se marca con frecuencia por anomalías de *BCL6* y/o translocaciones de *BCL2* para el locus IgH. El DLBCL (GC) similar a las células B de GC se caracteriza por la SHM con genes de inmunoglobulinas altamente mutados y la SHM continua en los clones de tumores malignos con un perfil de expresión génica similar al de células B de GC. La mayoría de DLBCL GC ha experimentado el cambio de clase de inmunoglobulina. El DLBCL-ABC se caracteriza por el alto nivel de expresión de los genes diana de NF-kB como *BCL2*, factor regulador de interferón 4, CD44, FLIP y ciclina D. La SHM, pero no la SHM continúa, está presente y el DLBCL-ABC no tiene un perfil de expresión génica de células B de GC. La mayor parte de DLBCL-ABC expresa un alto nivel de IgM.

5.22.2.5. Linfoma extraganglionar de zona marginal

El linfoma extraganglionar de zona marginal es un linfoma extraganglionar que se produce en órganos que carecen normalmente de tejido linfoide organizado (por ejemplo, estómago, glándulas salivales, pulmones y glándulas tiroides). Es una enfermedad que afecta en gran medida a los adultos mayores con una edad media de más de 60 años. Con frecuencia, la inflamación crónica o procesos autoinmunes preceden el desarrollo del linfoma. El linfoma de tejido linfoide asociado a mucosa gástrica (MALT), el tipo de linfoma de zona marginal más común, se asocia con la infección por *Helicobacter pylori*. Los estudios mostraron una solución de los síntomas con la erradicación de la infección por *H. pylori* seguido de un régimen de antibióticos. Los síntomas que se presentan para el linfoma gástrico MALT incluyen dispepsia

inespecífica, dolor epigástrico, náuseas, hemorragia gastrointestinal y anemia. Los síntomas sistémicos no son comunes, como son los niveles elevados de lactato deshidrogenasa ácida. (Ver, J. Yahalom, y otros, Extraganglionar Marginal Zone B cell Lymphoma of Mucosa- Associated Lymphoid Tissue, págs. 345-360, en Non-Hodgkin's Lymphomas, P. Mauch, y otros, ediciones, Lippincott Williams & Wilkins, Filadelfia, Pensilvania (2004); J. Radford, Other Low-Grade Non-Hodgkin's Lymphomas, págs. 325-330, en Malignant Lymphoma, B. Hancock, y otros, ediciones, Oxford University Press, Nueva York, N.Y. (2000). Los síntomas sistémicos de B incluyen fiebre mayor que 38 °C durante más de 2 semanas sin signos de infección, sudores nocturnos, fatiga extrema, pérdida de peso involuntaria, de mayor o igual al 10% del peso corporal en los 6 meses anteriores).

El inmunofenotipo del linfoma MALT se caracteriza por la expresión de CD19, CD20, CD79a, CD21 y CD35 y la carencia de expresión de CD5, CD23 y CD10. Aproximadamente la mitad de los linfomas MALT expresan CD43. La inmunoglobulina que se expresa típicamente en las células tumorales de esta enfermedad es la IgM mientras la IgD no se expresa. Estas características son de importancia para distinguir este linfoma de otros linfomas de células B pequeñas, tales como linfoma de células del manto, linfoma linfocítico y linfoma folicular. La trisomía 3 se ha reportado en 60% de los casos de linfoma MALT. En un 25-40% de los linfomas MALT gástricos y pulmonares se observa una t(11;18). Esta translocación se observa con mucho menos frecuencia que en otros linfomas MALT. La t(11;18) se asocia con la expresión nuclear de *BCL10*. (Ver, J. Yahalom, y otros, Extraganglionar Marginal Zone B cell Lymphoma of Mucosa- Associated Lymphoid Tissue, págs. 345-360, en Non-Hodgkin's Lymphomas, P. Mauch, y otros, ediciones, Lippincott Williams & Wilkins, Filadelfia, Pensilvania (2004)). Los linfomas de zona marginal se caracterizan generalmente por SHM y SHM continua.

Los procedimientos de diagnóstico incluyen el inmunofenotipo o citometría de flujo para determinar la identidad de los marcadores de superficie celular. Además, el análisis genético molecular se debe hacer para determinar la presencia de t(11;18), ya que este es un indicador de la enfermedad que no responderá a los antibióticos. La histología se puede usar para determinar la presencia de *H. pylori*. Las pruebas adicionales deben incluir un hemograma completo, pruebas bioquímicas básicas que incluyen aquella para lactato deshidrogenasa ácida, tomografías computarizadas de abdomen, tórax y pelvis y una biopsia de médula ósea. (Ver, J. Yahalom, y otros, Extraganglionar Marginal Zone B cell Lymphoma of Mucosa-Associated Lymphoid Tissue, págs. 345-360, en Non-Hodgkin's Lymphomas, P. Mauch, y otros, ediciones, Lippincott Williams & Wilkins, Filadelfia, Pensilvania (2004)).

5.22.2.6. Linfoma ganglionar de células B de zona marginal

El linfoma ganglionar de células B de zona marginal es un linfoma recién clasificado, por lo tanto se ha publicado poco sobre este. Es un linfoma de células B ganglionar primario que comparte características genéticas y morfológicas con los linfomas extraganglionar y esplénico de zona marginal, pero no se localiza en el bazo ni extraganglionar. Se ha reportado que el virus de la hepatitis C se asocia con este linfoma cuando se tiene el síndrome de Sjögren. (Ver, F. Berger, y otros, Nodal Marginal Zone B cell Lymphoma, págs. 361-365, en Non-Hodgkin's Lymphomas, P. Mauch, y otros, ediciones, Lippincott Williams & Wilkins, Filadelfia, Pensilvania (2004)).

El linfoma ganglionar de zona marginal tiene una citología y morfología heterogénea. Debido a su proporción relativamente alta de células grandes este linfoma, a diferencia de los otros linfomas marginales (esplénico y extraganglionar), no se puede clasificar como linfoma de células B de bajo grado verdadero. El fenotipo genético e inmunológico del linfoma ganglionar de zona marginal incluye la expresión de CD19, CD20, CD22, *BCL2*, IgM e IgG citoplasmática (Igc). Estas células no expresan CD5, CD10, CD23, CD43 y ciclina D1. La translocación característica del linfoma MALT, t(11;18), no se observa para el linfoma ganglionar de zona marginal. Estas características ayudan en el diagnóstico diferencial de este linfoma de otros linfomas de células B pequeñas. (Ver, F. Berger, y otros, Nodal Marginal Zone B cell Lymphoma, págs. 361-365, en Non-Hodgkin's Lymphomas, P. Mauch, y otros, ediciones, Lippincott Williams & Wilkins, Filadelfia, Pensilvania (2004)).

5.22.2.7. Linfoma esplénico de zona marginal

El linfoma esplénico de zona marginal es un linfoma de células B micro-ganglionar indolente con una presentación clínica característica de esplenomegalia prominente e infiltración de la sangre periférica y médula ósea. Además, se reportó un nivel relativamente alto de la afectación del hígado. Un papel del virus de la hepatitis C se ha postulado para este linfoma. El inmunofenotipo del linfoma esplénico de zona marginal es típicamente CD19⁺, CD20⁺, IgD⁺, *BCL2*⁺, p27⁺, CD3⁺, CD5⁺, CD10⁺, CD23⁺, CD38⁺, CD43⁺, *BCL-6*⁺, y ciclina D1⁺. Las características genéticas incluyen la supresión de 7q, alteraciones de p53 y SHM. (Ver, M. Piris, y otros, Splenic Marginal Zone Lymphoma, págs. 275-282, en Non-Hodgkin's Lymphomas, P. Mauch, y otros, ediciones, Lippincott Williams & Wilkins, Filadelfia, Pensilvania (2004)).

El diagnóstico se basa generalmente en el inmunofenotipo para determinar la identidad de los marcadores de la superficie celular. Los análisis genéticos y bioquímicos, en combinación con datos sobre los marcadores de la superficie

celular, ayudan a diferenciar este linfoma de otros linfomas de células B pequeñas. (Ver, M. Pirus, y otros, Splenic Marginal Zone Lymphoma, págs. 275-282, en Non-Hodgkin's Lymphomas, P. Mauch, y otros, ediciones, Lippincott Williams & Wilkins, Filadelfia, Pensilvania (2004)).

5 5.22.2.8. Leucemia linfocítica (células B) aguda (ALL)

La ALL es una neoplasia basada en la médula ósea que afecta en gran medida a niños con la incidencia más alta entre 1-5 años. Los síntomas más comunes de presentación incluyen fatiga, letargo, fiebre y dolor óseo y articular. La fatiga y el letargo se correlacionan con el grado de anemia presente. Un conteo elevado de glóbulos blancos es común en la presentación. Las radiografías de tórax muestran con frecuencia lesiones óseas. La propagación extramedular es común

10 e involucra el sistema nervioso central, testículos, ganglios linfáticos, hígado, bazo y riñón. Las masas en el mediastino anterior se observan aproximadamente en sólo el 5-10% de los casos recién diagnosticados. (Ver, J. Whitlock, y otros, Acute Lymphocytic Leukemia, págs. 2241-2271, en Wintrobe's Clinical Hematology, Décima Edición, G. Lee, y otros, ediciones Williams & Wilkins, Baltimore, Maryland (1999)).

El inmunofenotipo de ALL es CD10⁺, CD19⁺, CD20⁺, CD22⁺ y CD24⁺. La célula pre-B de las células ALL expresa la inmunoglobulina citoplásmica, pero no de superficie, mientras que la célula B madura de ALL (que responde por sólo el 1-2% de los casos de ALL) se distingue de otras leucemias de linaje de células B por la expresión de la inmunoglobulina de superficie. Las características citogenéticas de ALL incluyen t(8;14), t(2;8) y t(8;22). A pesar de que rara vez se detecta en el nivel citogenético t(12;21) puede ser la anomalía citogenética más común asociada con la ALL infantil (se observa en aproximadamente el 25% de los casos). (Ver, M. Kinney, y otros, Classification and Differentiation of the Acute Leukemias, págs. 2209-2240, en Wintrobe's Clinical Hematology, Décima Edición, G. Lee, y otros, ediciones Williams & Wilkins, Baltimore, Maryland (1999); J. Whitlock, y otros, Acute Lymphocytic Leukemia, págs. 2241-2271; En Wintrobe's Clinical Hematology, Décima Edición, G. Lee, y otros, ediciones Williams & Wilkins, Baltimore, Maryland, (1999))

15 20 25

El diagnóstico preciso de la leucemia aguda se basa generalmente en un aspirado y biopsia de médula. Los frotis de aspirado se usan para las evaluaciones morfológicas, inmunológicas y citológicas. La demostración de linfoblastos en la médula ósea es diagnóstico de ALL. La presencia mayor que 5% de células leucémicas de linfoblastos en la médula

30 ósea confirma el diagnóstico de ALL, pero la mayoría requieren mayor que 25% para un diagnóstico definitivo. Las punciones lumbares se usan para diagnosticar la afectación del sistema nervioso central. Los niveles séricos de ácido úrico y niveles séricos de lactato deshidrogenasa se encontraron que se elevan en ALL. (Ver, M. Kinney, y otros, Classification and Differentiation of the Acute Leukemias, págs. 2209-2240, en Wintrobe's Clinical Hematology, Décima Edición, G. Lee, y otros, ediciones Williams & Wilkins, Baltimore, Maryland (1999); J. Whitlock, y otros, Acute Lymphocytic Leukemia, págs. 2241-2271; En Wintrobe's Clinical Hematology, Décima Edición, G. Lee, y otros, ediciones Williams & Wilkins, Baltimore, Maryland, (1999)).

35

5.22.2.9. Leucemia linfocítica crónica (CLL)/linfoma linfocítico de células B pequeñas (SLL)

La CLL/SLL es el tipo más común de leucemia. Cuando la enfermedad involucra la sangre periférica y médula ósea se le denomina como CLL. Sin embargo, cuando los ganglios linfáticos y otros tejidos se infiltran por células que son inmunológicamente y morfológicamente idénticas a las de CLL, pero donde las características leucémicas de la enfermedad están ausentes, entonces la enfermedad se denomina como SLL. Esta enfermedad afecta grandemente a los ancianos presentándose con una mayor incidencia de la enfermedad en hombres que en mujeres. La linfadenopatía indolora es el hallazgo más común de la presentación. La hipogammaglobulinemia es común con la mayoría de los casos de CLL/SLL que presentan niveles reducidos de todas las inmunoglobulinas en lugar de cualquier subclase de las inmunoglobulinas en particular. Los pacientes asintomáticos se diagnostican con frecuencia durante los conteos de sangre de rutina (conteo de linfocitos de más de $5000 \times 10^9/l$). Hasta el 20% de los casos de CLL/SLL reportan síntomas de B. Una característica adicional de diagnóstico es la infiltración de la médula ósea con más del 30% de linfocitos inmaduros. Las biopsias de ganglios linfáticos en general, muestran la infiltración de ganglios involucrados con linfocitos bien diferenciados. Los fenómenos autoinmunes se asocian con frecuencia al CLL/SLL incluyendo anemia hemolítica autoinmune y trombocitopenia inmune. (Ver, J. Gribben, y otros, Small B cell Lymphocytic Lymphoma/Chronic Lymphocytic Leukemia and Prolymphocytic Leukemia, págs. 243-261, en Non-Hodgkin's Lymphomas, P. Mauch, y otros, ediciones, Lippincott Williams & Wilkins, Filadelfia, Pensilvania (2004); K. MacLennan, Diffuse Indolent B cell Neoplasms, págs. 43-47, en Malignant Lymphoma, B. Hancock, y otros, ediciones, Oxford University Press, Nueva York, N.Y. (2000); Clinical Oncology, A. Neal, y otros, Neal, Hoskin y Oxford University Press, co-publicación, Nueva York, NY (2003)).

40 45 50 55

A diferencia de muchos de los tumores malignos de células B de grado bajo, las translocaciones recíprocas no aleatorias rara vez se encuentran en la CLL/SLL. Sin embargo, otras anomalías citogenéticas se reportaron como supresiones en 13q14, 11q22-23 y 17q13, con los dos últimos involucrando el locus p53. Aproximadamente el 20% de los casos presentan la trisomía 12. Un nivel elevado de β -2microglobulina, niveles superiores de expresión de CD38 y la

60

producción del factor de necrosis tumoral-alfa son todas características del CLL/SLL. El inmunofenotipo de CLL/SLL se diagnóstica bien e incluye la débil expresión de inmunoglobulina de superficie generalmente IgM, o IgM e IgG, así como la expresión de los antígenos celulares CD19, CD22, CD20 y generalmente CD5 y CD23. (Ver, J. Gribben, y otros, Small B cell Lymphocytic Lymphoma/Chronic Lymphocytic Leukemia and Prolymphocytic Leukemia, págs. 243-261, en Non-Hodgkin's Lymphomas, P. Mauch, y otros, ediciones, Lippincott Williams & Wilkins, Filadelfia, Pensilvania (2004); K. MacLennan, Diffuse Indolent B cell Neoplasms, págs. 43-47, en Malignant Lymphoma, B. Hancock, y otros, ediciones, Oxford University Press, Nueva York, N.Y. (2000)).

5.22.2.10. Leucemia prolinfocítica de células B (PLL)

La PLL, que se consideró una vez una variante de CLL, se entiende ahora que sea una enfermedad distinta. La PLL es generalmente una enfermedad de hombres ancianos y se caracteriza por un muy alto conteo de glóbulos blancos (más de $200 \times 10^9/l$) y esplenomegalia. Los síntomas adicionales incluyen la anemia y trombocitopenia. Los prolinfocitos en PLL comprenden más del 55% de las células en la sangre y médula ósea. A diferencia de CLL, los fenómenos autoinmunes se observan rara vez en PLL. (Ver, J. Gribben, y otros, Small B cell Lymphocytic Lymphoma/Chronic Lymphocytic Leukemia and Prolymphocytic Leukemia, págs. 243-261, en Non-Hodgkin's Lymphomas, P. Mauch, y otros, ediciones, Lippincott Williams & Wilkins, Filadelfia, Pensilvania (2004)).

El inmunofenotipo de PLL se caracteriza por la expresión de CD19, CD21, CD22, CD24 y FMC7. Las células de PLL no expresan CD23 y la mayoría no expresan CD5. Las células de PLL presentan anomalías cromosómicas complejas, con supresiones siendo algunas de las más frecuentes en 13q14 y 11q23. El patrón de mutación p53 en las células de PLL es diferente de la observada para CLL. El diagnóstico diferencial se basa por lo general, en el hemograma completo, análisis histológico, inmunofenotipo y genético. (Ver, J. Gribben, y otros, Small B cell Lymphocytic Lymphoma/Chronic Lymphocytic Leukemia and Prolymphocytic Leukemia, págs. 243-261, en Non-Hodgkin's Lymphomas, P. Mauch, y otros, ediciones, Lippincott Williams & Wilkins, Filadelfia, Pensilvania (2004)).

5.22.2.11. Leucemia de células pilosas (HCL)

HCL es una leucemia rara, indolente crónica que afecta más a hombres que mujeres y en gran parte aquellos de mediana edad. Los síntomas típicos incluyen esplenomegalia y pancitopenia masivas. La sangre periférica y médula ósea contienen las "células peludas" típicas, que son linfocitos B con proyecciones citoplasmáticas. Más del 90% de los pacientes de HCL tienen infiltración de la médula ósea. (Ver, Clinical Oncology, A. Neal, y otros, Neal, Hoskin y Oxford University Press, co-publicación, Nueva York, NY (2003); J. Johnston, Hairy Cell Leukemia, págs. 2428-2446, en Wintrobe's Clinical Hematology, Décima Edición, G. Lee y otros, ediciones Williams & Wilkins, Baltimore, Maryland (1999)).

El análisis citogenético ha demostrado que las anomalías clonales se presentan en el 19% de los casos e involucran anomalías numéricas y estructurales de los cromosomas 5, 7 y 14. El nivel sérico de TNF- α es elevado en la leucemia de células pilosas y se correlaciona con la carga tumoral. Las células de la leucemia de células pilosas expresan inmunoglobulinas de superficie (IgG e IgM) y CD11c, CD19, CD20, CD22 y típicamente CD25. Además, FMC7, HC-2 y CD103 se expresan. Las células de HCL no expresan CD5 o CD10. El diagnóstico involucra generalmente el uso de los aspirados de médula ósea, citogenética, frotis de sangre e inmunofenotipo. (Ver, Clinical Oncology, A. Neal, y otros, Neal, Hoskin y Oxford University Press, co-publicación, Nueva York, NY (2003); J. Johnston, Hairy Cell Leukemia, págs. 2428-2446, en Wintrobe's Clinical Hematology, Décima Edición, G. Lee y otros, ediciones, Williams & Wilkins, Baltimore, Maryland (1999)).

5.22.2.12. Linfoma linfoblástico de células B precursoras/leucemia linfoblástica aguda de células pre-B/linfoma linfoblástico

El linfoma linfoblástico de células B precursoras/leucemia linfoblástica aguda de células pre-B/linfoma linfoblástico es una enfermedad de células T o B precursoras. Los linfomas linfoblásticos de células T y B son morfológicamente idénticos, pero se pueden hacer diferencias clínicas en base al grado de infiltración de la médula ósea o afección de la médula ósea. El 85-90% de los linfomas linfoblásticos se derivan de célula T sobre el resto que se deriva de la célula B. El linfoma linfoblástico tiene una edad media de 20 años con un predominio del sexo masculino. Participación de los ganglios linfáticos periféricos es un rasgo común en la presentación, que se produce especialmente en las regiones cervical, supraclavicular y axilar. Esta enfermedad se presenta frecuentemente con la afectación de la médula ósea. El sistema nervioso central es menos común en la presentación, pero aparece con frecuencia en los casos de recaída. Otros sitios de afectación pueden incluir el hígado, bazo, hueso, piel, faringe y testículos (Ver, J. Sweetenham, y otros, Precursor B- and T-Cell Lymphoblastic Lymphoma, págs. 503-513, en Non-Hodgkin's Lymphomas, P. Mauch, y otros, ediciones, Lippincott Williams & Wilkins, Filadelfia, Pensilvania (2004)).

Los linfomas linfoblásticos de células B precursoras expresan marcadores inmaduros de marcadores de células B como CD99, CD34 y desoxinucleotidil transferasa terminal. Estas células expresan también CD79a, CD19, CD22 y algunas veces CD20 y típicamente carecen de la expresión de CD45 e inmunoglobulina de superficie. Las translocaciones en 11q23, así como t(9;22) (q34;q11.2) y t(12;21) (p13;q22), se asociaron con mal pronóstico. El buen pronóstico se asocia con el cariotipo hiperdiploide, especialmente que se asocia con trisomía 4, 10, y 17 y t (12;21)(p13;q22). (Ver, J. Sweetenham, y otros, Precursor B- and T-Cell Lymphoblastic Lymphoma, págs. 503-513, en Non-Hodgkin's Lymphomas, P. Mauch, y otros, ediciones, Lippincott Williams & Wilkins, Filadelfia, Pensilvania (2004)).

Las pruebas de diagnóstico incluyen biopsias de ganglios linfáticos, pruebas de sangre, rayos-x, análisis por CT, y punciones lumbares para examinar el líquido cefalorraquídeo para células malignas.

5.22.2.13. Linfoma primario mediastínico de células B grandes

El linfoma primario mediastínico de células B grandes es un linfoma difuso de células B grandes que se presenta predominantemente en mujeres jóvenes y se caracteriza por una masa mediastínica anterior localmente invasiva que se origina en el timo. La diseminación a distancia a los ganglios periféricos y médula ósea es poco común. Los síntomas sistémicos son comunes. Si bien esta enfermedad se asemeja a los linfomas ganglionares de células grandes, tiene diferentes características genéticas, inmunológicas y morfológicas.

El inmunofenotipo de las células tumorales de linfoma primario mediastínico de células B grandes es con frecuencia negativo a la inmunoglobulina de superficie, pero expresa las células B de este tipo asociadas antígenos como CD19, CD20, CD22 y CD79a. Se expresan comúnmente también CD10 y *BCL6*. La expresión de marcadores asociados a células plasmáticas CD15, CD30, antígeno de membrana epitelial (EMA) es rara. Los arreglos de genes *BCL6* y *c-myc* son raros también. La presencia de reordenamientos clonales de inmunoglobulinas, hipermutación de la región variable de inmunoglobulina y génica, junto con la hipermutación de *BCL6* sugiere que este linfoma se deriva de una célula B de centro germinal maduro o centro post-germinal. Las translocaciones cromosómicas que parecen estar asociadas con los tumores de esta enfermedad son similares a aquellas observadas en otras formas de linfoma difuso de células grandes. (Ver, P. Zinzani, y otros, Primary Mediastinal Large B cell Lymphoma, págs. 455-460, en Non-Hodgkin's Lymphomas, P. Mauch, y otros, ediciones, Lippincott Williams & Wilkins, Filadelfia, Pensilvania (2004)).

La evaluación diagnóstica para el linfoma primario mediastínico de células B grandes incluye generalmente un examen físico completo, análisis hematológico y bioquímico completo, tomografía computarizada de todo el cuerpo y biopsia de médula ósea. La detección de galio-67 es una prueba útil para la estadificación, respuesta al tratamiento y para la evaluación de la recaída. (Ver, P. Zinzani y otros, Primary Mediastinal Large B cell Lymphoma, págs. 455-460, en Non-Hodgkin's Lymphomas, P. Mauch, y otros, ediciones, Lippincott Williams & Wilkins, Filadelfia, Pensilvania (2004)).

5.22.2.14. Linfoma linfoplasmacítico (LPL)/inmunocitoma linfoplasmacítico/macroglobulinemia de Waldström

El LPL/Inmunocitoma linfoplasmacítico/Macroglobulinemia de Waldström es un linfoma ganglionar que es generalmente indolente, e involucra con frecuencia a la médula ósea, ganglios linfáticos y bazo. Esto es generalmente una enfermedad de adultos mayores con predominio ligero de hombres. La mayoría de los pacientes tienen paraproteína IgM monoclonal en sus sueros (>3g/dl), lo que resulta en la hiperviscosidad del suero. Las células tumorales tienen una morfología plasmacítica. Un subconjunto de LPL se caracteriza por translocaciones recurrentes entre los cromosomas 9 y 14, que involucra la *PAX5* y los loci de inmunoglobulina de cadena pesada. La LPL se caracteriza por SHM, así como SHM continua, y se cree que se deriva de células B post-GC. (Ver, A. Rohatiner, y otros, Lymphoplasmacytic Lymphoma and Waldström's Macroglobulinemia, págs. 263-273, en Non-Hodgkin's Lymphomas, P. Mauch, y otros, ediciones, Lippincott Williams & Wilkins, Filadelfia, Pensilvania (2004); K. MacLennan, Diffuse Indolent B cell Neoplasms, págs. 43-47, en Malignant Lymphoma, B. Hancock, y otros, ediciones, Oxford University Press, Nueva York, N.Y. (2000); A. Lal, y otros, Role of Fine Needle Aspiration in Lymphoma, págs. 181-220, en W. Finn, y otros, ediciones, Hematopathology in Oncology, Kluwer Academic Publishers, Norwell, Massachusetts (2004)).

El inmunofenotipo de esta enfermedad muestra la expresión de las células B asociadas a los antígenos CD19, CD20, CD22, y CD79a y una carencia de expresión de CD5, CD10, y CD23. La presencia de inmunoglobulina de superficie sólida y CD20, la carencia de expresión de CD5, y CD23 y la presencia de inmunoglobulina citoplásmica son características que ayudan a distinguir esta enfermedad de la leucemia linfocítica crónica. El diagnóstico de esta enfermedad es también t(9;14) (p13;q32). (Ver, A. Rohatiner, y otros, Lymphoplasmacytic Lymphoma and Waldström's Macroglobulinemia, págs. 263-273, en Non-Hodgkin's Lymphomas, P. Mauch, y otros, ediciones, Lippincott Williams & Wilkins, Filadelfia, Pensilvania (2004); K. MacLennan, Diffuse Indolent B cell Neoplasms, págs. 43-47, en Malignant Lymphoma, B. Hancock, y otros, ediciones, Oxford University Press, Nueva York, N.Y. (2000); R. Chaganti, y otros, Cytogenetics of Lymphoma, págs. 809-824, en Non-Hodgkin's Lymphomas, P. Mauch, y otros, ediciones, Lippincott Williams & Wilkins, Filadelfia, Pensilvania (2004)).

Las pruebas de diagnóstico incluyen típicamente un hemograma completo, pruebas de función renal y hepática, análisis por CT, biopsia y aspiración de médula ósea, electroforesis de proteínas para cuantificar y caracterizar la paraproteína y viscosidad del suero. La medición de la β 2-microglobulina se usa como una prueba de pronóstico. (Ver, A. Rohatiner, y otros, Lymphoplasmacytic Lymphoma and Waldström's Macroglobulinemia, págs. 263-273, en Non-Hodgkin's Lymphomas, P. Mauch, y otros, ediciones, Lippincott Williams & Wilkins, Filadelfia, Pensilvania (2004)).

5.22.2.15. Leucemia linfoblástica aguda nula

La leucemia linfoblástica aguda nula es un subconjunto de ALL que carece de las características de células B o T. El análisis fenotípico de los blastos leucémicos muestra un patrón típico de ALL nulo, es decir, negativo a CD 10 (antígeno común a ALL), fuertemente positivo a HLADR, y positivo a CD-19(B4) (ver Katz y otros. (1988) Blood 71 (5):1438-47).

5.22.2.16. Linfoma de Hodgkin

El linfoma de Hodgkin se deriva generalmente de los ganglios linfáticos de los adultos jóvenes. Se puede dividir en subtipo clásico y un subtipo ganglionar con predominio linfocítico menos frecuente. El tipo clásico presenta SHM, pero no SHM continua, y no tiene un perfil de expresión génica de células B de GC. El tipo ganglionar con predominio linfocítico, a diferencia, se caracteriza por SHM y SHM continua y un perfil de expresión génica de células B de GC. Mientras que los dos tipos difieren clínica y biológicamente, comparten determinadas características, tales como una carencia de células neoplásicas dentro de un entorno de células inflamatorias benignas. B. Schnitzer y otros, Hodgkin Lymphoma, págs. 259-290, en W. Finn y L. Peterson, ediciones, Hematopathology in Oncology, Kluwer Academic Publishers, Norwell, Massachusetts (2004)).

Las características más comunes de presentación son el aumento indoloro de los ganglios linfáticos, generalmente en el cuello, pero ocasionalmente en la región inguinal. El crecimiento y disminución de los ganglios es característico también de esta enfermedad. Los síntomas de B se observan en aproximadamente un tercio de los pacientes. La afectación extraganglionar aislada es rara y en los casos donde la difusión se presentó la afectación extraganglionar se observa aproximadamente del 10-20% de las veces. (Ver, P. Johnson y otros, Hodgkin's Disease: Clinical Features, págs. 181-204, en Malignant Lymphoma, B. Hancock, y otros, ediciones, Oxford University Press, Nueva York, N.Y. (2000)).

Las células Reed-Sternberg (RS) son las células malignas del linfoma de Hodgkin. Las células RS y sus variantes expresan CD15, CD25, CD30 y receptor de transferrina. Además, estas células expresan inmunoglobulina policlonal citoplásmica. En la mayoría de los casos de linfoma de Hodgkin las células RS no expresan CD45, una característica que ayuda a distinguir esta enfermedad de los linfomas no-Hodgkin. El virus de Epstein Barr se demostró que se presenta en células Reed-Sternberg en aproximadamente la mitad de los casos de linfoma de Hodgkin, pero su función no está clara.

El diagnóstico se realiza más frecuentemente por biopsia del ganglio linfático. Las pruebas de diagnóstico adicionales incluyen un hemograma completo (con frecuencia las pruebas hematológicas son normales; los conteos de glóbulos blancos de menos de $1.0 \times 10^9/l$ se observan en aproximadamente 20% de los casos), velocidad de sedimentación globular (con frecuencia elevada en etapas avanzadas de la enfermedad), pruebas bioquímicas, incluyendo electrolitos, urea, creatinina, ácido úrico, calcio (hipercalcemia es rara, pero cuando está presente se asocia con afectación ósea extensa), pruebas sanguíneas hepáticas, lactato deshidrogenasa (niveles elevados con frecuencia asociados con la enfermedad avanzada), albúmina y beta 2-microglobulina (β 2-M). Los linfangiogramas y rayos x de tórax y análisis por CT de tórax, abdomen y pelvis son importantes en la identificación de los ganglios linfáticos anormales y el grado de afectación extraganglionar. Las biopsias de médula ósea típicamente se consideran opcionales como es poco común la afectación de la médula ósea y los resultados de las biopsias de este tipo parecen no afectar el manejo o pronóstico clínico. Las esplenectomías generalmente no se realizan en la actualidad ya que rara vez influye en el manejo y la imagen por CT o MRI proporciona información sobre el estado esplénico. Niveles significativamente elevados de p55, TNF y sICAM-1 se correlacionan con el estadio de la enfermedad, presencia de los síntomas y tasa de respuesta completa. (Ver, P. Johnson, y otros, Hodgkin's Disease: Clinical Features, págs. 181-204, en Malignant Lymphoma, B. Hancock, y otros, ediciones, Oxford University Press, Nueva York, N.Y. (2000); Clinical Oncology, A. Neal, y otros, Neal, Hoskin y Oxford University Press, co-publicación, Nueva York, NY (2003); R. Stein, Hodgkin's Disease, págs. 2538-2571, en Wintrobe's Clinical Hematology, Décima Edición, G. Lee y otros, ediciones Williams & Wilkins, Baltimore, Maryland (1999)).

5.22.2.17. Mieloma múltiple

El mieloma múltiple es un tumor maligno de células plasmáticas. Las células neoplásicas se ubican en la médula ósea, y las lesiones óseas osteolíticas son características. Las translocaciones cromosómicas recíprocas entre uno de los loci de

inmunoglobulina y una variedad de otros genes, *por ejemplo*, ciclina D1, ciclina D3, c-MAF, MMSET (dominio proteico SET del mieloma múltiple) o receptor del factor de crecimiento de fibroblastos 3 se creen que sean los eventos oncogénicos primarios. El mieloma múltiple se caracteriza por SHM, y la célula potencial de origen es una célula B post-GC. El mieloma múltiple típicamente se identifica primero por los síntomas tales como infección recurrente, fatiga, dolor y problemas renales y se confirma con las pruebas clínicas (*ver*, por ejemplo, Cancer: Principles and Practice of Oncology, 6ta edición. DeVita, V.T., Hellman, S. y Rosenberg, editores S. A. 2001 Lippincott Williams y Wilkins Filadelfia, Pensilvania 19106 págs. 2465-2499).

Los pacientes que son candidatos para tratamiento mediante composiciones de la invención pueden someterse además a pruebas de diagnóstico en sangre y/u orina para confirmar el diagnóstico o sospecha de mieloma múltiple, incluyendo pero no se limita a, pruebas de hemogramas completos (CBC) para determinar si los tipos de células que se reportan en un CBC están dentro de sus intervalos normales que son bien conocidos en la materia, el perfil químico de la sangre para determinar si los niveles de diversos componentes de la sangre, tales como albúmina, nitrógeno ureico en sangre (BUN), calcio, creatinina, y lactato deshidrogenasa (LDH), se desvían de los valores estándares. Los niveles séricos de beta 2-microglobulina (β_2 -M) se pueden examinar también y sustituir los marcadores para IL-6, un factor de crecimiento para las células del mieloma. El análisis de orina se puede usar para medir los niveles de proteína en la orina. La electroforesis se puede usar para medir los niveles de diversas proteínas, incluyendo la proteína M en la sangre (denominada electroforesis de proteínas séricas, o SPEP) o en la orina (denominada electroforesis de orina, o UEP). Una prueba adicional, denominada electroforesis de inmunofijación (IFE) o inmunolectroforesis, se puede realizar también para proporcionar información más específica sobre el tipo de proteínas anómalas de anticuerpos presentes. La evaluación de los cambios y proporciones de diversas proteínas, en particular la proteína M, se puede usar para seguir la progresión de la enfermedad de mieloma y la respuesta a los regímenes de tratamiento. El mieloma múltiple se caracteriza por un gran aumento de la proteína M, que se secreta por las células tumorales de mieloma.

Las pruebas de diagnóstico en los huesos se pueden llevar a cabo también para confirmar el diagnóstico o sospecha de mieloma múltiple, incluyendo pero no se limita a, los rayos X y otras pruebas de imágenes -, incluyendo un reconocimiento (esqueleto) óseo, imagen de resonancia magnética (MRI), y tomografía axial computarizada (CAT), que se conoce también como tomografía computarizada (CT) - pueden evaluar los cambios en la estructura ósea y determinar el número y tamaño de los tumores en el hueso. La aspiración de médula ósea o biopsia de médula ósea se puede usar para detectar un aumento en el número de células plasmáticas en la médula ósea. La aspiración requiere una muestra de médula ósea líquida, y la biopsia requiere una muestra de tejido óseo sólido. En ambas pruebas, las muestras se pueden tomar de la pelvis (hueso de la cadera). El esternón (hueso del pecho) se puede usar también para la aspiración de médula ósea.

Los pacientes con mieloma múltiple típicamente se clasifican en los siguientes tres grupos que ayudan a definir los regímenes de tratamiento eficaces. La gammapatía monoclonal de significado incierto (MGUS) típicamente se caracteriza por un nivel de proteína M sérica de menos de 3 g/dl, células plasmáticas clonales de la médula ósea de menos del 10%, no hay evidencia de otros trastornos de células B, y ningún deterioro de órgano o tejido asociado, tales como hipercalcemia (niveles séricos de calcio aumentado a 156), deterioro de la función que se observa por el aumento de la creatinina sérica, anemia o lesiones óseas. Los mielomas asintomáticos típicamente están en el estadio I e incluyen el mieloma múltiple quiescente (SMM) y el mieloma múltiple indolente (IMM). El SMM se caracteriza por la proteína M sérica mayor que o igual a 3 g/dl y el IMM se caracteriza por las células plasmáticas clonales de médula ósea mayores que o iguales a 10% de las células de médula ósea. El mieloma sintomático se caracteriza por la proteína M en suero y/u orina e incluye el estadio II del mieloma múltiple caracterizado por la presencia de células plasmáticas clonales de médula ósea o plasmacitoma y el estadio III del mieloma múltiple caracterizado por el deterioro de órgano o tejido asociado.

El mieloma osteosclerótico es un componente del síndrome raro de POEMS (polineuropatía, organomegalia, endocrinopatía, gammapatía monoclonal y lesiones en la piel). El pico de incidencia es de 40 a 50 años de edad. Las características sistémicas incluyen lesiones óseas, células plasmáticas de la médula < 5%, un CBC normal, aumento de plaquetas, y organomegalia. El CSF tiene un alto valor proteico, sin células presentes. Los niveles de proteína-M son bajos (<3g/dl, media = 1.1 g/dl); de cadena pesada clase – por lo general α o γ ; de cadena ligera clase – por lo general λ ; monoclonal en orina raro y crioglobulinemia ocasional. La neuropatía ocurre en el 50% de los pacientes con debilidad tanto proximal como distal, la pérdida sensorial es mayor en las fibras más largas que pequeñas; y desmielinización y latencia distal larga.

Los pacientes con mieloma múltiple quiescente por lo general se presentan con la enfermedad estable durante meses/años, sin anemia, lesiones óseas, insuficiencia renal o hipercalcemia; tienen > 10% de células plasmáticas en la médula ósea y proteína monoclonal sérica. Los criterios para el mieloma múltiple ardiente son compatibles con el diagnóstico de mieloma múltiple; sin embargo, no existe evidencia de curso progresivo. Estos son casos con una progresión lenta, la masa celular tumoral es pequeña en el momento del diagnóstico y el porcentaje de células

plasmáticas de la médula ósea en la fase S es bajo (<0.5%). Los rasgos característicos clínicos son: niveles séricos de proteína M >3 g/dl y/o células plasmáticas de la médula ósea ≥10%; ausencia de anemia, insuficiencia renal, lesiones osteolíticas.

- 5 El mieloma múltiple indolente (o asintomático) es un mieloma múltiple que se diagnostica por cambios en la ausencia de síntomas, por lo general después de evaluar los estudios de laboratorio. El mieloma múltiple indolente es similar al mieloma ardiente, pero con pocas lesiones óseas y anemia leve. La mayoría de los casos de mieloma múltiple indolente desarrollan mieloma múltiple ostensible dentro de los 3 años. Los criterios de diagnóstico son los mismos que para el mieloma múltiple, excepto: sin lesiones óseas o una lesión asintomática lítica (reconocimiento por rayos X); nivel de
- 10 componente M <3 g/dl para IgG, 2 g/dl para IgA, cadena ligera en orina <4 g/24 horas; hemoglobina > 10 g/dl, calcio sérico normal, creatinina sérica <2 mg/dl, y sin infecciones.

5.22.2.18. Plasmacitoma solitario

- 15 El plasmocitoma solitario es una de un espectro de neoplasias de células plasmáticas que se extiende desde la gammopatía monoclonal benigna al plasmocitoma solitario en el mieloma múltiple. Aproximadamente el setenta por ciento de todos los casos de plasmocitoma solitario resultan eventualmente en el mieloma múltiple. Estas enfermedades se caracterizan por una proliferación de células B que producen la paraproteína característica. Los resultados del plasmocitoma solitario en una proliferación de células plasmáticas clonales en un sitio solitario, por lo general un sitio
- 20 óseo simple o en el tejido extramedular. Los criterios de diagnóstico de plasmocitoma solitario incluyen una lesión simple histológicamente confirmada, biopsia ósea normal, reconocimiento óseo negativo, sin anemia, calcio y función renal normal. La mayoría de los casos presentan la proteína M sérica (paraproteína) mínimamente elevada. La edad media en el diagnóstico es de 50-55, aproximadamente 5-10 años más joven que la edad media para el mieloma múltiple. (Ver, C. Wilson, The Plasma Cell Dyscrasias, págs. 113-144, en W. Finn and L. Peterson, ediciones, Hematopathology in
- 25 Oncology, Kluwer Academic Publishers, Norwell, MA (2004), S. Chaganti, y otros, Cytogenetics of Lymphoma, págs. 809-824, en Non-Hodgkin's Lymphomas, P. Mauch, y otros, ediciones, Lippincott Williams & Wilkins, Filadelfia, Pensilvania, (2004)).

30 Las características inmunofenotípicas y genéticas de plasmocitoma parecen ser similares al mieloma múltiple.

5.22.2.19. Enfermedad de cadena ligera/enfermedad de deposición de cadena ligera (LCDD)

- La LCDD es un trastorno de discrasia de células plasmáticas causado por el exceso de síntesis de las cadenas ligeras de inmunoglobulina (por lo general las cadenas ligeras kappa) que se depositan en los tejidos. Los pacientes se
- 35 presentan comúnmente con disfunción de órganos, debilidad, fatiga y pérdida de peso. Aproximadamente en el 80% de los casos de LCDD se detecta una inmunoglobulina monoclonal. La detección de las cadenas ligeras kappa monoclonales por medio del uso de las técnicas de inmunofluorescencia está limitada por la tendencia de las cadenas ligeras a dar la tinción de fondo en exceso, por lo tanto, puede ser necesario el inmunomarcaje ultraestructural con oro. (Ver, C. Wilson, The Plasma Cell Dyscrasias, págs. 113-144, en W. Finn y L. Peterson, ediciones, Hematopathology in
- 40 Oncology, Kluwer Academic Publishers, Norwell, MA (2004)).

5.22.2.20. Leucemia de células plasmáticas (PCL)

- La PCL, una discrasia de células plasmáticas, es una variante agresiva rara del mieloma múltiple. Los criterios para la
- 45 leucemia de células plasmáticas es un conteo absoluto de células plasmáticas en sangre periférica mayor que $2 \times 10^9/l$ o células plasmáticas mayores que 20% de glóbulos blancos. La determinación mediante citometría de flujo de la presencia de una población CD138+ con restricción de cadena ligera citoplásmica por citometría de flujo distinguirá a PCL del neoplasma linfóide con características plasmacíticas. Las células de PCL se caracterizan también por la carencia de cadena ligera de superficie, expresión CD19 y CD22, y, ninguna o débil expresión de CD45.
- 50 Aproximadamente el 50% de los casos de PCL expresan CD20 y aproximadamente el 50% carecen de expresión de CD56. Las anomalías genéticas observadas en los pacientes de PCL son iguales a aquellas observadas para los pacientes con mieloma múltiple pero se encuentran en frecuencia superior en PCL. (Ver, C. Wilson, The Plasma Cell Dyscrasias, págs. 113-144, en W. Finn y L. Peterson, ediciones, Hematopathology in Oncology, Kluwer Academic Publishers, Norwell, Massachusetts, (2004)).

- 55 La leucemia de células plasmáticas tiene dos formas: si el diagnóstico inicial se basa en la fase leucémica del mieloma entonces se presenta la forma primaria, de lo contrario, es secundaria. La leucemia de células plasmáticas primaria se asocia a una edad juvenil, hepatoesplenomegalia, linfadenopatía, y lesiones osteolíticas menores, pero con peor pronóstico que la forma secundaria. La sangre periférica de pacientes leucémicos de células plasmáticas tiene mayor
- 60 que 20% de células plasmáticas con el conteo absoluto de 2000/ml o más.

5.22.2.21. Gammapatía monoclonal de significado incierto (MGUS)

La MGUS es una afección relativamente común caracterizada por la presencia de inmunoglobulinas electroforéticamente homogéneas o componentes-M benignos. La presencia de esta afección parece aumentar con la edad. La mayoría de los individuos que portan componentes-M nunca desarrollan discrasia maligna de células plasmáticas, tal como mieloma múltiple. Sin embargo, algunos individuos con esta afección se han asociado a afecciones malignas. Cuando los pacientes se vuelven sintomáticos pueden tener hígado o bazo dilatado y pleuroneuropatía (Ver, J. Foerster, Plasma Cell Dyscrasias: General Considerations, págs. 2612-2630, en Wintrobe's Clinical Hematology, Décima Edición, G. Lee y otros, ediciones Williams & Wilkins, Baltimore, Maryland (1999)).

La MGUS se puede diferenciar del mieloma múltiple por la presencia del número aumentado de células plasmáticas monoclonales circulantes en la sangre periférica. Las características serológicas de los componentes-M son idénticas a otras afecciones de discrasia de células plasmáticas, sin embargo, la concentración total del componente-M es por lo general menos que 30 g/l. La paraproteína es por lo general IgG, sin embargo múltiples paraproteínas pueden presentarse incluyendo IgG, IgA, IgM. La cantidad relativa de cada una de las clases de individuales inmunoglobulinas típicamente es proporcional a la que se encuentra en el suero normal. La proteinemia o proteinuria es rara. Las determinaciones seriadas de los niveles de proteína-M en la sangre y orina, y el monitoreo continuo de las características clínicas y de laboratorio (incluyendo la electroforesis de proteínas) es el método más fiable de diferenciar MGUS de discrasias de células plasmáticas en etapa temprana. En Wintrobe's Clinical Hematology, Décima Edición, G. Lee y otros, ediciones Williams & Wilkins, Baltimore, Maryland (1999)).

5.22.2.22. Tumores malignos de células B maduras

La invención se puede practicar para tratar tumores malignos de células B maduras que incluyen pero no se limitan a linfoma folicular, linfoma de células del manto, linfoma de Burkitt, mieloma múltiple, linfoma difuso de células B grandes (DLBCL), incluyendo DLBCL similar a células B centro germinal (GCB), DLBCL similar a células B activadas (ABC), y DLBCL tipo 3, linfoma de Hodgkin incluyendo clásico y tipo nodular con predominio de linfocitos, linfoma linfoplasmacítico (LPL), linfoma de zona marginal, incluyendo linfoma de mucosa gástrica asociada a tejido linfoide (MALT), y leucemia linfocítica crónica (CLL), incluyendo CLL de inmunoglobulina mutada y CLL de inmunoglobulina no mutada.

5.22.2.23. Tumores malignos de células pre-B

Además, el CD19 se expresa más temprano en el desarrollo de las células B que, por ejemplo, CD20, y por lo tanto es particularmente adecuado para el tratamiento de tumores malignos de células pre-B y células B inmaduras, *por ejemplo*, en la médula ósea. Los tumores malignos representativos de las células pre-B y células B inmaduras incluyen pero no se limitan a linfoma de células del manto, leucemia linfoblástica aguda de células pre-B, linfoma linfoblástico de células B precursoras, y otros tumores malignos caracterizados por la expresión de CD19.

5.23. Diagnóstico del paciente y regímenes terapéuticos del trasplante

De acuerdo con determinados aspectos de la invención, el régimen de tratamiento y dosis usada con las composiciones de la invención se seleccionan en base a un número de factores que incluyen, por ejemplo, manifestación clínica que tienen lugar un paciente en riesgo a desarrollar un rechazo humoral, o evidencia clínica de que se desarrolla un rechazo de este tipo. Los términos "humoral" y "mediado por anticuerpo" se usan indistintamente en la presente.

Los criterios para evaluar el riesgo de que un paciente pueda desarrollar un rechazo humoral se establecen de acuerdo al conocimiento y experiencia en la materia. Una citotoxicidad dependiente de complemento positiva o prueba cruzada mejorada por antiglobulina de citotoxicidad dependiente de complemento puede indicar que un paciente está en alto riesgo de rechazo humoral. Una prueba cruzada positiva o una citotoxicidad dependiente de complemento positiva anterior o prueba cruzada mejorada por antiglobulina de citotoxicidad dependiente de complemento puede indicar que un paciente está en un riesgo intermedio de rechazo humoral. Una prueba cruzada negativa indica que un paciente está en un bajo riesgo de rechazo humoral.

Un receptor del trasplante con necesidad de profilaxis contra el rechazo de injerto puede indicarse como un paciente o población de pacientes que tiene aloanticuerpos anti-HLA circulantes detectables antes del trasplante. En otro ejemplo, el paciente o población de pacientes se identifica como que tienen panel de anticuerpos reactivos antes del trasplante. La presencia de aloanticuerpos anti-HLA circulantes detectables en un receptor del trasplante post-trasplante se puede usar también para identificar el paciente o población de pacientes con necesidad de tratamiento para el rechazo humoral de acuerdo con la invención. El paciente o población de pacientes con necesidad de tratamiento para el rechazo humoral se pueden también identificar de acuerdo con otros criterios clínicos que indican que un receptor del trasplante está en

riesgo de desarrollar un rechazo humoral o ya ha desarrollado un rechazo humoral. Por ejemplo, un receptor del trasplante con necesidad de tratamiento de rechazo humoral puede identificarse como un paciente o población en un estadio inicial de rechazo humoral, tales como una respuesta humoral latente que se caracteriza por la circulación de aloanticuerpos anti-donante. Un estadio inicial de rechazo humoral también puede ser una reacción silenciosa que se caracteriza por la circulación de aloanticuerpos anti-donante, deposición de C4d y patología del tejido. En etapas posteriores, el receptor se identifica como un paciente o población de pacientes que se presentan con las indicaciones clínicas de rechazo humoral caracterizado de acuerdo con el conocimiento y experiencia en la materia, por ejemplo, mediante la circulación de aloanticuerpos anti-donante, deposición de C4d, patología del tejido y disfunción del injerto.

La presente invención proporciona las composiciones, eficaces para reducir la incidencia, gravedad o duración del GVHD, un episodio de rechazo, o trastorno linfoproliferativo post-trasplante. Las composiciones de la invención pueden ser eficaces para atenuar la respuesta del huésped a la lesión por reperfusión isquémica de un injerto de tejido sólido u órgano. Las composiciones de la invención pueden ser eficaces para prolongar la supervivencia de un injerto en un receptor del trasplante.

La presente invención puede usarse para los injertos que son autólogos, alogénicos o xenogénicos al receptor. Los tipos de injertos incluyen los injertos de tejidos y órganos, que incluyen pero no se limitan a, injertos de médula ósea, injertos de células madre periféricas, injertos de piel, injertos arteriales y venosos, injertos de islotes de células pancreáticas y trasplantes de riñón, hígado, páncreas, tiroides, y corazón. Los términos "injerto" y "trasplante" se usan indistintamente en la presente. El injerto autólogo puede ser un injerto de médula ósea, un injerto arterial, un injerto venoso o un injerto de piel. El aloinjerto puede ser un injerto de médula ósea, un injerto de córnea, un trasplante de riñón, un trasplante de islotes de células pancreáticas, o un trasplante combinado de un riñón y páncreas. El injerto puede ser un xenoinjerto, donde los donantes animales posibles incluyen, pero no se limitan a cerdos. Las composiciones de la presente invención pueden usarse también para suprimir una respuesta inmune perjudicial para un injerto o implante no biológicos, que incluyen pero no se limitan a una unión artificial, una endoprótesis vascular, o un dispositivo de marcapasos.

Los anticuerpos anti-CD19 y composiciones, de la invención pueden usarse para tratar o prevenir el GVHD, rechazo humoral, o trastorno linfoproliferativo post-trasplante sin tener en cuenta las indicaciones particulares inicialmente que dan lugar a la necesidad para el trasplante o el tipo de tejido trasplantado en particular.

Las formulaciones terapéuticas de la presente invención se describen para el tratamiento de individuos humanos diagnosticados con enfermedades o trastornos autoinmunes, que incluyen pero no se limitan a, artritis reumatoide, SLE, IPT, trastornos asociados al pénfigo, diabetes y esclerodermia.

Los regímenes de tratamiento apropiados se pueden determinar por alguien con experiencia en la materia para el paciente o población de pacientes en particular. El régimen de tratamiento puede ser un régimen de acondicionamiento previo al trasplante, un régimen de mantenimiento post-trasplante o régimen de tratamiento post-trasplante para un rechazo agudo o uno crónico. El régimen en particular se puede variar para un paciente que está siendo evaluado como de un riesgo alto o intermedio para desarrollar una respuesta humoral, en comparación con el régimen para un paciente que está siendo evaluado como de un bajo riesgo para desarrollar una respuesta humoral.

El régimen en particular se puede variar de acuerdo con el estadio de rechazo humoral, con la terapia más agresiva que se indica para pacientes en estadios posteriores de rechazo. Los estadios de rechazo humoral se pueden clasificar de acuerdo al conocimiento y experiencia en la materia. Por ejemplo, los estadios de rechazo humoral pueden clasificarse como uno de los estadios I a IV de acuerdo con los criterios siguientes: Estadio I Respuesta Latente, que se caracteriza por la circulación de aloanticuerpos anti-donante, especialmente anticuerpos anti-HLA; Estadio II Reacción Silente, que se caracterizan por la circulación de aloanticuerpos anti-donante, especialmente anticuerpos anti-HLA, y deposición de C4d, pero sin cambios histológicos o disfunción del injerto; Estadio III Rechazo Subclínico: se caracteriza por circulación de aloanticuerpos anti-donante, especialmente anticuerpos anti-HLA, deposición de C4d y patología del tejido, pero sin disfunción del injerto; Estadio IV Rechazo Humoral: se caracteriza por la circulación de aloanticuerpos anti-donante, especialmente anticuerpos anti-HLA, deposición de C4d, patología del tejido, y disfunción del injerto.

Las curvas de dosis-respuesta se pueden generar por medio del uso de los protocolos estándares en la materia para determinar la cantidad eficaz de las composiciones de la invención para el uso en un régimen en particular, por ejemplo, en regímenes de acondicionamiento antes del trasplante, y en regímenes post-trasplantes para profilaxis y tratamiento del GVHD, rechazo humoral o trastornos linfoproliferativos post-trasplante. En general, los pacientes con alto riesgo de desarrollar un rechazo humoral y aquellos que presentan ya uno o más indicadores clínicos de rechazo podrán necesitar dosis más altas y/o dosis más frecuentes que pueden administrarse durante largos períodos de tiempo en comparación con los pacientes que no están en alto riesgo o que no presentan ninguna de las indicaciones de rechazo activo.

Los anticuerpos anti-CD19 y composiciones de la invención pueden practicarse para tratar o prevenir el GVHD, rechazo humoral, o trastornos linfoproliferativos post-trasplante, ya sean solos o en combinación con otros agentes terapéuticos o regímenes de tratamiento. Otros regímenes terapéuticos para el tratamiento o la prevención del GVHD, rechazo humoral, o trastornos linfoproliferativos post-trasplante pueden comprender, por ejemplo, una o más de la terapia anti-linfocito, terapia con esteroides, terapia de depleción de anticuerpos, terapia de inmunosupresión, y plasmaféresis.

La terapia anti-linfocito puede comprender la administración al receptor del trasplante de globulinas anti-timocitos, también denominado como timoglobulina. La terapia anti-linfocito puede comprender también la administración de uno o más anticuerpos monoclonales dirigidos contra antígenos de superficie de células T. Los ejemplos de anticuerpos de este tipo incluyen, sin limitación, OKT3™ (muromonab-CD3), CAMPATH™-1H (alemtuzumab), CAMPATH™-1G, CAMPATH™-1M, SIMULECT™ (basiliximab), y ZENAPAX™ (daclizumab). En una modalidad específica, la terapia anti-linfocítica comprende uno o más anticuerpos adicionales dirigidos contra las células B, incluyendo, sin limitación, RITUXAN™ (rituximab).

La terapia con esteroides puede comprender la administración al receptor del trasplante de uno o más esteroides seleccionados del grupo consistente de cortisol, prednisona, metilprednisolona, dexametasona, e indometacina. Uno o más de los esteroides pueden ser los corticoides, incluyendo, sin limitación, cortisol, prednisona y metilprednisolona.

La terapia de depleción con anticuerpos puede incluir, por ejemplo, la administración al receptor del trasplante de la inmunoglobulina intravenosa. La terapia de depleción de anticuerpos puede comprender también la terapia de inmunoadsorción aplicada al injerto ex vivo, antes del trasplante. La inmunoadsorción puede realizarse por medio del uso de cualquier técnica adecuada, por ejemplo, la afinidad de la proteína A, o las técnicas de afinidad basadas en anticuerpos que usan anticuerpos dirigidos contra las células T o los marcadores de la superficie celular de las células B, tales como los anticuerpos anti-CD3, los anticuerpos anti-CD19, los anticuerpos anti-CD20, y los anticuerpos anti-CD19.

La terapia de inmunosupresión puede comprender la administración de uno o más agentes inmunosupresores tales como inhibidores de la transcripción de citoquinas (*por ejemplo*, ciclosporina A, tacrolimus), síntesis de nucleótidos (*por ejemplo*, azatiopurina, micofenolato de mofetilo), transducción de la señal del factor de crecimiento (*por ejemplo*, sirolimus, rapamicina), y receptor de la interleucina 2 en las células T (*por ejemplo*, daclizumab, basiliximab). Un agente inmunosupresor que se usa en combinación con composiciones de la invención puede incluir uno o más de los siguientes: adriamicina, azatiopurina, busulfán, ciclofosfamida, ciclosporina A ("CyA"), citoxina, fludarabina, 5-fluorouracilo, metotrexato, micofenolato de mofetilo (MOFETIL), antiinflamatorios no esteroideos (NSAID), rapamicina y tacrolimus (FK506). Los agentes inmunosupresores pueden comprender también los inhibidores del complemento, por ejemplo, el receptor-1 del complemento soluble, anticuerpo anti-C5, o un inhibidor de molécula pequeña de C1, por ejemplo como se describió en Buerke y otros. (J. Immunol., 167:5375-80 (2001)).

Las composiciones de la invención pueden usarse en combinación con uno o más regímenes terapéuticos para suprimir el rechazo humoral, incluyendo, sin limitación, terapia con tacrolimus y micofenolato de mofetilo, inmunoadsorción, terapia de inmunoglobulina intravenosa y plasmaféresis.

5.23.1. Diagnóstico y criterios clínicos

La presente invención proporciona los anticuerpos y composiciones para el tratamiento y prevención del GVHD, rechazo humoral y trastorno linfoproliferativo post-trasplante en receptores humanos de trasplantes. Las composiciones de la invención se pueden usar independientemente de las indicaciones particulares que dieron lugar a la necesidad de un trasplante. De manera similar, el uso de composiciones de la invención para el tratamiento y prevención del GVHD, rechazo humoral, y trastornos linfoproliferativos post-trasplante no se limita por el tipo particular de tejido que se pretende para el trasplante o que se trasplantó.

La invención puede proporcionar las composiciones para la prevención del rechazo humoral en un receptor humano de trasplante donde se identifica al receptor del trasplante como un paciente o población de pacientes en riesgo aumentado de desarrollar un rechazo humoral. Los pacientes de este tipo pueden denominarse también como "sensible". Los criterios para la identificación de los pacientes sensibles se conocen por el médico experto. Los criterios de este tipo pueden incluir, por ejemplo, los pacientes que tienen niveles detectables de anticuerpos circulantes contra antígenos HLA, *por ejemplo*, aloanticuerpos anti-HLA. Los criterios de este tipo pueden incluir también los pacientes que se sometieron a trasplantes previos, un embarazo, o múltiples transfusiones de sangre. Los pacientes que están en un mayor riesgo de rechazo humoral incluyen también aquellos que tienen apareamiento imperfecto donante-receptor de HLA, y aquellos trasplantes, que son ABO-incompatibles. Los individuos sensibles son candidatos al pretratamiento o acondicionamiento previo al trasplante. Los individuos sensibles son candidatos también a los regímenes de mantenimiento post-trasplante para la prevención del rechazo humoral.

Los anticuerpos y composiciones, de la invención pueden comprender o pueden usarse en combinación con un régimen terapéutico para el tratamiento de un rechazo agudo o crónico. El rechazo puede caracterizarse como un rechazo humoral Estadío I, uno Estadío II, uno Estadío III, o uno Estadío IV.

- 5 Los anticuerpos y composiciones, de la invención pueden comprender o pueden usarse en combinación con un régimen terapéutico para el tratamiento de un rechazo humoral en estadío temprano. El rechazo humoral en estadío temprano puede ser el Estadío I, II, III del rechazo. Las indicaciones clínicas de un rechazo humoral en estadío temprano se determina de acuerdo con el conocimiento y experiencia en la materia y pueden incluir, por ejemplo, el desarrollo en el paciente de anticuerpos circulantes anti-HLA específicos al donante, la presencia de marcadores de complemento de actividad de anticuerpos tales como depósitos de C4d y C3d en las biopsias del injerto, y la presencia de anticuerpos anti-HLA en las biopsias del injerto. Otros indicadores de un rechazo humoral en estadío temprano se conocen por el médico experto y pueden incluir, por ejemplo, el desarrollo de anticuerpos, anticuerpos anti-endoteliales especialmente anticuerpos antivimentina, y el desarrollo de aloanticuerpos con cadena A (MICA) asociados a MHC clase I no-clásico.
- 10
- 15 Las composiciones de la invención pueden comprender o pueden usarse en combinación con un régimen terapéutico para el tratamiento de rechazo humoral caracterizado en parte por la disfunción del injerto. El paciente o población de pacientes con necesidad de tratamiento para el rechazo humoral pueden identificarse de acuerdo con criterios conocidos en la materia para la disfunción del injerto. Los ejemplos de los criterios de este tipo para tipos particulares de injertos se proporcionan en las secciones que siguen. El paciente o población de pacientes con necesidad de tratamiento para el rechazo humoral pueden identificarse de acuerdo con otros criterios que son particulares para el tipo de injerto de tejido, tales como criterios histológicos. Los ejemplos de criterios de este tipo se proporcionan también en las secciones que siguen.
- 20

5.23.2. Trasplantes de la médula ósea

- 25 Las composiciones de la invención son útiles para el tratamiento o prevención del GVHD, rechazo humoral, y trastorno linfoproliferativo post-trasplante en un receptor del trasplante de médula ósea. Las composiciones de la invención pueden comprender o pueden usarse en combinación con un régimen de acondicionamiento pre-trasplante.
- 30 Las composiciones de la invención pueden usarse para depletar las células B de un injerto de médula ósea antes del trasplante. El injerto puede ser de cualquier fuente adecuada, por ejemplo, células madre sanguíneas del cordón, células madre de sangre periférica, o una punción de la médula ósea. Las células madre de sangre periférica pueden recolectarse de donantes de sangre después de un régimen de acondicionamiento adecuado. Los regímenes adecuados se conocen en la materia y pueden incluir, por ejemplo, la administración de una o más de los siguientes al donante antes de la recolección de sangre del donante: NEUPOGEN, citoquinas tales como GM-CSF, regímenes quimioterapéuticos en dosis bajas, y terapia de quimioquinas. El injerto puede ser ya sea alogénico o autólogo para el receptor del trasplante. El injerto puede ser también un xenoinjerto.
- 35
- 40 Las composiciones pueden ser útiles en un número de contextos en que existe una indicación hematopoyética para el trasplante de médula ósea. Un injerto autólogo de médula ósea puede indicarse para una leucemia o linfoma de células B, que incluye, pero no se limitan a leucemia linfoblástica aguda ("ALL") o linfoma no Hodgkin, y las composiciones y métodos de la invención pueden usarse para la depleción de las células malignas residuales que contaminan el injerto. Un trasplante autólogo de médula ósea puede indicarse para pacientes incapaces de eliminar una infección viral, por ejemplo, una infección viral asociada con el virus Epstein Barr (VEB), virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), o citomegalovirus (CMV), y las composiciones y métodos de la invención pueden usarse para depletar el injerto de células B que pueden albergar el virus. El injerto puede ser un injerto alogénico y composiciones de la invención pueden usarse para la depleción de las células B del donante del injerto como profilaxis contra la GVHD.
- 45
- 50 La indicación puede ser una célula B asociada a afección autoinmune y las composiciones de la invención pueden usarse para depletar las células B perjudiciales del paciente sin la necesidad de régimen de acondicionamiento con quimioterapia o radioterapia. Las composiciones de la invención pueden administrarse en combinación con un régimen de quimioterapia o radioterapia, cuyo régimen comprende una dosis inferior de uno o más agentes quimioterapéuticos, o una dosis inferior de radiación, que la dosis que se administra en ausencia de las composiciones de la invención. El paciente puede recibir un injerto autólogo de médula ósea posterior a la quimioterapia o radioterapia, donde el injerto se depleta de células B perjudiciales antes del trasplante por medio del uso de las composiciones y métodos descritos en la presente.
- 55
- 60 Un paciente o población de pacientes en la necesidad de, o probablemente que se benefician de un trasplante de médula ósea se identifica de acuerdo con el conocimiento y experiencia en la materia. Los ejemplos de pacientes que pueden ser candidatos para el trasplante de médula ósea incluyen los pacientes que se sometieron a quimioterapia o

radioterapia para el tratamiento de un cáncer o una enfermedad o trastorno autoinmune, y los pacientes que son incapaces de eliminar una infección viral que reside en las células del sistema inmune

5.23.3. Trasplantes de hígado

Las composiciones de la invención son útiles para el tratamiento o prevención del GVHD, rechazo humoral, y trastorno linfoproliferativo post-trasplante en un receptor de un trasplante de hígado. El rechazo puede ser un rechazo agudo o uno crónico. Las composiciones de la invención pueden usarse para la prevención del GVHD, rechazo humoral, y trastorno linfoproliferativo post-trasplante en un receptor del trasplante de hígado. Las composiciones de la invención pueden comprender o pueden usarse en combinación con un régimen de acondicionamiento pre-trasplante. Las composiciones de la invención se pueden administrar al receptor del trasplante. Las composiciones de la invención pueden contactarse con el injerto, *ex vivo*, antes del trasplante.

El trasplante de hígado puede ser de cualquier fuente adecuada como se determina de acuerdo con el conocimiento y experiencia en la materia. En una modalidad, el hígado es un injerto alogénico HLA compatible. El hígado puede ser un xenoinjerto de un cerdo donante. El hígado puede usarse *ex vivo* para filtrar la sangre del paciente, *por ejemplo*, perfusión extracorpórea. La perfusión extracorpórea es una forma de diálisis hepática en la que el paciente se conecta quirúrgicamente a un hígado mantenido fuera del cuerpo. Este procedimiento se denomina a veces como "hígado bioartificial". Las composiciones de la invención pueden usarse para prevenir el desarrollo de anticuerpos contra los antígenos del hígado que pueden contaminar la sangre del paciente.

Las composiciones de la invención pueden comprender un régimen terapéutico mejorado para el tratamiento y prevención del GVHD, rechazo humoral, y trastorno linfoproliferativo post-trasplante. Las composiciones de la invención pueden comprender un régimen terapéutico mejorado, donde la mejoría consiste en una disminución de la incidencia y/o severidad de las complicaciones asociadas con los agentes inmunosupresores tradicionales. La incidencia y/o severidad de la nefrotoxicidad, hepatotoxicidad, e hirsutismo puede reducirse en comparación con los regímenes tradicionales que dependen de la ciclosporina A u otros inhibidores de calcineurina. La incidencia y/o severidad de la obesidad, diabetes mellitus, osteodistrofia, y sensibilidad a infecciones bacterianas y virales puede reducirse en comparación con los regímenes tradicionales que dependen de los corticosteroides.

Las composiciones de la invención pueden usarse en combinación con dosis inferiores de uno o más agentes inmunosupresores tradicionales que las dosis que se usan en ausencia de la terapia con anticuerpos anti-linfocitos. Las dosis inferiores pueden dar lugar a una disminución en la incidencia y/o severidad de una o más complicaciones asociadas con uno o más agentes inmunosupresores tradicionales.

Un paciente o población de pacientes en la necesidad de, o probablemente que se benefician de, un trasplante de hígado se identifica de acuerdo al conocimiento y experiencia en la materia. Los ejemplos de los pacientes que pueden ser candidatos para un trasplante de hígado incluyen a las personas que tienen una o más de las siguientes afecciones, enfermedades o trastornos: insuficiencia hepática aguda, amiloidosis, trastornos en la excreción de bilirrubina, atresia biliar, síndrome de Budd-Chiari, hepatitis crónica autoinmune activa, cirrosis (ya sea asociada con la hepatitis viral incluyendo hepatitis B y hepatitis C, cirrosis alcohólica o cirrosis biliar primaria), colangitis, trastorno congénito del factor VIII o IX, trastornos del metabolismo del cobre, fibrosis quística, glucogénesis, hipercolesterolemia, lipidosis, mucopolisacáridosis, colangitis esclerosante primaria, trastornos del metabolismo de la porfirina, trastornos del metabolismo de la purina y pirimidina, y neoplasmas primarios de tumor benigno y maligno, especialmente del hígado y conductos biliares intrahepáticos, sistema biliar, conductos biliares, o sistema digestivo.

Los criterios clínicos para la identificación de un paciente o población de pacientes con necesidad, o que probablemente se benefician, de un trasplante de hígado pueden determinarse de acuerdo con el conocimiento y la experiencia en la materia. Los criterios de este tipo pueden incluir, *por ejemplo*, uno o más de los siguientes síntomas: fatiga, pérdida de peso, dolor abdominal superior, pureza, ictericia, dilatación del hígado, decoloración de la orina, fosfatasa alcalina elevada, y actividad gamma glutamilpeptidasa, niveles elevados de bilirrubina, disminución de albúmina sérica, el hígado, enzimas hepáticas específicas elevadas, producción de bilis baja, nitrógeno ureico sanguíneo aumentado, títulos aumentados de creatinina y/o presencia de anticuerpos citoplasmáticos anti-neutrófilos (ANCA), hemorragia recurrente por varices, ascitis de difícil cura, peritonitis bacteriana espontánea, encefalopatía refractaria, ictericia severa, disfunción sintética grave, deterioro fisiológico súbito e insuficiencia hepática fulminante.

5.23.4. Trasplantes de riñón (renal)

Las composiciones de la invención son útiles para el tratamiento o prevención de la GVHD, el rechazo humoral, y el trastorno linfoproliferativo posterior al trasplante en un receptor de trasplante renal. Como se usa en la presente, el

término "trasplante renal" incluye el trasplante de un riñón y el trasplante combinado de un riñón y un páncreas. El rechazo puede caracterizarse como un rechazo agudo o un rechazo crónico.

5 Las composiciones de la invención pueden comprender o pueden usarse en combinación con un régimen de acondicionamiento pre-trasplante. Una dosis única de una o más de las composiciones de la presente invención puede ser eficaz para reducir el panel de anticuerpos reactivos y depletar las células B en el paciente o la población de pacientes. Las dosis múltiples de una o más de las composiciones de la invención pueden ser eficaces para reducir el panel de anticuerpos reactivos y depletar las células B en el paciente o la población de pacientes. Una dosis única de una o más de las composiciones de la presente invención puede administrarse en combinación con uno o más agentes inmunosupresores y es eficaz para reducir el panel de anticuerpos reactivos y depletar las células B en el paciente o la población de pacientes.

15 Las composiciones de la invención pueden usarse para el tratamiento o la prevención de la GVHD y el rechazo del injerto en un paciente que recibió un trasplante renal. El paciente puede no presentar aún signos clínicos de rechazo. Las composiciones de la invención pueden comprender o pueden usarse en combinación con un régimen de mantenimiento para la prevención del rechazo del injerto en el receptor del trasplante. Las composiciones de la invención pueden ser para el tratamiento de un rechazo humoral subclínico. El paciente o la población de pacientes con necesidad de tratamiento para un rechazo humoral subclínico puede por la detección de la deposición de C4 en una biopsia del injerto o por la detección de los anticuerpos anti-HLA circulantes.

20 Las composiciones de la invención pueden comprender o pueden usarse en combinación con un régimen terapéutico para el tratamiento de un episodio de rechazo agudo o crónico en un receptor de trasplante. El paciente o la población de pacientes con necesidad de tratamiento para un episodio de rechazo agudo o crónico pueden identificarse por la detección de uno o más indicadores clínicos de rechazo. Uno o más indicadores clínicos de rechazo pueden detectarse de una a seis semanas posterior al trasplante. Uno o más indicadores clínicos de rechazo pueden detectarse a los 6, 12, 18, 24, 36, 48 ó 60 meses posteriores al trasplante. El rechazo agudo puede confirmarse por biopsia del rechazo humoral agudo.

30 Una o más de las composiciones de la invención pueden comprender un régimen terapéutico para el tratamiento del rechazo agudo. El régimen terapéutico puede comprender además uno o más de los siguientes: plasmaféresis, tacrolimus/micofenolato, inmunoglobulina intravenosa, inmunoadsorción con proteína A, y anticuerpo anti-CD20. El paciente puede haber estado en un protocolo de inmunodepresión antes del desarrollo del rechazo. El protocolo de inmunodepresión puede incluir una o más de ciclosporina, azatioprina, y terapia con esteroides.

35 Los indicadores clínicos de rechazo humoral agudo son conocidos en la materia e incluyen, por ejemplo, un deterioro severo súbito de la función renal, el desarrollo de oliguria, y la perfusión renal comprometida. Los indicadores adicionales incluyen, por ejemplo, células inflamatorias en capilares peritubulares en la biopsia y aloanticuerpos circulantes específicos del donante. El paciente puede presentar uno o más de los siguientes criterios para el diagnóstico de un rechazo humoral de un aloinjerto renal: (1) evidencia morfológica de la lesión tisular aguda; (2) evidencia de la acción de anticuerpos, tales como los depósitos de C4d o inmunoglobulinas y complemento en la necrosis fibrinoide arterial; y (3) anticuerpos circulantes detectables contra los antígenos HLA de donantes o antígenos endoteliales de donantes. El paciente puede presentarse con los tres criterios de diagnóstico anteriores.

45 El paciente puede presentarse con uno o más de los criterios de diagnóstico anteriores de rechazo humoral agudo y las composiciones de la presente invención se usan en combinación con uno o más de los siguientes agentes inmunosupresores para tratar el rechazo humoral agudo: inmunoglobulina intravenosa, globulinas anti-timocitos, anticuerpo anti-CD20, micofenolato de mofetilo, o tacrolimus. Las composiciones de la invención pueden usarse en combinación con uno o más agentes inmunosupresores y un procedimiento para la eliminación de los aloanticuerpos del paciente, tales como la plasmaféresis o la inmunoadsorción.

50 Las composiciones de la invención pueden comprender o pueden usarse en combinación con un régimen terapéutico para el tratamiento de un rechazo crónico del aloinjerto renal. Una o más de las composiciones de la invención pueden usarse solas o en combinación con uno o más agentes inmunosupresores, que incluyen por ejemplo, anti-CD154 (CD40L), tacrolimus, sirolimus y mizoribina. Uno o más de los anticuerpos anti-CD19 pueden usarse en combinación con el tacrolimus y el micofenolato.

60 Los indicadores clínicos del rechazo crónico en los riñones se conocen en la materia y pueden incluir, por ejemplo, fibrosis arterial íntima con células mononucleares íntimas (vasculopatía crónica del injerto), duplicación de las membranas basales glomerulares (glomerulopatía crónica del injerto), laminación de las membranas basales peritubulares, C4d en los capilares peritubulares, y los anticuerpos circulantes reactivos a HLA del donante. Las

composiciones de la invención pueden comprender o se usan en combinación con un régimen terapéutico para tratar el rechazo crónico antes del desarrollo de las lesiones del injerto.

El paciente o la población de pacientes con necesidad de tratamiento pueden identificarse según tengan uno o más indicadores clínicos de la glomerulopatía del trasplante. Las composiciones de la invención pueden comprender o pueden usarse en combinación con un régimen terapéutico que comprende uno o más agentes terapéuticos. El régimen terapéutico puede ser eficaz para estabilizar la función renal e inhibir el rechazo del injerto. Uno o más agentes terapéuticos pueden incluir la enzima de conversión de la angiotensina (ACE) y/o los antagonistas de los receptores, la inmunoglobulina intravenosa, las globulinas anti-timocitos, el anticuerpo anti-CD20, el micofenolato de mofetilo, o el tacrolimus. Los anticuerpos anti-CD19 pueden usarse en combinación con el micofenolato de mofetilo y el tacrolimus, con o sin otros agentes terapéuticos. La plasmaféresis puede usarse también como parte del régimen terapéutico.

Un paciente o población de pacientes que necesita de, o que probablemente se beneficia de, un trasplante renal se identifica de acuerdo al conocimiento y la experiencia en la materia. Los ejemplos de los pacientes que pueden ser candidatos a trasplante renal incluyen los pacientes con diagnóstico de amiloidosis, diabetes (tipo I o tipo II), enfermedad glomerular (*por ejemplo*, glomerulonefritis), gota, síndrome urémico hemolítico, VIH, enfermedad renal hereditaria (*por ejemplo*, enfermedad renal poliquística, uropatía obstructiva congénita, cistinosis, o el síndrome del abdomen en ciruela pasa), otra enfermedad renal (*por ejemplo*, nefropatía obstructiva adquirida, necrosis tubular aguda, nefritis intersticial aguda), artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico, o anemia de células falciformes. Otros candidatos para el trasplante renal incluyen los pacientes que tienen deficiencia de insulina, hipertensión arterial, lesiones severas o quemaduras, cirugía mayor, enfermedad cardíaca o ataque al corazón, enfermedad del hígado o insuficiencia hepática, enfermedad vascular (*por ejemplo*, esclerosis sistémica progresiva, trombosis de arteria renal, esclerodermia), reflujo vesicoureteral, y determinados cánceres (*por ejemplo*, carcinoma incidental, linfoma, mieloma múltiple, carcinoma de células renales, tumor de Wilms). Otros candidatos para el trasplante renal pueden incluir, por ejemplo, los usuarios de heroína, las personas que han rechazado un injerto anterior de riñón o páncreas, y las personas que se someten a un régimen terapéutico que comprende antibióticos, ciclosporina, o quimioterapia.

Los criterios clínicos para la identificación de un paciente o población de pacientes que necesitan, o que probablemente se benefician de un trasplante de riñón se pueden determinar de acuerdo con el conocimiento y la experiencia en la materia. Los criterios de este tipo pueden incluir, por ejemplo, uno o más de los siguientes: problemas urinarios, hemorragia, moretones con facilidad, fatiga, confusión, náuseas y vómitos, pérdida de apetito, palidez de la piel (de anemia), dolor en los músculos, articulaciones, flancos, y pecho, dolor de huesos o fracturas, y picazón.

5.23.5. Trasplantes cardíacos

Las composiciones de la invención son útiles para el tratamiento o prevención de la GVHD, el rechazo humoral, y el trastorno linfoproliferativo posterior al trasplante en un receptor de trasplante cardíaco. El rechazo puede ser un rechazo agudo o uno crónico. Las composiciones de la invención pueden comprender o pueden usarse en combinación con un régimen de acondicionamiento pre-trasplante.

Las composiciones de la invención pueden comprender o pueden usarse en combinación con un régimen terapéutico para el tratamiento del rechazo agudo humoral en un receptor de trasplante cardíaco. El régimen terapéutico puede comprender además una o más de los siguientes: plasmaféresis, inmunoglobulina intravenosa, y terapia con anticuerpos anti-CD20. El paciente o la población de pacientes con necesidad de tratamiento para un rechazo humoral agudo se identifica mediante la detección de una o más de las indicaciones clínicas de rechazo humoral agudo. Los ejemplos de indicadores clínicos de rechazo humoral agudo pueden incluir uno o más de los siguientes: disfunción hemodinámica, definida por choque, hipotensión, rendimiento cardíaco disminuido y un aumento de la presión arterial pulmonar o en cuña capilar. El rechazo humoral agudo puede diagnosticarse dentro de 6, 12, 18, 24, 36, 48, o 60 meses después del trasplante.

Las composiciones de la invención pueden comprender o pueden usarse en combinación con un régimen terapéutico para la prevención del rechazo en un receptor del trasplante cardíaco. El receptor del trasplante con necesidad de profilaxis contra el rechazo puede identificarse como un paciente o población de pacientes que tiene uno o más de los siguientes factores de riesgo: sexo femenino, seropositividad citomegalovirus, respuesta elevada al panel de anticuerpos reactivos, pruebas cruzadas positivas antes y/o posterior al trasplante, y antes de la sensibilización con los agentes inmunosupresores.

Las composiciones de la invención pueden usarse para el tratamiento o prevención del deterioro del injerto en un receptor de trasplante cardíaco. El receptor del trasplante con necesidad de tratamiento para, o profilaxis contra, el deterioro del injerto puede identificarse como un paciente o población de pacientes que tienen una o más de las siguientes indicaciones clínicas de rechazo humoral: deposición de inmunoglobulina, C1q, C3 y/o C4d en capilares,

evidencias de células CD68-positivas en los capilares, y evidencia de la infiltración del injerto por células inflamatorias después de la biopsia. Las composiciones de la presente invención pueden usarse en combinación con una o más de los siguientes agentes inmunosupresores para tratar el deterioro del injerto en un receptor del trasplante cardíaco: inmunoglobulina intravenosa, globulinas anti-timocitos, anticuerpo anti-CD20, micofenolato de mofetilo, o tacrolimus. Las composiciones de anticuerpos anti-CD19 pueden usarse en combinación con uno o más agentes inmunosupresores y un procedimiento para la eliminación de los aloanticuerpos del paciente, tales como la plasmaféresis o la inmunoadsorción.

Las composiciones de la invención pueden comprender o pueden usarse en combinación con un régimen terapéutico para el tratamiento del rechazo cardíaco crónico, por ejemplo la vasculopatía crónica del injerto, también denominada como enfermedad arterial coronaria del trasplante. Las composiciones de la invención pueden comprender o pueden usarse en combinación con un régimen terapéutico para la prevención de la enfermedad del trasplante de la arteria coronaria en un paciente o población de pacientes en riesgo. Los criterios para la identificación de un paciente o población de pacientes con riesgo de desarrollar la enfermedad del trasplante de la arteria coronaria se conocen en la materia y pueden incluir, por ejemplo, los pacientes que tienen trasplantes pobremente compatibles, los pacientes que desarrollan anticuerpos anti-HLA circulantes, y los pacientes que desarrollan una o más indicaciones clínicas de rechazo humoral temprano después del trasplante cardíaco.

Un paciente o población de pacientes con necesidad de, o que probablemente se benefician de, un trasplante de corazón se identifica de acuerdo al conocimiento y la experiencia en la materia. Los ejemplos de los pacientes que pueden ser candidatos para el trasplante de corazón incluyen aquellos que se diagnosticaron con alguna de las enfermedades y trastornos siguientes: enfermedad de la arteria coronaria, miocardiopatía (enfermedad no inflamatoria del corazón), enfermedad de la válvula del corazón con insuficiencia cardíaca congestiva, ritmos cardíacos anormales potencialmente mortal que no responden a otras terapias, miocardiopatía idiopática, miocardiopatía isquémica, miocardiopatía dilatada, miocardiopatía isquémica y enfermedad cardíaca congénita para la que no existe la terapia convencional o para la que la terapia convencional ha fracasado.

Los criterios clínicos para la identificación de un paciente o población de pacientes con necesidad, o que probablemente se benefician de, un trasplante de corazón pueden determinarse de acuerdo al conocimiento y la experiencia en la materia. Los criterios de este tipo pueden incluir, por ejemplo, uno o más de los siguientes: fracción de eyección menos que 25%, angina de pecho de difícil cura o arritmias cardíacas malignas que no responden a la terapia convencional, y resistencia vascular pulmonar menor que 2 unidades de Wood. Además, el paciente o la población de pacientes con necesidad de un trasplante de corazón puede identificarse mediante la realización de una serie de pruebas de acuerdo con el conocimiento y experiencia en la materia. Las pruebas de este tipo incluyen, por ejemplo, ecocardiogramas en descanso y estrés, EKG, ensayo de los niveles sanguíneos de creatinina, arteriografía coronaria, y evaluación cardiopulmonar, incluyendo la cateterización del corazón derecho e izquierdo.

5.23.6. Trasplante de pulmón

Las composiciones de la invención son útiles para el tratamiento o prevención de la GVHD, el rechazo humoral, y el trastorno linfoproliferativo posterior al trasplante en un receptor de trasplante de pulmón. El rechazo puede caracterizarse como un rechazo agudo o un rechazo crónico. Las composiciones de la invención pueden comprender o pueden usarse en combinación con un régimen de acondicionamiento antes del trasplante.

Un paciente o población de pacientes con necesidad de, o que probablemente se benefician de, un trasplante de pulmón se identifica de acuerdo al conocimiento y la experiencia en la materia. Los ejemplos de los pacientes que pueden ser candidatos para el trasplante de pulmón incluyen los pacientes que tienen una de las enfermedades o afecciones siguientes: bronquiectasia, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, fibrosis quística, síndrome de Eisenmenger o enfermedad cardíaca congénita con síndrome de Eisenmenger, enfisema, granuloma eosinófilo del pulmón, o histiocitosis X, trauma de inhalación/quemadura, linfangioleiomiomatosis (LAM), hipertensión pulmonar primaria, fibrosis pulmonar (cicatrización del pulmón) o sarcoidosis.

Los criterios clínicos para la identificación de un paciente o población de pacientes con necesidad de, o que probablemente se benefician de, un trasplante de pulmón puede determinarse de acuerdo con el conocimiento y la experiencia en la materia. Los criterios de este tipo pueden incluir, por ejemplo, uno o más de los siguientes: enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD) y enfisema con deficiencia en alfa-1-antitripsina caracterizada por uno o más de los siguientes indicadores: FEV1 post-broncodilatador de menos de 25% del valor teórico, hipoxemia en reposo, es decir, PaO2 de menos de 55-60 mm Hg, hipercapnia, hipertensión pulmonar secundaria, una rápida tasa de disminución del FEV1, o exacerbaciones potencialmente mortales, fibrosis quística caracterizada por uno o más de los indicadores siguientes: post-broncodilatador FEV1 inferior al 30% del valor teórico, hipoxemia en reposo; hipercapnia, o frecuencia en aumento y la severidad de las exacerbaciones, fibrosis pulmonar idiopática caracterizada por uno o más de los indicadores siguientes: capacidad vital (VC) y TLC de menos de 60-65% del valor teórico, hipoxemia en reposo;

hipertensión pulmonar secundaria caracterizada por la progresión clínica, radiográfica, o fisiológica, mientras se encuentran en terapia médica; hipertensión pulmonar primaria caracterizada por uno o más de los siguientes indicadores: NYHA clase funcional III o IV, presión media de la aurícula derecha mayor que 10 mm Hg, presión arterial pulmonar media mayor que 50 mm Hg, índice cardíaco menor que 2.5 l/min/m^2 , y fracaso de la terapia con infusión de la prostaciclina a largo plazo.

5.23.7. Trastorno linfoproliferativo posterior al trasplante

La inmunodepresión necesaria para el éxito del trasplante puede dar lugar a un trastorno linfoproliferativo post-trasplante con el origen de células B. En general, un trastorno linfoproliferativo post-trasplante se asocia con células infectadas con el virus Epstein-Barr. El trastorno linfoproliferativo post-trasplante (PTLD) puede oscilar en severidad desde un síndrome autolimitado benigno similar a la mononucleosis a un linfoma no Hodgkin agresivo. Las composiciones y métodos de la presente invención pueden usarse para tratar el PTLD derivado de cualquier trasplante. El trasplante puede ser un trasplante de órgano sólido, por ejemplo, un trasplante de corazón, un trasplante de hígado, un trasplante de riñón o un trasplante combinado de riñón y páncreas. Las composiciones de la invención pueden usarse para tratar el PTLD como parte de un régimen terapéutico que incluye un cese o la reducción temporal de otra terapia inmunosupresora.

Las composiciones de anticuerpos anti-CD19 pueden administrarse como parte de un régimen terapéutico que incluye uno o más de los siguientes: alta dosis intravenosa de gamma globulina, una citoquina, un agente anti-viral, y un anticuerpo monoclonal anti-CD20. El régimen terapéutico puede incluir un cese o la reducción temporal de la terapia inmunosupresora. La gammaglobulina intravenosa puede administrarse en una dosis diaria de 0.4 g/kg durante 1 a 5 días, preferentemente durante 3 días, y la citoquina es interferón alfa administrado durante al menos 7 días. Una o más citoquinas pueden usarse en el régimen. Uno o más agentes anti-virales pueden usarse en el régimen. El agente anti-viral puede seleccionarse de cualquier agente antiviral adecuado conocido por aquellas personas con experiencia en la materia. El agente anti-viral puede ser el aciclovir o el ganciclovir. El agente anti-viral puede administrarse durante al menos una o dos semanas. El agente anti-viral puede administrarse también durante períodos más largos, por ejemplo, 1 mes, 2 meses, 3 meses, 4 meses, o 5 meses.

5.24. Diagnóstico de paciente y regímenes terapéuticos: enfermedad autoinmune

De acuerdo con determinados aspectos de la invención, el régimen de tratamiento y dosis usada con las composiciones de la invención se seleccionan en base a un número de factores que incluyen, pero no se limitan a, el estadio de la enfermedad o el trastorno autoinmune que se trata. Los regímenes de tratamiento apropiados pueden determinarse por alguien con experiencia en la materia para los estadios particulares de una enfermedad o el trastorno autoinmune en un paciente o un una población de pacientes. Las curvas de dosis-respuesta pueden generarse por medio del uso de los protocolos estándares en la materia para determinar la cantidad eficaz de las composiciones de la invención para el tratamiento de los pacientes que tienen diferentes estadios de una enfermedad o trastorno autoinmune. En general, los pacientes que tienen más actividad de una enfermedad o trastorno autoinmune podrán requerir dosis más altas y/o dosis más frecuentes que pueden administrarse durante largos periodos de tiempo en comparación con los pacientes que tienen menos actividad de una enfermedad o trastorno autoinmune.

Los anticuerpos anti-CD19 y las composiciones descritas en la presente pueden practicarse para tratar una enfermedad o trastorno autoinmune. El término "enfermedad o trastorno autoinmune" se refiere a una afección en un individuo caracterizada por la lesión celular, tisular y/o orgánica causada por una reacción inmunológica del individuo a sus propias células, tejidos y/u órganos. El término "enfermedad inflamatoria" se usa indistintamente con el término "trastorno inflamatorio" para referirse a una afección en un individuo caracterizada por inflamación, que incluye, pero no se limita a la inflamación crónica. Los trastornos autoinmunes pueden o no asociarse con la inflamación. Además, la causa de la inflamación puede ser o no un trastorno autoinmune. De este modo, determinados trastornos se pueden caracterizar tanto como trastornos autoinmunes o como inflamatorios. Las enfermedades o los trastornos autoinmunes ejemplares incluyen pero no se limitan a: alopecia areata, espondilitis anquilosante, síndrome antifosfolípido, enfermedad autoinmune de Addison, enfermedades autoinmunes de la glándula suprarrenal, anemia hemolítica autoinmune, hepatitis autoinmune, ooforitis y orquitis autoinmune, trombocitopenia autoinmune, enfermedad de Behcet, el penfigoide ampolloso, miocardiopatía, dermatitis, el esprúe celiaco, síndrome de disfunción inmune de fatiga crónica (CFIDS), polineuropatía desmielinizante crónica inflamatoria, síndrome de Churg-Strauss, el penfigoide cicatricial, síndrome de CREST, enfermedad de la aglutinina fría, enfermedad de Crohn, lupus discoidal, crioglobulinemia esencial mixta, diabetes, fascitis eosinofílica, fibromialgia/fibromiositis, glomerulonefritis, enfermedad de Graves, Guillain-Barre, tiroiditis de Hashimoto, purpura Henoch-Schönlein, fibrosis pulmonar idiopática, trombocitopenia purpura idiopática/autoinmune (ITP), neuropatía IgA, artritis juvenil, liquen plano, lupus eritematoso, enfermedad de Ménière, enfermedad mixta de tejido conectivo, esclerosis múltiple, diabetes mellitus tipo 1 o mediada por la inmunidad, miastenia grave, trastornos asociados con el pénfigo (*por ejemplo*, pénfigo vulgar), anemia perniciosa, poliartritis nodosa, policrondritis, síndromes poliglandulares, polimialgia reumática, polimiositis y dermatomiositis, agammaglobulinemia primaria, cirrosis biliar

primaria, psoriasis, artritis psoriásica, fenómeno de Raynaud, síndrome de Reiter, artritis reumatoide, sarcoidosis, esclerodermia, síndrome de Sjögren, síndrome del hombre rígido, lupus eritematoso sistémico (SLE), síndrome de Sweet, enfermedad de Still, lupus eritematoso, arteritis takayasu, arteritis temporal/arteritis de célula gigante, colitis ulcerativa, uveitis, vasculitis tales como dermatitis vasculitis herpetiforme, vitíligo, y granulomatosis de Wegener. Los ejemplos de trastornos inflamatorios incluyen, pero no se limitan, asma, encefalitis, enfermedad intestinal inflamatoria, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), trastornos alérgicos, choque séptico, fibrosis pulmonar, espondiloartropatía indiferenciada, artropatía indiferenciada, artritis, osteolisis inflamatoria, la enfermedad de injerto contra huésped, urticaria, síndrome de Vogt-Koyanagi-Harelda e inflamación crónica resultante de las infecciones virales o bacterianas.

La inmunoterapia con anti-CD19 incluye la administración de un anticuerpo anti-CD19 como un agente terapéutico simple para el tratamiento de una enfermedad o trastorno autoinmune. Una inmunoterapia con anti-CD19 puede incluir la administración de un anticuerpo anti-CD19 capaz de inhibir *in vitro* la proliferación de las células B estimuladas. Una inmunoterapia con anti-CD19 puede incluir la administración de una variante de Fc del anticuerpo anti-CD19 donde dicha variante de Fc tiene alterada la afinidad de unión para uno o más ligandos de Fc en relación a una molécula comparable no variante. Una inmunoterapia con anti-CD19 puede incluir la administración de una variante de Fc de un anticuerpo anti-CD19 donde dicha variante de Fc tiene mejorada la unión al receptor Fc gamma IIB en relación a un dominio Fc no variante comparable.

La inmunoterapia con el anti-CD19 incluye además la administración de un anticuerpo anti-CD19 biespecífico tal como un agente terapéutico simple para el tratamiento de una enfermedad o trastorno autoinmune. Una inmunoterapia con el anti-CD19 puede incluir la administración de un anticuerpo anti-CD19 biespecífico capaz de unirse específicamente a un primer y segundo antígeno, donde dicho primer antígeno es el CD19 humano y dicho segundo antígeno es un receptor Fc gamma seleccionado del grupo que consiste de FcγRI, FcγRIIA, FcγRIIB, FcγRIIIA y/o FcγRIV. Una inmunoterapia con el anti-CD19 puede incluir la administración de un anticuerpo anti-CD19 biespecífico capaz de unirse específicamente al CD19 humano y al FcγRIIB.

El CD19 se expresa en las células B inmaduras, por lo tanto un AcM anti-CD19 puede ser particularmente adecuado para depletar las células pre-B y las células B inmaduras, *por ejemplo*, en la médula ósea.

5.24.1. Diagnóstico de enfermedades o trastornos autoinmunes

El diagnóstico de una enfermedad o trastorno autoinmune es complicado en el sentido de que cada tipo de enfermedad o trastorno autoinmune se manifiesta entre los pacientes de manera diferente. Esta heterogeneidad de los síntomas significa que típicamente múltiples factores se usan para alcanzar un diagnóstico clínico. En general, los médicos usan factores, tales como, pero no se limitan a, la presencia de autoanticuerpos, los niveles elevados de citoquinas, la disfunción de órganos específicos, las erupciones cutáneas, las hinchazón de las articulaciones, el dolor, la remodelación de los huesos, y la pérdida de movimiento como indicadores principales de una enfermedad o trastorno autoinmune. Para determinadas enfermedades o trastornos autoinmunes, tales como RA y SLE, se conocen en la materia los estándares para el diagnóstico. Para determinadas enfermedades o trastornos autoinmunes, los estadios de la enfermedad se han caracterizado y se conocen bien en la materia. Estos métodos reconocidos en la materia para el diagnóstico de enfermedades y trastornos autoinmunes, así como los estadios de la enfermedad y las escalas de actividad y/o severidad de la enfermedad que se conocen bien en la materia pueden usarse para identificar a los pacientes y poblaciones de pacientes con necesidad de tratamiento para una enfermedad o trastorno autoinmune por medio del uso de las composiciones de la invención.

5.24.2. Criterios clínicos para el diagnóstico de enfermedades o trastornos autoinmunes

Los criterios de diagnóstico para diferentes enfermedades o trastornos autoinmunes se conocen en la materia. Históricamente, el diagnóstico típicamente se basa en una combinación de los síntomas físicos. Más reciente, las técnicas moleculares, tales como el perfil de expresión génica se han aplicado para desarrollar definiciones moleculares de las enfermedades o trastornos autoinmunes. Los métodos ejemplares para el diagnóstico clínico de enfermedades o trastornos autoinmunes particulares se proporcionan a continuación. Otros métodos adecuados serán evidentes para aquellos con experiencia en la materia.

Los pacientes con bajos niveles de actividad de la enfermedad autoinmune o los pacientes con un estadio temprano de una enfermedad autoinmune (para las enfermedades donde se reconocen los estadios) pueden identificarse para el tratamiento por medio del uso de las composiciones y los métodos de los anticuerpos anti-CD19. El diagnóstico precoz de la enfermedad autoinmune es difícil debido a los síntomas generales y la superposición de síntomas entre las enfermedades. Un paciente que se trata en un estadio temprano o con bajos niveles de actividad de una enfermedad autoinmune puede tener síntomas que comprenden al menos un síntoma de una enfermedad o trastorno autoinmune. Un

paciente que se trata en un estadio temprano o con bajos niveles de una enfermedad autoinmune puede tener síntomas que comprende al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, o 15 síntomas de una enfermedad o trastorno autoinmune. Los síntomas pueden ser de cualquiera de las enfermedades o trastornos autoinmunes o una combinación de éstos. Los ejemplos de los síntomas de enfermedades o trastornos autoinmunes se describen a continuación.

5.24.3. Artritis reumatoide

La artritis reumatoide es una enfermedad crónica que se caracteriza principalmente por la inflamación de la mucosa o el revestimiento o la membrana sinovial, de las articulaciones. Esto puede conducir a daños en las articulaciones a largo plazo, lo que da lugar a dolor crónico, la pérdida de la función y la discapacidad. La identificación de los pacientes o poblaciones de pacientes con necesidad de tratamiento para la artritis reumatoide es un proceso. No existe una prueba definitiva que proporcione un diagnóstico positivo o negativo de la artritis reumatoide. Los médicos se basan en una serie de herramientas que incluye, las historias clínicas, los exámenes físicos, las pruebas de laboratorio y los rayos-x.

Los síntomas físicos varían ampliamente entre los pacientes e incluyen comúnmente, pero no se limitan a, hinchazón de las articulaciones, dolor articular, pérdida de movimiento en las articulaciones, desalineación de las articulaciones, remodelación ósea, fatiga, rigidez (particularmente en la mañana y al estar sentado durante largos periodos de tiempo), debilidad, síntomas similares a la gripe (que incluyen la fiebre de bajo grado), dolor asociado con estar sentado durante mucho tiempo, aparición de señales de actividad de la enfermedad seguidos de una remisión o inactividad de la enfermedad, nódulos reumatoides o abultamientos del tejido bajo la piel (típicamente se encuentran en los codos, que pueden indicar la actividad más grave de la enfermedad), dolor muscular, pérdida de apetito, depresión, pérdida de peso, anemia, manos y pies fríos y/o sudorosos, y afectación de las glándulas alrededor de los ojos y la boca, lo que provoca una menor producción de lágrimas y saliva (el síndrome de Sjögren). Específicamente para el síndrome de Sjögren, se pueden usar las siguientes referencias, Fox y otros. *Arthritis Rheum.* (1986) 29:577-586, y Vitali y otros. *Ann. Rheum. Dis.* (2002). 61:554-558.

Además de los síntomas físicos, los médicos comúnmente usan pruebas, tales como, pero no se limitan a, hemograma completo, velocidad de sedimentación globular (ESR o eritrosedimentación), proteína C-reactiva, factor reumatoide, anticuerpos anti-ADN, anticuerpos antinucleares (ANA), anticuerpos anti-cardiolipina, estudios de imagen, radiografías (rayos-X), resonancia magnética (MRI) de las articulaciones u órganos, ultrasonografía de la articulación, gammagrafía ósea y densitometría ósea (DEXA). Estas pruebas son ejemplos de pruebas que se pueden usar junto con las composiciones de la invención para comprobar las anomalías que pudieran existir (*es decir*, identificar a los pacientes o poblaciones de pacientes con necesidad de tratamiento) o para monitorear los efectos secundarios de los fármacos y comprobar el progreso.

Los primeros síntomas de la artritis reumatoide comúnmente se encuentran en las pequeñas articulaciones de los dedos, las manos y las muñecas. La afectación articular es por lo general simétrica, lo que significa que si una articulación que duele en la mano izquierda, la misma articulación dolerá en la mano derecha. En general, más erosión articular indica actividad más grave de la enfermedad.

Los síntomas de la actividad más avanzada de la enfermedad incluyen los daños de cartílago, tendones, ligamentos y hueso, lo que causa la deformidad e inestabilidad en las articulaciones. El daño puede conducir a la oscilación limitada de movimiento, lo que da lugar a que las tareas diarias (agarrar un tenedor, peinarse, abotonarse una camisa) se conviertan más difíciles. Las úlceras en la piel, la mayor sensibilidad a la infección, y un descenso general de la salud son también indicadores de la actividad más avanzada de la enfermedad.

La progresión de la artritis reumatoide se divide comúnmente en tres estadios. El primer estadio es la hinchazón de la membrana sinovial, causando provoca dolor, calor, rigidez, enrojecimiento e hinchazón alrededor de la articulación. El segundo es la rápida división y el crecimiento de las células, o pannus, que provoca se vuelva espesa la membrana sinovial. En el tercer estadio, las células inflamadas liberan enzimas que pueden digerir huesos y cartílagos, lo que provoca con frecuencia que la articulación afectada pierda su forma y la alineación, más dolor, y la pérdida de movimiento.

Las técnicas moleculares pueden usarse también para identificar a los pacientes o poblaciones de pacientes con necesidad de tratamiento. Por ejemplo, se ha demostrado que la artritis reumatoide se asocia con polimorfismos alélicos del antígeno de leucocitos humanos (HLA)-DR4 y genes HLA-DRB (Ollier y Winchester, 1999, *Genes and Genetics of Autoimmunity*. Basel, Suiza; Stastny, 1978, *N. Engl J Med* 298:869-871; y Gregersen y otros, 1987, *Arthritis Rheum* 30:1205-1213). Los pacientes con artritis reumatoide expresan con frecuencia dos alelos HLA-DRB1*04 asociados a la enfermedad (Weyand y otros., 1992 *Ann Intern Med.* 117:801-806). Los pacientes pueden evaluarse para polimorfismos alélicos por medio del uso de métodos estándares en la materia. Los genes MHC no son los únicos genes codificados por la línea germinal que influyen en la sensibilidad de la RA, que pueden usarse para diagnosticar o identificar a los

pacientes o poblaciones de pacientes con necesidad de tratamiento. En el sexo femenino se incrementa claramente el riesgo, y los pacientes femeninos desarrollan un fenotipo distinto de la enfermedad que los pacientes masculinos. Cualquiera de los indicadores moleculares de la artritis reumatoide puede usarse para identificar a los pacientes o poblaciones de pacientes con necesidad de tratamiento con una composición o método del anticuerpo anti-CD19.

5

Los métodos para determinar la actividad de la artritis reumatoide en un paciente con relación a una escala de actividad se conocen bien en la materia y pueden usarse en conjunto con las composiciones farmacéuticas de la invención. Por ejemplo, la puntuación del Colegio Americano de Reumatólogos (puntuación ACR) puede usarse para determinar la actividad de la artritis reumatoide de un paciente o una población de pacientes. De acuerdo con este método, a los

10

Inicialmente, un paciente que presenta los síntomas de la artritis reumatoide puede tratarse con un analgésico. En otras modalidades, un paciente diagnosticado con o que presenta los síntomas de la artritis reumatoide se trata inicialmente con compuestos antiinflamatorios no esteroideos (NSAID). A medida que la enfermedad progresa y/o los síntomas aumentan en gravedad, la artritis reumatoide puede tratarse mediante la administración de esteroides tales como, pero no se limitan a la dexametasona y la prednisona. En casos más graves, un agente quimioterapéutico, tal como, pero sin limitarse al metotrexato o la citoxina pueden administrarse para aliviar los síntomas de la artritis reumatoide.

15

En determinados ejemplos, la artritis reumatoide puede tratarse por la administración de oro, mientras que en otros ejemplos puede administrarse un biológico, tal como un anticuerpo o un receptor (o el análogo al receptor). Los ejemplos de anticuerpos terapéuticos de este tipo son el Rituxin y el Remicade. Un ejemplo ilustrativo de un receptor soluble que puede administrarse para tratar la artritis reumatoide es el Enbrel.

20

En extremadamente graves de artritis reumatoide, puede indicarse la cirugía. Los enfoques quirúrgicos pueden incluir pero no se limitan a: sinovectomía para reducir la cantidad de tejido inflamatorio mediante la eliminación de la membrana sinovial o revestimiento de la articulación enferma; cirugía artroscópica para tomar muestras de tejido, eliminar el cartílago suelto, reparar los lagrimales, suavizar una superficie rugosa o eliminar el tejido sinovial enfermo; osteotomía, que significa "cortar el hueso", este procedimiento se usa para aumentar la estabilidad mediante la redistribución del peso sobre la articulación; cirugía de reemplazo articular, o artroplastia para la reconstrucción quirúrgica o reemplazo de una articulación; o artrodesis o fusión para fusionar dos huesos a la vez.

25

Un paciente puede tratarse con un anticuerpo anti-CD19, previamente, concurrentemente o posteriormente a cualquiera de las terapias descritas anteriormente. Además, los anticuerpos anti-CD19 de la presente invención pueden administrarse en combinación con cualquiera de los agentes analgésicos, NSAID, esteroides, o quimioterapéuticos indicados anteriormente, así como en combinación con un biológico administrado para el tratamiento de la artritis reumatoide.

35

5.24.4. Lupus eritematoso sistémico (SLE)

40

El lupus eritematoso sistémico (SLE) es una enfermedad reumática crónica (de larga duración) que afecta articulaciones, músculos y otras partes del cuerpo. Los pacientes o poblaciones de pacientes con necesidad de tratamiento para el SLE pueden identificarse por medio del examen de los síntomas físicos y/o los resultados de las pruebas de laboratorio. Los síntomas físicos varían ampliamente entre los pacientes. Por ejemplo, en el SLE, típicamente 4 de los siguientes 11 síntomas existen antes de que un paciente se diagnostique con el SLE: 1) erupción malar: erupción en las mejillas; 2) erupción discoide: realce del enrojecimiento, 3) fotosensibilidad: reacción a la luz solar, que resulta en el desarrollo o aumento de erupciones en la piel; y 4) úlceras orales: úlceras en la nariz o boca, por lo general indoloras; 5) artritis: artritis no erosiva que involucra dos o más articulaciones periféricas (artritis en la que los huesos que rodean las articulaciones no se destruyen); 6) serositis, pleuritis o pericarditis: (inflamación del revestimiento del pulmón o del corazón); 7) trastorno renal: exceso de proteína en la orina (mayor de 0.5 gm/día o 3+ en las tiras reactivas) y/o los cilindros celulares (elementos anormales de la orina, derivados de los glóbulos rojos y/o blancos y/o células del túbulo renal); 8) trastorno neurológico: ataque (convulsiones) y/o psicosis en ausencia de fármacos o trastornos metabólicos que se conocen por causar efectos de este tipo; 9) trastorno hematológico: anemia hemolítica o leucopenia (conteo de glóbulos blancos por debajo de 4000 células por milímetro cúbico) o linfopenia (menos de 1500 linfocitos por milímetro cúbico) o trombocitopenia (menos de 100 000 plaquetas por milímetro cúbico) (leucopenia y linfopenia se deben detectar en dos o más ocasiones. La trombocitopenia se debe detectar en ausencia de fármacos conocidos para inducirla); 10) anticuerpos antinucleares. Prueba positiva para los anticuerpos antinucleares (ana) en ausencia de fármacos conocidos para inducir ésta y/o 11) trastorno inmunológico: prueba positiva de anticuerpos anti-ADN de doble cadena, prueba de los anticuerpos anti-sm, anticuerpos antifosfolípidos positivos tal como la anticardiolipina, o prueba falsa positiva para la sífilis (vdrl).

45

50

55

60

Otros síntomas físicos que pueden indicar la presencia de SLE incluyen, pero no se limitan a, anemia, fatiga, fiebre, erupciones en la piel, dolores musculares, náuseas, vómitos y diarrea, inflamación de los ganglios, pérdida de apetito, sensibilidad al frío (fenómeno de Raynaud), y pérdida de peso.

5 Las pruebas de laboratorio pueden usarse también para identificar a los pacientes o poblaciones de pacientes con necesidad de tratamiento. Por ejemplo, una prueba de sangre se puede usar para detectar unos autoanticuerpos que se encuentran en la sangre de casi todas las personas con SLE. Estas pruebas pueden incluir, pero no se limitan a las pruebas para los anticuerpos antinucleares (ANA) en ausencia de fármacos conocidos que inducen éste (Rahman, A. y Hiepe, F. *Lupus*. (2002). 11 (12):770-773), anti-ADN anti-doble cadena (Keren, D.F. *Clin. Lab. Med.* (2002) 22(2):447-474.), anti-Sm, anticuerpos anti-fosfolípidos tales como anticardiolipina (Gezer, S. *Dis. Mon.* 2003. 49(12):696-741), o pruebas de falsos positivos para sífilis (VDRL).

10 Otras pruebas pueden incluir una prueba del complemento (C3, C4, CH50, CH100) pueden usarse para medir la cantidad de proteínas del complemento circulante en la sangre (Manzi y otros *Lupus* 2004. 13(5):298-303), una velocidad de sedimentación (ESR) o la proteína C reactiva (CRP) pueden usarse para medir los niveles de la inflamación, un análisis de orina puede usarse para detectar problemas renales, los rayos X de tórax pueden realizarse para detectar el daño pulmonar, y un EKG puede usarse para detectar los problemas del corazón.

15 El SLE crónico se asocia con la acumulación de daños colaterales en los órganos involucrados, el riñón en particular. Como consecuencia, la intervención terapéutica temprana se desea, *es decir*, antes de, por ejemplo, la insuficiencia renal. Los tratamientos disponibles para el SLE son similares a los disponibles para la artritis reumatoide. Estos incluyen los tratamientos iniciales, ya sea con un analgésico o un compuesto antiinflamatorio no esteroideo (NSAID). A medida que la enfermedad progresa y/o aumenta la gravedad de los síntomas, el SLE puede tratarse por la administración de esteroides tales como, pero no se limitan a la dexametasona y la prednisona.

20 En casos más severos, un agente quimioterapéutico, tal como, pero sin limitarse al metotrexato o la citoxina pueden administrarse para aliviar los síntomas de SLE. Sin embargo, no se prefiere este enfoque cuando el paciente es una mujer en edad fértil. En tales casos, se prefieren los enfoques terapéuticos que no interfieren con la capacidad reproductiva del paciente.

25 En determinados ejemplos, el SLE puede tratarse por la administración de un biológico, tal como un anticuerpo o un receptor (o el análogo al receptor). Los ejemplos de anticuerpos terapéuticos de este tipo son Rituxin y Remicade. Un ejemplo ilustrativo de un receptor soluble para una citoquina inflamatoria que puede administrarse para el tratamiento del SLE es el Enbrel.

30 Un paciente puede tratarse con un anticuerpo anti-CD19 antes, concurrente o posterior a cualquiera de las terapias descritas anteriormente que se usan para el tratamiento del SLE. Además, los anticuerpos anti-CD19 de la presente invención pueden administrarse en combinación con cualquiera de los agentes analgésicos, NSAID, esteroides, o quimioterapéuticos indicados anteriormente, así como en combinación con un biológico administrado para el tratamiento del SLE.

5.24.5. Púrpura trombocitopénica idiopática/autoinmune (ITP)

35 La trombocitopenia púrpura idiopática/autoinmune (ITP) es un trastorno de la sangre caracterizado por autoanticuerpos inmunoglobulina G (IgG) que interactúan con las plaquetas y dan lugar a la destrucción de las células de plaquetas. Típicamente, los anticuerpos son específicos para las glicoproteínas de membrana de las plaquetas. El trastorno puede ser agudo (temporal, que dura menos de 2 meses) o crónico (que persiste por más de 6 meses). Los pacientes o poblaciones de pacientes con necesidad de tratamiento para la ITP pueden identificarse por el examen de la historia clínica de un paciente, los síntomas físicos y/o los resultados de las pruebas de laboratorio. (Provan, D., y Newland, A., Br. J. Haematol. (2002) 118(4):933-944; George, J.N. *Curr. Hematol.* (2003) 2(5):381-387; Karptkin, S. *Autoimmunity*. (2004) 37(4):363-368; Cines, D.B., y Blanchette, V. S., N. Engl. J. Med. (2002) 346(13) 995-1008).

40 Los síntomas físicos incluyen el aspecto púrpura de áreas de la piel y membranas mucosas (tales como el revestimiento de la boca) donde la hemorragia se produjo como resultado de una disminución en el número de células de plaquetas. El principal síntoma es la hemorragia, que puede incluir moretones ("equimosis") y pequeños puntos rojos en la piel o membranas mucosas ("petequias"). En algunos ejemplos, la hemorragia de la nariz, encías, tractos digestivos o urinarios pueden producirse también. En raras ocasiones, ocurre la hemorragia dentro del cerebro. Los signos, los síntomas comunes y los factores precipitantes incluyen también, pero no se limitan a, inicio brusco (ITP infantil), inicio gradual (ITP adulto), petequias no palpables, púrpura, menorragia, epistaxis, hemorragia gingival, bulas hemorrágicas en las mucosas, signos de la hemorragia GI, menometrorragia, evidencia de hemorragia intracraneal, bazo no palpable,

hemorragias de la retina, inmunización reciente de virus vivos (ITP infantil), enfermedad viral reciente (ITP infantil), hemorragia espontánea cuando el conteo de plaquetas es menor que 20 000/mm³, y tendencia a moretones.

La prueba de laboratorio que se puede usar para diagnosticar la ITP incluye, pero no se limita a, un hemograma completo, o un examen de médula ósea para verificar que existen células formadoras de plaquetas adecuadas (megacariocitos) en la médula y para descartar otras enfermedades tales como cáncer metastásico y leucemia. La trombocitopenia aislada es el hallazgo clave con respecto a la evaluación de laboratorio. Las plaquetas gigantes en frotis de sangre periférica son indicativas de trombocitopenia congénita. Un análisis por CT de cabeza puede justificar si existen preocupaciones con respecto a la hemorragia intracraneal.

Los tratamientos actuales para la ITP incluyen, transfusiones de plaquetas y esplenectomía. Otros tratamientos incluyen la administración de glucocorticoides, administración de agentes inmunosupresores, administración de agentes que mejoran la producción de plaquetas, tal como IL-11, y agentes que activan los megacariocitos para producir plaquetas, tal como trombopoyetina (TPO).

En casos más severos, un agente quimioterapéutico, tal como, pero sin limitarse a vincristina y vinblastina puede administrarse para aliviar los síntomas de la ITP. Sin embargo, no se prefiere este enfoque cuando el paciente es una mujer en edad fértil. En tales ejemplos, se prefieren los enfoques terapéuticos que no interfieren con la capacidad reproductiva del paciente.

En determinados ejemplos, la ITP puede tratarse por la administración de un biológico, tal como un anticuerpo o un receptor (o análogo al receptor). Los ejemplos de anticuerpos terapéuticos de este tipo son los anticuerpos anti-CD20, tal como, rituximab.

Un paciente puede tratarse con un anticuerpo anti-CD19 antes, concurrente o posterior a cualquiera de las terapias descritas anteriormente que se usan para el tratamiento de la ITP. Además, los anticuerpos anti-CD19 de la presente invención pueden administrarse en combinación con cualquiera de los agentes indicados anteriormente, así como en combinación con un biológico administrado para el tratamiento de la ITP.

5.24.6. Trastornos de pénfigo y asociados a pénfigo (penfigoide)

Tanto el trastorno de pénfigo como el trastorno asociado a penfigoide son un grupo heterogéneo de enfermedades autoinmunes que se caracterizan por una afección de formación de ampollas en las superficies de la piel y/o mucosas. En ambas enfermedades, la formación de ampollas es causada por anticuerpos autoinmunes que reconocen diferentes proteínas expresadas en la superficie de las células epiteliales de la dermis y/o epidermis.

En pacientes con enfermedad asociada al pénfigo, la formación de ampollas se produce dentro de la epidermis y se debe a la unión de autoanticuerpos específicos para la desmogleína 1 (Dsg1) y/o desmogleína 3 (Dsg3). Los subtipos clásicos de pénfigo pueden distinguirse de acuerdo a las especificidades de los anticuerpos anti-desmogleína. Los pacientes con pénfigo foliáceo (PF) sólo producen anticuerpos anti-Dsg1. Los pacientes con pénfigo vulgar (PV) y pénfigo paraneoplásico (PNP) producen anticuerpos anti-Dsg3 si sus lesiones se limitan a los tejidos de las mucosas. En contraste, los pacientes con PV y PNP con lesiones de la piel y mucosas producen anticuerpos tanto anti-Dsg1 como anti-Dsg3. (Nagasaka, T., y otros J. Clin. Invest. 2004. 114:1484-1492; Seishema, M., y otros Arch Dermatol. 2004. 140(12):1500-1503; Amagai, M., J. Dermatol. Sci. 1999. 20(2):92-102).

En los pacientes con enfermedades relacionadas con penfigoide que incluyen pero no se limitan a, penfigoide ampolloso, ampolla urticaria penfigoide, penfigoide cicatricial, epidermólisis ampollosa adquirida, y dermatosis ampollosa IgA lineal, la formación de ampollas se produce en la interfase de la dermis con la epidermis. La forma más común de la enfermedad penfigoide es la ampolla penfigoide (BP) que se caracteriza por la presencia de autoanticuerpos que se unen al antígeno 180 de penfigoide ampollar 180 (BP180), antígeno 230 penfigoide ampollar (BP230), laminina 5, y/o la integrina beta 4. (Fontao, L., y otros Mol. Biol. Cell. 2003) 14(5):1978-1992; Challacombe, S. J., y otros, Acta Odontol. Scand. (2001). 59(4):226-234.)

Los pacientes o poblaciones de pacientes con necesidad de tratamiento para los trastornos de pénfigo o asociados al penfigoide se pueden identificar por el examen de la historia clínica de un paciente, los síntomas físicos y/o los resultados de las pruebas de laboratorio (revisado en: Mutasim, D.F. Drugs Aging. (2003).20(9):663-681; Yeh, S.W. y otros Dermatol. Ther. (2003). 16(3):214-223; Rosenkrantz, W.S. Vet. Dermatol. 15(2):90-98.).

Típicamente, el diagnóstico de estos trastornos pénfigo o asociados al penfigoide se hace por biopsia de la piel. La muestra de biopsia de piel se examina al microscopio para determinar la localización anatómica de la ampolla (*por ejemplo*, epidermis o entre la dermis y epidermis). Estos hallazgos se correlacionan con los análisis inmunohistoquímicos

directos o indirectos para detectar la presencia de autoanticuerpos en el sitio de la lesión. Las muestras de suero de los pacientes pueden examinarse también para detectar la presencia de autoanticuerpos circulantes por medio del uso de una prueba basada en ELISA para las proteínas específicas. Varios ensayos basados en ELISA se han descrito para la detección de los anticuerpos antidesmogleína en muestras humanas (Hashimoto, T. Arch. Dermatol Res. (2003) 295 Suplemento.1: S2-11). La presencia de estos autoanticuerpos antidesmogleína en las muestras de biopsia es el diagnóstico de pénfigo.

Clínicamente, el pénfigo vulgar se puede diagnosticar por la presencia de ampollas en la boca. La inflamación o erosiones pueden presentarse también en el revestimiento del ojo y párpados, y membranas de la nariz o del tracto genital. La mitad de los pacientes desarrollan también ampollas o erosiones de la piel, a menudo en áreas de la ingle, axilas, cara, cuero cabelludo y tórax. El pénfigo foliáceo es una forma superficial, relativamente leve de pénfigo. Por lo general, se manifiesta en la cara y cuero cabelludo, pero involucra también la espalda y pecho. Las lesiones no se producen en la boca. Las ampollas son más limitadas a la superficie más externa y pican con frecuencia. El pénfigo paraneoplásico es muy raro y en general se presenta en personas que tienen cáncer. Las lesiones son dolorosas y afectan a la boca, labios y esófago (tubo para tragar), así como la piel. Debido a la afectación de las vías respiratorias, se podrían presentar signos de enfermedad respiratoria y puede ser potencialmente mortal.

Los tratamientos actuales para la enfermedad pénfigo o asociada a penfigoide incluyen la administración tópica de cremas y ungüentos para aliviar las molestias asociadas con la afección de la piel, administración de agentes anti-inflamatorios o administración de agentes inmunosupresores.

Un paciente se puede tratar con un anticuerpo anti-CD19 antes, concurrente o posterior a cualquiera de las terapias descritas anteriormente que se usan para el tratamiento de la enfermedad pénfigo o asociada con penfigoide. Además, los anticuerpos anti-CD19 de la presente invención pueden administrarse en combinación con cualquiera de los agentes mencionados anteriormente.

5.24.7. Diabetes autoinmune

Un paciente con necesidad de tratamiento para la diabetes autoinmune, conocida también como diabetes tipo 1A, puede tratarse con las composiciones de los anticuerpos anti-CD19. La diabetes tipo 1 es una enfermedad autoinmune causada por los efectos sinérgicos de factores genéticos, ambientales e inmunológicos que finalmente destruyen las células beta pancreáticas. Las consecuencias de la destrucción de las células beta pancreáticas son una disminución de la masa de células beta, una reducción de la producción/secreción de insulina y un aumento gradual en los niveles de glucosa en la sangre

Los pacientes o poblaciones de pacientes con necesidad de tratamiento para la diabetes tipo 1A pueden identificarse por el examen de la historia clínica de un paciente, los síntomas físicos y/o los resultados de las pruebas de laboratorio. Los síntomas aparecen con frecuencia repentinamente e incluyen, pero no se limitan a, niveles bajos o inexistentes de insulina en la sangre, sed aumentada, aumento de orina, hambre constante, pérdida de peso, visión borrosa, y/o fatiga. La diabetes manifiesta, por lo general, no se hace evidente hasta que la mayoría de las células beta se destruyen (> 80%). Típicamente, la diabetes se diagnostica clínicamente si un paciente tiene una concentración de glucosa en sangre aleatoria (sin tener en cuenta el tiempo transcurrido desde la última comida) de ≥ 11.1 mmol/l (200mg/dl) y/o glucosa plasmática en ayuno (sin ingestión calórica al menos 8 horas) de ≥ 7.0 mmol/l (126 mg/dl) y/o una glucosa plasmática de dos horas ≥ 11.1 mmol/l (200mg/dl). Lo ideal sería que estas pruebas se repitieran en días diferentes, con resultados comparables antes de que se confirme el diagnóstico. (Harrison's Principles of Internal Medicine, 16^{ta} edición/Editores, Dennis L. Kasper, y otros. The McGraw-Hill Companies, Inc. 2005, Nueva York, Nueva York).

A pesar de que se desconoce la etiología precisa de la diabetes tipo 1A, no existe vínculo genético claro con serotipos específicos de HLA. En particular, la diabetes autoinmune se asocia con los serotipos HLA DR3 y los serotipos DR4. La presencia tanto de DR3 como DR4 confiere mayor riesgo genético conocido. La sensibilidad a la diabetes autoinmune se relaciona también con HLA clase II (HLA-DQB1*0302. En contraste los haplotipos de HLA con DRB1-1501 y DQA1-0102-0602-DQB1 se asocian con la protección de la diabetes tipo 1A (Redondo, MJ, y otros. J. Clin. Endocrinol. Metabolism (2000) 10:3793-3797).

La destrucción de las células beta de los islotes que producen la insulina puede acompañarse de los autoanticuerpos contra las células de los islotes, infiltrados linfocitarios activados en el páncreas y los ganglios linfáticos de drenaje, respuesta de los linfocitos T a las proteínas celulares de los islotes y liberación de citoquinas inflamatorias dentro de los islotes (Harrison's Principles of Internal Medicine, 16^{ta} edición/editores, Dennis L. Kasper, y otros. The McGraw-Hill Companies, Inc. 2005 Nueva York, Nueva York).

Los autoanticuerpos asociados con la diabetes tipo 1A incluyen pero no se limitan a los anticuerpos que se unen a la insulina, ácido glutámico descarboxilasa (GAD), ICA-512/IA-2, fognina, gangliósidos del islote y carboxipeptidasa H (Gianani, R. y Eisenbarth, G.S. Immunol. Rev. (2005) 204:232-249; Kelemen, K. y otros, J. Immunol. (2004) 172(6):3955-3962); Falorni, A. y Borozzetti, A. Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab. 2005. 19(1):119-133.)

Los tratamientos actuales para la diabetes autoinmune incluyen la administración de vitamina D, corticosteroides, agentes que controlan la presión arterial y agentes que controlan la glucemia (niveles de azúcar en la sangre).

Un paciente puede tratarse con un anticuerpo anti-CD19 antes, concurrente o posterior a cualquiera de las terapias descritas anteriormente que se usan para el tratamiento de la diabetes autoinmune. Además, los anticuerpos anti-CD19 de la presente invención se pueden administrar en combinación con cualquiera de los agentes mencionados anteriormente.

5.24.8. Esclerosis sistémica (esclerodermia) y trastornos asociados

La esclerosis sistémica conocida también como esclerodermia incluye un grupo heterogéneo de enfermedades, que incluyen pero no se limitan a, enfermedad cutánea limitada, enfermedad cutánea difusa, sine-esclerodermia, enfermedad indiferenciada del tejido conectivo, síndromes de superposición, esclerodermia localizada, morfea, esclerodermia lineal, golpe de sable, esclerodermia del adulto de Buschke, escleromixedema, enfermedad crónica del injerto contra huésped, fascitis eosinofílica, esclerosis digital en la diabetes, y aniloidosis primaria y aniloidosis asociada al mieloma múltiple (revisado en: Harrison's Principles of Internal Medicine, 16^a edición/editores, Dennis L. Kasper, y otros The McGraw-Hill Companies, Inc. 2005 Nueva York, Nueva York).

Las características clínicas asociadas a la esclerodermia pueden incluir el fenómeno de Raynaud, engrosamiento de la piel, calcinosis subcutánea, telangiectasias, artralgias/artritis, miopatía, alteración de la motilidad esofágica, fibrosis pulmonar, hipertensión arterial pulmonar aislada, insuficiencia cardíaca congestiva y crisis renal. El grado en que un paciente muestra una o más de estas manifestaciones de la enfermedad pueden influir en el diagnóstico y plan de tratamiento potencial.

Los autoanticuerpos incluyen: anti-topoisomerasa 1, anticentrómero, anti-ARN polimerasa I, II y/o III, anti-Th RNP, anti-U, RNP (anti-fibrilarina), anti-PM/Sci, anticuerpos antinucleares (ANA).

La identificación de pacientes y poblaciones de pacientes con necesidad de tratamiento de la esclerodermia se puede basar en la historia clínica y los hallazgos físicos. Los pacientes o poblaciones de pacientes con necesidad de tratamiento para la esclerodermia pueden identificarse por el examen de la historia clínica de un paciente, los síntomas físicos y/o los resultados de las pruebas de laboratorio. El diagnóstico se puede retrasar en pacientes sin engrosamiento significativo de la piel. Las pruebas de laboratorio, rayos X, pruebas de función pulmonar, y la piel o biopsias renales (riñón) pueden usarse para determinar el alcance y la gravedad de la afectación de los órganos internos.

En los primeros meses o años de inicio de la enfermedad, la esclerodermia puede parecerse a muchas otras enfermedades del tejido conectivo, tales como, pero no limitado a, el lupus eritematoso sistémico, polimiositis y artritis reumatoide.

El síntoma más clásico de la esclerosis sistémica (esclerodermia) es esclerodactilia. Los síntomas iniciales incluyen hinchazón de manos, que a veces progresa a esta deformidad cónica y, como de garra. No todas las personas con esclerodermia desarrollan este grado de endurecimiento de la piel. Otros síntomas pueden incluir esclerodactilia morfea lineal (dedos endurecidos), síndrome de Raynaud, calcinosis y telangiectasias.

Los exámenes de sangre tales como las pruebas de anticuerpos antinucleares (ANA) pueden usarse en el diagnóstico tanto de la esclerodermia localizada y la sistémica. Por ejemplo, los anticuerpos anti-centrómero (ACA) y los anticuerpos anti-Sci-70 son indicativos de los pacientes que necesitan tratamiento para la esclerosis sistémica (Ho y otros, 2003, Arthritis Res Ther 5:80-93.); los anticuerpos anti-topo II alfa son indicativo de los pacientes que necesitan tratamiento para la esclerodermia locales; y los anticuerpos anti-topo I alfa son indicativo de los pacientes que necesitan tratamiento para la esclerodermia sistémica. Varios tipos de esclerodermia y los métodos para el diagnóstico de estos tipos son reconocidos y bien conocidos en la materia, que incluyen, pero no se limitan a, esclerodermia juvenil (Foeldvari, Curr Opin Rheumatol 14:699-703 (2002); Cefle y otros, Int J. Clin Pract 58:635-638 (2004)), esclerodermia localizada, esclerodermia nodular (Cannick, J Rheumatol 30:2500-2502 (2003.)), y esclerodermia sistémica, que incluye pero no se limita a, calcinosis, de Raynaud, de esófago, esclerodactilia y telangiectasias (CREST), esclerodermia sistémica limitada y esclerodermia sistémica difusa. La esclerodermia sistémica también se conoce como esclerosis sistémica (CDC). También puede referirse como la esclerosis sistémica progresiva (PSSC), o esclerosis sistémica progresiva familiar (FPSSc) (Nadashkevich y otros, Med Sci Monit 10: CDR615-621 (2004); Frances y otros, Rev Prat 52:1884-90 (2002)).

La esclerosis sistémica es un trastorno multisistémico caracterizado por la presencia de la esclerosis del tejido conectivo, anomalías vasculares sobre las arterias de pequeño tamaño y la microcirculación, y los cambios autoinmunes.

El tipo de esclerodermia sistémica conocida como CREST no se caracteriza por un endurecimiento de la piel. La CREST se caracteriza por calcinosis (depósitos de calcio), por lo general en los dedos, enfermedad de Raynaud, pérdida del control muscular del esófago, que puede causar dificultad al tragar; la esclerodactilia, una deformidad cónica de los huesos de los dedos, y telangiectasias, pequeñas manchas rojas en la piel de los dedos, la cara o en el interior de la boca. Por lo general dos de estos síntomas es suficiente para el diagnóstico de CREST. La CREST puede ocurrir sola o en combinación con cualquier otra forma de esclerodermia o con otras enfermedades autoinmunes.

La esclerodermia limitada se caracteriza por piel tirante limitada a los dedos, junto con ya sean las úlceras por picaduras digitales (secundaria a Raynaud) y/o fibrosis pulmonar. La piel de la cara y el cuello también pueden estar involucrados en la esclerodermia limitada.

La esclerodermia difusa se diagnostica cada vez que hay piel tirante proximal. Proximal significa situada más cerca del punto de referencia. La piel tirante proximal puede ser tirante en la piel por encima de las muñecas o por encima de los codos. Normalmente, un paciente con tirantez de la piel sólo entre los codos y las muñecas recibirán un diagnóstico de esclerodermia difusa o limitada sistémica, en dependencia del significado de proximal que use el clínico que diagnostique.

Las terapias actuales para la esclerodermia abarcan la fotoforesis extracorpórea después del 6-metoxipsoraleno, y el autotrasplante de células madre.

Los tratamientos actuales para la esclerodermia incluyen la administración de los siguientes agentes, penicilamina, colchicina, interferón alfa, interferón gamma, el clorambucil, la ciclosporina, 5-fluorouracilo, la ciclofosfamida, minociclina, talidomida, etanercept o metotrexato.

Un paciente puede tratarse con un anticuerpo anti-CD19 previo, concurrente o posterior a cualquiera de las terapias descritas anteriormente que se usan para el tratamiento de la diabetes autoinmune. Además, los anticuerpos anti-CD19 de la presente invención pueden administrarse en combinación con cualquiera de los agentes mencionados anteriormente.

5.25. Determinación de la densidad de CD19 en una muestra o individuo

Aunque no es necesario, se pueden emplear ensayos de densidad de CD19 para adicionalmente caracterizar el diagnóstico del paciente. Los métodos de determinación de la densidad de la unión del anticuerpo a las células se conocen por aquellos con experiencia en la materia (*Ver, por ejemplo*, Sato y otros, J. Immunology 165:6635-6643 (2000); que describen un método de evaluación de la densidad de la superficie celular de antígenos CD específicos). Otros métodos estándares incluyen el análisis de Scatchard. Por ejemplo, el anticuerpo o fragmento se puede aislar, radiomarcarse, y determinar la actividad específica del anticuerpo radiomarcado. El anticuerpo se pone en contacto después con una célula diana que expresa CD19. La radiactividad asociada con la célula se puede medir y, basada en la actividad específica, determinar la cantidad de anticuerpo o fragmento de anticuerpo unido a la célula.

La citometría de flujo activada por fluorescencia se puede emplear también. Generalmente, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo se unen a una célula diana que expresa CD19. Un segundo reactivo que se une al anticuerpo se adiciona después, por ejemplo, un anticuerpo anti-inmunoglobulina marcado con fluorocromo. La tinción con fluorocromo se puede medir después y usar para determinar la densidad de anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a la célula.

Como otro método adecuado, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo se puede marcar directamente con un marcador detectable, tal como un fluoróforo, y unir a una célula diana. La relación del marcador a la proteína se determina y compara con perlas estándar con cantidades conocidas de marcador unido a las mismas. La comparación de la cantidad de marcador unido a la célula con los estándares conocidos se puede usar para calcular la cantidad de anticuerpo unido a la célula.

La presencia y/o densidad de CD19 en una muestra o individuo se puede detectar *in vitro* o *in vivo*. Esto puede ser útil también para monitorear la enfermedad y el efecto del tratamiento y para determinar y ajustar la dosis del anticuerpo que se administra. El método *in vivo* se puede realizar usando técnicas de imagen tales como PET (tomografía por emisión de positrón) o SPECT (tomografía computarizada por emisión de fotón único). Un anticuerpo anti-CD19 también puede marcarse con indio usando un quelante unido covalentemente. El anticuerpo resultante se puede fotografiar usando cámaras gamma estándar de la misma manera como ZEVALIN™ (anticuerpo anti-CD20 marcado con indio) (Biogen Idec, Cambridge, Massachusetts) se usa para la imagen del antígeno CD20.

El método *in vivo* se puede realizar por el contacto de una muestra que se prueba, opcionalmente junto con una muestra control, con un anticuerpo anti-CD19 humano bajo condiciones que permiten la formación de un complejo entre un anticuerpo de la invención y el antígeno CD19 humano. La formación del complejo se detecta después (*por ejemplo*, por medio del uso de la citometría de flujo activada fluorescente o transferencia de tipo Western). Cuando se usa una muestra control junto con la muestra de la prueba, se detecta un complejo en ambas muestras y cualquier diferencia estadísticamente significativa en la formación de los complejos entre las muestras es indicativa de la presencia de CD19 humano en la muestra de la prueba.

La intensidad de fluorescencia media se puede usar como una medida de la densidad de CD19. En modalidades de ese tipo, las células B se eliminan de un paciente y se tiñen con anticuerpos CD19 que se marcaron con un marcador fluorescente y la intensidad de fluorescencia se mide por medio del uso de la citometría de flujo. Las intensidades de fluorescencia se pueden medir y expresar como un promedio de intensidad por célula B. Con el uso de ese tipo de métodos, las intensidades medias de fluorescencia que son representativas de la densidad de CD19 se pueden comparar en un paciente antes y después del tratamiento usando los métodos y las composiciones de la invención, o entre pacientes y los niveles normales de hCD19 en las células B.

En pacientes donde se determinó la densidad de la expresión de CD19 en las células B, la densidad de CD19 puede influir en la determinación y/o ajuste de la dosis y/o régimen de tratamiento usado con un anticuerpo anti-CD19 de composiciones de la invención. Por ejemplo, donde la densidad de CD19 es alta, puede ser posible usar los anticuerpos anti-CD19 que menos eficientemente median la ADCC en humanos. Cuando el paciente tratado con composiciones de la invención tiene una baja densidad de CD19, puede usarse una dosis superior de un anticuerpo anti-CD19 de las composiciones de la invención. Cuando el paciente tratado con composiciones de la invención tiene una densidad baja de CD19, puede usarse una dosis baja de un anticuerpo anti-CD19 de composiciones de la invención. Cuando el paciente tratado con composiciones de la invención tiene una alta densidad de CD19, puede usarse una dosis inferior de un anticuerpo anti-CD19 de composiciones de la invención. La densidad CD19 se puede comparar con la densidad CD20 en un paciente, la densidad CD19 se puede comparar con un promedio de densidad CD19 para humanos o para una población de pacientes en particular, o la densidad CD19 se puede comparar con los niveles CD19 en el paciente antes de la terapia o antes de la aparición de una enfermedad o trastorno de células B. El paciente tratado con composiciones de la invención puede tener un tumor maligno de células B, cuando CD19 está presente en la superficie de las células B.

5.26. Protocolos inmunoterapéuticos

Las composiciones de anticuerpos anti-CD19 usados en el régimen/protocolo terapéutico, referidos en la presente como "inmunoterapia anti-CD19" pueden ser anticuerpos desnudos, inmunocombinados y/o proteínas de fusión. Las composiciones de la invención se pueden usar como una terapia de agente único o en combinación con otros regímenes o agentes terapéuticos. Los anticuerpos anti-CD19 o inmunocombinados se pueden administrar antes de, simultáneamente con, o a continuación de la administración de uno o más agentes terapéuticos. Los agentes terapéuticos que se pueden usar en regímenes terapéuticos de combinación con composiciones de la invención incluyen cualquier sustancia que inhibe o impide la función de las células y/o causa la destrucción de las células. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, isótopos radiactivos, agentes quimioterapéuticos, y toxinas tales como las toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, planta o animal, o fragmentos de éstas.

Los regímenes terapéuticos descritos en la presente, o cualquier régimen de tratamiento deseado se pueden probar para la eficacia por medio del uso de un modelo de animal transgénico que expresa el antígeno CD19 humano en lugar del antígeno CD19 nativo. De este modo, un régimen de tratamiento con anticuerpo anti-CD19 se puede probar en un modelo animal para determinar la eficacia antes de la administración a un humano.

Los anticuerpos anti-CD19, composiciones y métodos se pueden practicar para tratar enfermedades de células B, incluyendo tumores malignos de células B. El término "tumor maligno de células B" incluye cualquier tumor maligno que se deriva de una célula del linaje de células B. Los ejemplos de tumores malignos de células B incluyen, pero no se limitan a: linfoma no Hodgkin subtipo de células B (NHL), incluyendo NHL de grado bajo/folicular, NHL, NHL linfocítico pequeño (SL), NHL de grado intermedio/folicular, NHL difuso de grado intermedio, NHL inmunoblástico de alto grado, NHL linfoblástico de alto grado, NHL de célula pequeñas no hendidas de alto grado; linfoma de células del manto, y NHL enfermedad de gran masa tumoral; linfoma de Burkitt; mieloma múltiple; leucemia pre-B linfoblástica aguda y otros tumores malignos que se derivan de los precursores tempranos de células B; leucemia linfocítica aguda común (ALL); leucemia linfocítica crónica (LLC) incluyendo CLL con inmunoglobulina mutada y LLC con inmunoglobulina no mutada; leucemia de células peludas; leucemia linfoblástica aguda nula; macroglobulinemia de Waldenström, linfoma difuso de células B grandes (DLBCL), incluyendo DLBCL célula similar a B central germinal (GCB), DLBCL de célula similar a B activado (ABC), y DLBCL tipo 3; leucemia pro-linfocítica, enfermedad de cadena ligera; plasmocitoma; mieloma

osteosclerótico; leucemia de células plasmáticas; gammapatía monoclonal de significado incierto (MGUS); mieloma múltiple quiescente (SMM); mieloma múltiple indolente (IMM), linfoma de Hodgkin incluyendo tipo pre-dominante linfocito nodular y clásico; linfoma linfoplasmacítico (LPL); y linfoma de la zona marginal, incluyendo el linfoma de tejido linfoide asociado a la mucosa gástrica (MALT).

La invención se puede emplear para tratar tumores malignos de células B maduras (*es decir*, expresa Ig en la superficie celular), incluyendo pero no limitado a linfoma folicular, linfoma de células del manto, linfoma de Burkitt, mieloma múltiple y linfoma difuso de células B grandes (DLBCL), incluyendo DLBCL similar a célula B del centro germinal (GCB), DLBCL similar a células B activadas (ABC), y DLBCL tipo 3, linfoma de Hodgkin incluyendo tipo pre-dominante linfocito nodular y clásico, linfoma linfoplasmacítico (LPL), linfoma de la zona marginal incluyendo el linfoma de tejido linfoide asociado a la mucosa gástrica (MALT) y leucemia linfocítica crónica (LLC), incluyendo CLL con inmunoglobulina mutada y CLL con inmunoglobulina no mutada.

Además, CD19 se expresa más temprano en el desarrollo de células B que, por ejemplo, CD20, y es por tanto particularmente adecuado para tratar los tumores malignos de células pre-B y células B inmaduras (*es decir*, no expresan Ig en la superficie celular), por ejemplo, en la médula ósea. Los tumores malignos ilustrativos de células pre-B y células B inmaduras incluyen pero no se limitan a la leucemia linfoblástica aguda.

La invención se puede practicar para tratar tumores extraganglionares.

5.27. Inmunoterapia anti-CD19

La "inmunoterapia anti-CD19" incluye la administración de cualquiera de los anticuerpos anti-CD19 de la invención de acuerdo con cualquier régimen terapéutico descrito en la presente. Los anticuerpos anti-CD19 se pueden administrar como anticuerpos desnudos, o inmunoconjugados o proteínas de fusión.

La inmunoterapia anti-CD19 incluye la administración de un anticuerpo anti-CD19 como un agente terapéutico único para el tratamiento de un tumor maligno de célula B. La inmunoterapia anti-CD19 incluye los métodos de tratamiento de una enfermedad en etapa temprana que resulta de un tumor maligno de célula B. La inmunoterapia anti-CD19 incluye los métodos de tratamiento de un tumor maligno de célula B donde un anticuerpo anti-CD19 media la ADCC. La inmunoterapia anti-CD19 incluye los métodos de tratamiento de un tumor maligno de célula B donde un anticuerpo anti-CD19 se administra antes de que el paciente haya recibido cualquier tratamiento para el tumor maligno, ya sea que la terapia es quimioterapia, terapia basada en radio química o terapia quirúrgica.

Un individuo humano que tiene un tumor maligno de célula B se puede tratar por la administración de un anticuerpo humano o humanizado que puede ser capaz de mediar la ADCC humana. En los casos de enfermedad en etapa temprana, o terapias de agente único, cualquier anticuerpo anti-CD19 que puede mediar la ADCC puede usarse en individuos humanos (incluyendo anticuerpos murinos y quiméricos); sin embargo, pueden preferirse los anticuerpos humanos y humanizados.

Los anticuerpos de los isotipos humanos IgG1 o IgG3 son preferidos en algunos casos para la terapia. Sin embargo, los isotipos humanos IgG2 o IgG4 se pueden usar también, tienen proporcionada la función efectora relevante, por ejemplo la ADCC humana. La función efectora de ese tipo se puede evaluar *in vitro* o *in vivo* por la medición de la capacidad del anticuerpo en cuestión para mediar la lisis de la célula diana por las células efectoras.

La dosis de anticuerpo usado debería ser suficiente para depletar las células B circulantes. El progreso de la terapia se puede monitorear en el paciente por el análisis de muestras de sangre. Otros signos de mejoría clínica se pueden usar para monitorear la terapia.

Los métodos de medición de la depleción de las células B que se pueden usar en relación con las composiciones y métodos de la invención se conocen bien en la materia e incluyen, pero no se limitan a las modalidades siguientes. La depleción de las células B circulantes se puede medir con citometría de flujo por medio del uso de un reactivo que no sea un anticuerpo anti-CD19 que se une a las células B para definir la cantidad de células B. Los niveles de células B en la sangre se pueden monitorear por medio del uso de análisis estándares de suero. La depleción de células B se puede medir indirectamente por la definición de la cantidad de un anticuerpo conocido que se produce por las células B. El nivel de ese anticuerpo se monitorea después para determinar la depleción y/o la disminución funcional de las células B. La depleción de las células B puede medirse por tinción inmunológica para identificar las células B. Las células B o tejidos o suero que comprende células B extraídas de un paciente se puede colocar en láminas de portaobjeto del microscopio, marcar y examinar para determinar la presencia o ausencia. Una comparación puede prepararse entre las células B extraídas antes de la terapia y después de la terapia para determinar las diferencias en presencia de células B.

La carga tumoral se puede medir y usar en relación con las composiciones de la invención.

Los métodos para medir la carga tumoral se conocen bien en la materia e incluyen, pero no se limitan a las modalidades siguientes. La escaneo PET se puede usar para medir la actividad metabólica e identificar las áreas de actividad superior que son indicativos de los tumores. El escaneo CT y MRI se pueden usar también para examinar los tejidos blandos para la presencia y tamaño de los tumores. El escaneo óseo se puede usar para medir el volumen y la ubicación del tumor. La carga tumoral se puede medir por el examen del flujo de sangre dentro y fuera de un tumor por medio del uso de la tecnología Doppler (*por ejemplo*, ultrasonido). Los cambios en el flujo de sangre en el tiempo o las desviaciones de flujo normal de sangre en el tejido apropiado de un paciente se pueden usar para calcular una estimación de la carga tumoral. Los métodos de ese tipo para medir la carga tumoral se pueden usar antes de y a continuación de los métodos de tratamiento

En determinadas modalidades de los métodos de la invención las células B se depletan y/o la carga tumoral se reduce mientras que se mantiene la función ADCC.

Cuando un anticuerpo anti-CD19 se administra como una terapia de agente único, se contempla el uso de diferentes regímenes de tratamiento.

De acuerdo con determinados aspectos de la invención, un anticuerpo anti-CD19 usado en las composiciones de la invención, es un anticuerpo desnudo. La dosis de anticuerpo desnudo anti-CD19 usado puede ser al menos aproximadamente 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5, 5, 5.5, 6, 6.5, 7, 7.5, 8, 8.5, 9, 9.5, 10, 10.5, 11, 11.5, 12, 12.5, 13, 13.5, 14, 14.5, 15, 15.5, 16, 16.5, 17, 17.5, 18, 18.5, 19, 19.5, 20, 20.5 mg/kg de peso corporal de un paciente. La dosis de anticuerpo desnudo anti-CD19 usado puede ser al menos aproximadamente de 1 a 10, 5 a 15, 10 a 20, o 15 a 25 mg/kg de peso corporal de un paciente. La dosis de anticuerpo desnudo anti-CD19 usado puede ser al menos aproximadamente 1 a 20, 3 a 15, o 5 T a 10 mg/kg de peso corporal de un paciente. La dosis de anticuerpo desnudo anti-CD19 usado puede ser al menos aproximadamente 5, 6, 7, 8, 9, o 10 mg/kg de peso corporal de un paciente.

La dosis puede comprender aproximadamente 375 mg/m² de anticuerpos anti-CD19 administrado semanalmente durante 4 a 8 semanas consecutivas. La dosis puede ser al menos aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, o 15 mg/kg de peso corporal del paciente administrado semanalmente durante 4 a 8 semanas consecutivas.

Las dosis ejemplares de anticuerpo anti-CD19 descritas anteriormente se pueden administrar como se describió en la Sección 5.21.3. Las dosis anteriores pueden ser inyecciones de dosis única. Las dosis pueden administrarse durante un período de tiempo. Las dosis pueden administrarse múltiples veces durante un período de tiempo. El período de tiempo puede medirse en días, semanas o meses. Las dosis múltiples de un anticuerpo anti-CD19 se pueden administrar a intervalos adecuados para alcanzar un beneficio terapéutico, mientras que equilibra los efectos secundarios tóxicos. Por ejemplo, cuando se usan dosis múltiples, puede preferirse con tiempo de intervalos para permitir la recuperación de conteo de monocitos del paciente antes de la repetición del tratamiento con el anticuerpo. Este régimen de dosificación optimizará la eficiencia del tratamiento, ya que la población de monocitos refleja la función ADCC en el paciente.

Las composiciones de la invención pueden administrarse a un paciente humano, siempre y cuando el paciente sea sensible a la terapia. Las composiciones de la invención pueden administrarse a un paciente humano, siempre y cuando la enfermedad del paciente no progrese. Las composiciones de la invención pueden administrarse a un paciente humano hasta que la enfermedad de un paciente no progrese o no ha progresado durante un período de tiempo, entonces al paciente no se le administra composiciones de la invención a menos que la enfermedad recurra o comience a avanzar de nuevo. Por ejemplo, un paciente se puede tratar con cualquiera de las dosis anteriores durante aproximadamente 4 a 8 semanas, tiempo durante el cual el paciente se monitorea para la progresión de la enfermedad. Si la progresión de la enfermedad se detiene o se invierte, entonces paciente no se le podrá administrar las composiciones de la invención hasta que el paciente recaiga, es *decir*, la enfermedad que está siendo tratada recurra o progrese. En esta recurrencia o progresión, el paciente se puede tratar de nuevo con el mismo régimen de dosificación usado inicialmente o usar otras dosis descritas anteriormente.

Las composiciones de la invención se pueden administrar como una dosis de carga seguida de múltiples dosis inferiores (dosis de mantenimiento) durante un período de tiempo. Las dosis pueden programarse y la cantidad ajustar para mantener efectivo la depleción de las células B. La dosis de carga podría ser de aproximadamente 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, o 18 mg/kg de peso corporal del paciente y la dosis de mantenimiento puede ser al menos aproximadamente de 5 a 10 mg/kg de peso corporal del paciente. La dosis de mantenimiento puede administrarse a intervalos de cada 7, 10, 14 ó 21 días. Las dosis de mantenimiento se pueden continuar indefinidamente, hasta que la toxicidad se presente, hasta que se reduzca el conteo de plaquetas, hasta que no exista progresión de la enfermedad, hasta que el paciente

presente inmunogenicidad, o hasta que la enfermedad progresa a un estado terminal. Las composiciones de la invención pueden administrarse a un paciente humano hasta que la enfermedad progresa a una fase terminal.

Cuando los niveles de monocitos circulantes de un paciente se monitorean como parte de un régimen de tratamiento, las dosis de anticuerpo anti-CD19 administrado pueden espaciarse para permitir la recuperación del conteo de monocitos. Por ejemplo, una composición de la invención puede administrarse a intervalos de cada 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, o 30 días.

Cuando un anticuerpo anti-CD19 se conjuga con o administra junto con una toxina, alguien con experiencia en la materia apreciará que la dosis de anticuerpo anti-CD19 se puede ajustar basado en la dosis de toxina y que la dosis de toxina dependerá del tipo específico de toxina que se use. Típicamente, cuando una toxina se usa, la dosis de anticuerpo anti-CD19 será menor que la dosis usada con un anticuerpo desnudo anti-CD19. La dosis apropiada se puede determinar para una toxina particular por medio del uso de técnicas bien conocidas en la materia. Por ejemplo, un estudio del intervalo de dosis se puede llevar a cabo para determinar la dosis máxima tolerada de anticuerpo anti-CD19 cuando se administra con o conjuga con una toxina.

Cuando un anticuerpo anti-CD19 se conjuga con o administra junto con un agente radioterapéutico, la dosis del anticuerpo anti-CD19 variará dependiendo del radioterapéutico usado. Un proceso de dos etapas puede usarse. En primer lugar, el paciente humano se le administra una composición que comprende un anticuerpo desnudo anti-CD19 y aproximadamente 6, 7, 8, 9 ó 10 días después se administra una pequeña cantidad de radioterapéutico. En segundo lugar, una vez que se determina la tolerancia, distribución y aclaramiento de la terapia de dosis baja, al paciente se le administra una dosis de anticuerpo desnudo anti-CD19 seguido por una cantidad terapéutica de la radioterapéutica que se administra. Los regímenes de tratamiento de ese tipo son similares a aquellos aprobados para el tratamiento del linfoma no Hodgkin usando Zevalin™ (AcM anti-CD20 marcado con indio) (Biogen Idec) o BEXXAR™ (GSK, Coulter Pharmaceutical).

5.28. Combinación con agentes quimioterapéuticos

La inmunoterapia anti-CD19 (que usa anticuerpo desnudo, inmunoconjugados, o proteínas de fusión) se puede usar junto con otras terapias que incluyen pero no se limitan a, quimioterapia, la radioinmunoterapia (RIT), quimioterapia y radiación de haz externo (terapia de modalidad combinada, CMT), o radioinmunoterapia de modalidad combinada (CMRIT) solo o en combinación, etc. En determinadas modalidades, una terapia con el anticuerpo anti-CD19 de la presente invención se puede administrar junto con CHOP (ciclofosfamida-Hidroxidoxorubicin-Oncovin (vincristina)-prednisolona), el régimen de quimioterapia más común para el tratamiento del linfoma no Hodgkin. Como se usa en la presente, el término "administrar junto con" significa que una inmunoterapia anti-CD19 se puede administrar antes, durante, o posterior a la otra terapia empleada.

Una inmunoterapia anti-CD19 puede ser junto con un radionúclido citotóxico o isótopo radioterapéutico. Por ejemplo, un isótopo que emite alfa tales como ^{225}Ac , ^{224}Ac , ^{211}At , ^{212}Bi , ^{213}Bi , ^{212}Pb , ^{224}Ra , o ^{223}Ra . El radionúclido citotóxico puede ser también un isótopo que emite beta tales como ^{186}Re , ^{188}Re , ^{90}Y , ^{131}I , ^{67}Cu , ^{177}Lu , ^{153}Sm , ^{166}Ho , o ^{64}Cu . Además, el radionúclido citotóxico puede emitir electrones Auger y de baja energía, e incluir los isótopos ^{251}I , ^{123}I o ^{77}Br . El isótopo puede ser ^{198}Au , ^{32}P , y similares. La cantidad del radionúclido administrado al individuo puede estar entre aproximadamente 0.001 mCi/kg y aproximadamente 10 mCi/kg. T

La cantidad del radionúclido administrado al individuo puede estar entre aproximadamente 0.1 mCi/kg y aproximadamente 1.0 mCi/kg. La cantidad del radionúclido administrado al individuo puede estar entre aproximadamente 0.005 mCi/kg y 0.1 mCi/kg.

Una inmunoterapia anti-CD19 puede ser junto con una toxina química o agente quimioterapéutico. La toxina química o agente quimioterapéutico puede seleccionarse del grupo consistente de una enedina tal como calicheamicina y esperamicina; duocarmicina, metotrexato, doxorubicina, melfalán, clorambucilo, ARA-C, vindesina, mitomicina C, cis platino, etopósido, bleomicina y 5-fluorouracilo.

Las toxinas químicas adecuadas o agentes quimioterapéuticos que se pueden usar en terapias de combinación con una inmunoterapia anti-CD19 incluyen miembros de la familia de moléculas enedina, tales como calicheamicina y esperamicina. Las toxinas químicas se pueden tomar también del grupo consistente de duocarmicina (*ver, por ejemplo*, la patente de los Estados Unidos núm. 5,703,080 y la patente de los Estados Unidos núm. 4,923,990), metotrexato, doxorubicina, melfalán, clorambucilo, ARA-C, vindesina, mitomicina C, cisplatino, etopósido, bleomicina y 5-fluorouracilo. Los ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluyen también adriamicina, doxorubicina, 5-fluorouracilo, arabinósido de citosina ("Ara-C"), ciclofosfamida, tiotepa, taxotere (docetaxel), busulfán, citoxina taxol, metotrexato, cisplatino, melfalán, vinblastina, bleomicina, etopósido, ifosfamida, mitomicina C, mitoxantrona, vincristina, vinorelbina,

carboplatino, tenipósido, daunomicina, carminomicina, aminopterina, dactinomicina, mitomicinas, esperamicinas (ver, la patente de los Estados Unidos núm. 4,675,187), melfalán y otras mostazas de nitrógeno relacionadas.

Por ejemplo, "CVB" (1,5 g/m² de ciclofosfamida, 200-400 mg/m² de etopósido y 150-200 de carmustina mg/m²) se pueden usar en terapias de combinación de la invención. CVB es un régimen usado para tratar el linfoma no-Hodgkin. Patti y otros., Eur. J. Haematol. 51:18 (1993). Aquellos con experiencia en la materia conocen bien otros regímenes quimioterapéuticos de combinación adecuados. Ver, por ejemplo, Freedman y otros., "Non-Hodgkin's Lymphomas", en Cancer Medicine, volumen 2, 3^{ra} Edición, Holland y otros. (Eds.), páginas 2028-2068 (Lea & Febiger 1993). A modo de ejemplo, los primeros regímenes quimioterapéuticos para tratar el linfoma no Hodgkin de grado intermedio incluyen C-MOPP (ciclofosfamida, vincristina, procarbazona y prednisona) y CHOP (ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina y prednisona). Un régimen quimioterapéutico de segunda generación útil es m-BACOD (metotrexato, bleomicina, doxorubicina, ciclofosfamida, vincristina dexametasona, y leucovorina), mientras que un régimen adecuado de tercera generación es MACOP-B (metotrexato, doxorubicina, ciclofosfamida, vincristina, prednisona, bleomicina y leucovorina). Los fármacos útiles adicionales incluyen fenil butirato y brostatin- 1. En una terapia multimodal, ambos, los fármacos quimioterapéuticos y las citoquinas se coadministran con un anticuerpo, inmunoconjugado o proteína de fusión de acuerdo con la presente invención. Las citoquinas, los fármacos quimioterapéuticos y el anticuerpo, el inmunoconjugado o la proteína de fusión se pueden administrar en cualquier orden, o juntos.

Otras toxinas que pueden usarse en las composiciones de la invención incluyen las lectinas venenosas, las toxinas de plantas tales como ricina, abrina, modicina, botulina y las toxinas de la difteria. Por supuesto, las combinaciones de las diversas toxinas pueden acoplarse también a una molécula de anticuerpo, lo que acomoda de ese modo la citotoxicidad variable. Ilustrativos de las toxinas que se emplean adecuadamente en terapias de combinación de la invención son la ricina, abrina, ribonucleasa, DNasa I, enterotoxina-A Estafilocócica, proteína antiviral de fitolaca, gelonina, toxina diftérica, exotoxina de *Pseudomonas*, y endotoxina de *Pseudomonas*. Ver, por ejemplo, Pastan y otros., Cell 47:641 (1986), y Goldenberg y otros., Cancer Journal for Clinicians 44:43 (1994). Las toxinas enzimáticamente activas y fragmentos de éstas que se pueden usar incluyen la cadena A de difteria, fragmentos activos sin unir de la toxina de difteria, la cadena A de exotoxina (de *Pseudomonas aeruginosa*), la cadena A de ricina, la cadena A de abrina, la cadena A de modicina, la alfa-sarcina, las proteínas Aleurites fordii, las proteínas diantina, las proteínas de *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII, y PAP-S), el inhibidor de momordica charantia, la curcina, el crotino, el inhibidor de sapaonaria officinalis, la gelonina, la mitogelina, la restrictocina, la fenomicina, la enomicina y tricotecenos. Ver, por ejemplo, WO 93/21232 publicado el 28 de octubre de 1993.

Las toxinas y los agentes quimioterapéuticos adecuados se describen en REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 19^{na} Edición. (Mack Publishing Co., 1995), y en GOODMAN AND GILMAN'S THE PHARMACOLOGICAL BASIS OF THERAPEUTICS, 7^{ma} Edición. (MacMillan Publishing Co., 1985). Aquellos con experiencia en la materia conocen bien otras toxinas adecuadas y/o agentes quimioterapéuticos.

Una inmunoterapia anti-CD19 de la presente invención puede ser también junto con una enzima que activa el profármaco lo que convierte un profármaco a un fármaco anti-cáncer activo (por ejemplo, un agente quimioterapéutico peptídico, ver, WO81/01145). Ver, por ejemplo, WO 88/07378 y la patente de los Estados Unidos núm. 4,975,278. El componente enzimático de las combinaciones de ese tipo incluyen cualquier enzima capaz de actuar sobre un profármaco de tal manera a fin de convertirlo en su forma citotóxica más activa. El término "profármaco" como se usa en esta solicitud se refiere a un precursor o forma derivada de una sustancia farmacéuticamente activa que es menos citotóxica para las células tumorales en comparación con el fármaco original y es capaz de ser enzimáticamente activado o convertido en la forma original más activo. Ver, por ejemplo, Wilman, "Prodrugs in Cancer Chemotherapy" Biochemical Society Transactions, 14, páginas 375-382, la 61^{ta} Reunión de Belfast (1986) y Stella y otros., "Prodrugs: A Chemical Approach to Targeted Drug Delivery," Directed Drug Delivery, Borchardt y otros. (ed.), páginas 247-267, Humana Press (1985). Los profármacos que se pueden usar en combinación con los anticuerpos anti-CD19 incluyen, pero no se limitan a, profármacos que contienen fosfato, profármacos que contienen tiofosfato, profármacos que contienen sulfato, profármacos que contienen péptido, profármacos con D-aminoácidos modificados, profármacos glicosilados, profármacos que contienen α -lactámicos, profármacos opcionalmente sustituidos que contienen fenoxiacetamida o profármacos opcionalmente sustituidos que contienen fenilacetamida, 5-fluorocitosina y otros profármacos 5-fluorouridina que se pueden convertir en el fármaco libre citotóxico más activo. Los ejemplos de fármacos citotóxicos que se pueden derivatizar en una forma de profármaco para el uso en esta invención incluyen, pero no se limitan a, aquellos agentes quimioterapéuticos descritos anteriormente.

La administración de las composiciones de la invención puede permitir el aplazamiento de la terapia tóxica y puede ayudar a evitar los efectos secundarios innecesarios y los riesgos de complicaciones asociadas con la quimioterapia y retrasar el desarrollo de la resistencia a la quimioterapia. Las terapias tóxicas y/o resistencia a las terapias tóxicas pueden retrasarse en los pacientes administrados con las composiciones de la invención con retraso de hasta aproximadamente 6 meses, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10 años

5.29. Combinación con anticuerpos terapéuticos

Una inmunoterapia anti-CD19 descrita en la presente puede administrarse en combinación con otros anticuerpos, que incluyen, pero no se limitan a los anticuerpos, AcM anti-CD20, AcM anti-CD52, anticuerpo anti-CD22 y anti-CD20, tales como Rituxan™ (C2B8; Rituximab™; IDEC Pharmaceuticals). Otros ejemplos de anticuerpos terapéuticos que se pueden usar en combinación con los anticuerpos de la invención o usar en composiciones de la invención incluyen, pero no se limitan a, Herceptin™ (Trastuzumab; Genentech), Mylotarg™ (Gemtuzumab ozogamicina Wyeth Pharmaceuticals), Campath™ (Alemtuzumab; Berlex), Zevalin™ (Ipriumomab tiuxetan, Biogen Idec), Bexxar™ (Tositumomab, Glaxo-SmithKline Corixa), Erbitux™ (Cetuximab; Imclone), y Avastin™ (Bevacizumab, Genentech).

Una inmunoterapia anti-CD19 descrita en este documento puede administrarse en combinación con un anticuerpo específico para un receptor Fc seleccionado del grupo consistente de FcγRI, FcγRIIA, FcγRIIB, FcγRIII y/o FcγRIV. Una inmunoterapia anti-CD19 descrita en este documento puede administrarse en combinación con un anticuerpo específico para FcγRIIB. Los anticuerpos anti-FcγRIIB adecuados para este propósito se describieron en la publicación de la solicitud de patente de los Estados Unidos núm. 2004185045, la publicación PCT núms. WO05051999A, WO05018669 y WO04016750.

Un AcM anti-CD19 y un AcM anti-CD20 y/o un AcM anti-CD22 y/o un AcM anti-CD52 se pueden administrar, opcionalmente en la misma composición farmacéutica, en cualquier relación adecuada. Para ilustrar, la relación del anticuerpo anti-CD19 y anti-CD20 puede ser una relación de aproximadamente 1000:1, 500:1, 250:1, 100:1, 90:1, 80:1, 70:1, 60:1, 50:1, 40:1, 30:1, 20:1, 19:1, 18:1, 17:1, 16:1, 15:1, 14:1, 13:1, 12:1, 11:1, 10:1, 9:1, 8:1, 7:1, 6:1, 5:1, 4:1, 3:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6, 1:7, 1:8, 1:9, 1:10, 1:11, 1:12, 1:13, 1:14, 1:15, 1:16, 1:17, 1:18, 1:19, 1:20, 1:30, 1:40, 1:50, 1:60, 1:70, 1:80, 1:90, 1:100, 1:250, 1:500 o 1:1000 o más. Asimismo, la relación de anticuerpo anti-CD19 y anti-CD22 puede ser una relación de aproximadamente 1000:1, 500:1, 250:1, 100:1, 90:1, 80:1, 70:1, 60:1, 50:1, 40:1, 30:1, 20:1, 19:1, 18:1, 17:1, 16:1, 15:1, 14:1, 13:1, 12:1, 11:1, 10:1, 9:1, 8:1, 7:1, 6:1, 5:1, 4:1, 3:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6, 1:7, 1:8, 1:9, 1:10, 1:11, 1:12, 1:13, 1:14, 1:15, 1:16, 1:17, 1:18, 1:19, 1:20, 1:30, 1:40, 1:50, 1:60, 1:70, 1:80, 1:90, 1:100, 1:250, 1:500 o 1:1000 o más. De manera similar, la relación del anticuerpo anti-CD19 y anti-CD-52 pueden ser una relación de aproximadamente 1000:1, 500:1, 250:1, 100:1, 90:1, 80:1, 70:1, 60:1, 50:1, 40:1, 30:1, 20:1, 19:1, 18:1, 17:1, 16:1, 15:1, 14:1, 13:1, 12:1, 11:1, 10:1, 9:1, 8:1, 7:1, 6:1, 5:1, 4:1, 3:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6, 1:7, 1:8, 1:9, 1:10, 1:11, 1:12, 1:13, 1:14, 1:15, 1:16, 1:17, 1:18, 1:19, 1:20, 1:30, 1:40, 1:50, 1:60, 1:70, 1:80, 1:90, 1:100, 1:250, 1:500 o 1:1000 o más.

5.30. Compuestos de combinación que mejoran la función de monocitos o macrófagos

Un compuesto que mejora la función de monocitos o macrófagos (*por ejemplo*, al menos aproximadamente 25%, 50%, 75%, 85% 90%, 95% o más) se puede usar junto con una inmunoterapia anti-CD19. Los compuestos de ese tipo se conocen en la materia e incluyen, sin limitación, citoquinas tales como interleucinas (*por ejemplo*, IL-12) e interferones (*por ejemplo*, interferón alfa o gamma).

El compuesto que mejora la función de monocito o macrófago o la mejoría se puede formular en la misma composición farmacéutica como anticuerpo, inmunoconjugado o fragmento de unión al antígeno. Cuando se administran por separado, el anticuerpo/fragmento y el compuesto se puede administrar simultáneamente (dentro de un período de horas entre sí), se puede administrar durante el mismo curso de la terapia, o se puede administrar secuencialmente (*es decir*, el paciente primero un tratamiento con el anticuerpo/fragmento y después un compuesto que mejora la función de macrófago/monocito o viceversa). En modalidades de ese tipo, el compuesto que mejora la función de monocito o macrófago, se administra al individuo humano antes de, simultáneamente con, o a continuación del tratamiento con otros regímenes terapéuticos y/o composiciones de la invención. El individuo humano puede tener el conteo de leucocito en la sangre, monocito, neutrófilo, linfocito, y/o basófilo que están dentro del intervalo normal para los humanos. Los intervalos normales de leucocitos en la sangre humana (total) es de aproximadamente 3.5 a aproximadamente 10.5 ($10^9/l$). Los intervalos normales de neutrófilos en la sangre humana es de aproximadamente 1.7 a aproximadamente 7.0 ($10^9/l$), monocitos es de aproximadamente 0.3 a aproximadamente 0.9 ($10^9/l$), linfocitos es de aproximadamente 0.9 a aproximadamente 2.9 ($10^9/l$), basófilos es de aproximadamente 0 a aproximadamente 0.3 ($10^9/l$), y eosinófilos es de aproximadamente 0.05 a aproximadamente 0.5 ($10^9/l$). El individuo humano puede tener un conteo de leucocito en la sangre que es menor que el intervalo normal para los humanos, por ejemplo al menos aproximadamente 0.01, 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, o 0.8 ($10^9/l$) leucocitos

Esto puede practicarse con los anticuerpos, inmunoconjugados o fragmentos de anticuerpos de la invención o con otros anticuerpos conocidos en la materia y es particularmente adecuado para los individuos que son resistentes a las terapias con anticuerpo anti-CD22, anti-CD52 y/o anti-CD20 (por ejemplo, terapia con anticuerpos existentes, tales como C2B8), individuos que se tratan actualmente o trataron previamente con quimioterapia, individuos que han tenido una recaída

en el trastorno de células B, individuos que están inmunocomprometidos, o individuos que de lo contrario tienen un deterioro en la función de macrófago o monocito. La prevalencia de pacientes que son resistentes a la terapia o tienen una recaída en un trastorno de las células B puede atribuirse, al menos en parte, a un deterioro en la función de macrófago o monocito. Los métodos de mejora de ADCC y/o la función de macrófago y/o monocito pueden usarse junto con los métodos de administración de anticuerpos anti-CD19 y fragmentos de unión al antígeno.

5.31. Combinación con agentes inmunorreguladores

Una inmunoterapia anti-CD19 puede ser también junto con un agente inmunorregulador. En este enfoque, se pueden usar un anticuerpo quimérico, humano o humanizado anti-CD19. El término "agente inmunorregulador" como se usa en la presente para la terapia de combinación, se refiere a las sustancias que actúan para suprimir, enmascarar, o mejorar el sistema inmune del huésped. Esto puede incluir sustancias que suprimen la producción de citoquinas, regulan hacia abajo o suprimen la propia expresión de antígeno, o enmascaran los antígenos MHC. Los ejemplos de agentes de ese tipo incluyen pirimidinas sustituidas 2-amino-6-aryl-5 (ver, la patente de los Estados Unidos núm., 4,665,077.), azatioprina (o ciclofosfamida, si existe una reacción adversa a la azatioprina); bromocriptina; glutaraldehído (que enmascara los antígenos MHC, como se describe en la patente de los Estados Unidos núm. 4,120,649); anticuerpos antiidiotípicos para los antígenos MHC y fragmentos MHC; ciclosporina A; esteroides tales como los glucocorticoides, *por ejemplo*, prednisona, metilprednisolona y dexametasona; antagonistas de los receptores de citoquinas o citoquinas incluyendo anticuerpos anti-interferón- γ , - β , o - α ; anticuerpos anti-factor de la necrosis tumoral α ; , anticuerpos anti- factor de la necrosis tumoral β ; anticuerpos anti-interleucina-2 y anticuerpos anti-receptor de IL-2; anticuerpos anti-L3T4; globulina heteróloga anti-linfocitos; anticuerpos T Pan; por ejemplo anticuerpos anti-CD3 o anti-CD4/CD4a; péptido soluble que contiene un dominio de unión LFA-3 (WO 90/08187 publicado el 26 de julio de 1990); estreptoquinasa; TGF- β ; estreptodornasa; ARN o ADN del huésped; FK506; RS-61443; desoxiespergualina; rapamicina; receptor de células T (la patente de los Estados Unidos núm. 5,114,721.); fragmentos del receptor de células T (Offner y otros, Science 251:430-432 (1991); WO 90/11294; y WO 91/01133), y anticuerpos del receptor de células T (EP 340,109) tal como T10B9. Los ejemplos de citoquinas incluyen, pero no se limitan a linfocinas, monoquinas y hormonas polipeptídicas tradicionales. Entre las citoquinas incluidas están la hormona de crecimiento tales como hormona del crecimiento humano, hormona del crecimiento humano N-metil, y hormona del crecimiento bovina; hormona paratiroide; tiroxina; insulina; proinsulina; relaxina; prorelaxina; hormonas glicoproteicas tales como la hormona folículo-estimulante (FSH), hormona estimulante del tiroides (TSH), y hormona luteinizante (LH); factor de crecimiento hepático, factor de crecimiento de fibroblasto, prolactina, lactógeno placentario, factor de necrosis tumoral - α , sustancia inhibidora mülleriana; péptido asociado a la gonadotropina de ratón; inhibina; activina; factor de crecimiento del endotelio vascular; integrina; trombopoyetina (TPO), factores de crecimiento nervioso tales como NGF α ; factor de crecimiento plaquetas; factores de crecimiento transformantes (TGF, tales como un TGF- α y TGF β ; factor de crecimiento I y II similar a la insulina; eritropoyetina (EPO); factores osteoinductivos; interferones; factores estimulantes de colonias (CSF) tales como macrófago-CSF (M-CSF); granulocito-macrófago-CgP (GM-CSF); y granulocito-CSF (G-CSF); interleucinas (IL) tales como IL-1, IL-1a, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-11, IL-12, IL-15; un factor de necrosis tumoral, tales como TNF- α o TNF- β , y otros factores polipeptídicos, incluyendo LIF y el ligando kit (KL). Como se usa en la presente, el término citoquina incluye las proteínas de fuentes naturales o de cultivo de célula recombinante y equivalentes biológicamente activos de las citoquinas de secuencia nativa. Los métodos pueden incluir además administrar al individuo uno o más agentes inmunomoduladores, por ejemplo una citoquina. Las citoquinas adecuadas pueden seleccionarse del grupo consistente de interleucina-1 (IL-1), IL-2, IL-3, IL-12, IL-15, IL-18, G-CSF, GM-CSF, trombopoyetina, e γ interferón.

Estos agentes inmunorreguladores se administran al mismo tiempo o en momentos distintos de los anticuerpos anti-CD19. El agente inmunorregulador preferido dependerá de muchos factores, incluyendo el tipo de trastorno que se trata, así como la historia del paciente, pero el agente puede seleccionarse frecuentemente de ciclosporina A, un glucocorticoide (por ejemplo prednisona o metilprednisolona), anticuerpo monoclonal OKT-3, azatioprina, bromocriptina, globulina heterólogas anti-linfocito, o una mezcla de estos.

5.32. Combinación con otros agentes terapéuticos

Los agentes que actúan sobre la neovasculatura del tumor se pueden usar también junto con la inmunoterapia anti-CD19 e incluir agentes de unión de tubulina tales como A4 combrestatina (Griggs y otros., Lancet Oncol. 2:82, (2001)) y la angiostatina y endostatina (revisado en Rosen, Oncologist 5:20 (2000), incorporado como referencia en la presente). Los inmunomoduladores adecuados para el uso en combinación con anticuerpos anti-CD19 incluyen, pero no se limitan a, α -interferón, γ -interferón, y factor de necrosis tumoral alfa (TNF α). Los agentes terapéuticos usados en terapias de combinación con composiciones de la invención pueden ser péptidos.

Una inmunoterapia anti-CD19 puede ser junto con una o más moléculas calicheamicina. La familia de antibióticos calicheamicina es capaz de producir rupturas de ADN de doble cadena en concentraciones sub-picomolares. Los

análogos estructurales de calicheamicina que pueden usarse incluyen, pero no se limitan a, γ^1 , γ^2 , γ^3 , N-acetil- γ^1 , PSAG y Hinman 011 y otros, Cancer Research 53:3336-3342 (1993) y Lode y otros, Cancer Research 58: 2925-2928 (1998)).

- 5 Una proteína de fusión que comprende un anticuerpo anti-CD19 y un agente citotóxico puede prepararse también, *por ejemplo*, por técnicas recombinantes o de síntesis de péptidos.

Un anticuerpo anti-CD19 puede conjugarse a un "receptor" (tal como estreptavidina) para su utilización en pre enfocar el tumor donde el conjugado receptor-antagonista se administra al paciente, seguido por la eliminación del conjugado no unido de la circulación por medio del uso de un agente de limpieza y la administración después de un "ligando" (*por ejemplo*, avidina) que se conjuga con un agente terapéutico (*por ejemplo*, un radionucleótido).

Un régimen de tratamiento puede incluir compuestos que atenúan los efectos citotóxicos de una composición del anticuerpo anti-CD19. Los compuestos de ese tipo incluyen analgésicos (*por ejemplo*, acetaminofén), bifosfonatos, antihistamínicos (*por ejemplo*, maleato de clorfeniramina) y esteroides (*por ejemplo*, dexametasona, retinoides, deltoides, betametasona, cortisol, cortisona, prednisona, dehidrotestosterona, glucocorticoides, mineralocorticoides, estrógenos, testosterona, progestinas).

El agente terapéutico usado en combinación con una inmunoterapia anti-CD19 puede ser una molécula pequeña (*es decir*, compuestos inorgánicos u orgánicos que tienen un peso molecular de menos de aproximadamente 2500 daltons). Por ejemplo, las genotecas de moléculas pequeñas pueden ser comercialmente obtenidas a partir de Specs y BioSpecs BV (Rijswijk, Países Bajos), ChemBridge Corporation (San Diego, California), Comgenex Estados Unidos, Inc. (Princeton, Nueva Jersey), y Maybridge Chemicals Ltd. (Cornwall PL34 OHW, Reino Unido).

Una inmunoterapia anti-CD19 se puede administrar en combinación con un agente anti-bacteriano. Los ejemplos no limitativos de agentes antibacterianos incluyen proteínas, polipéptidos, péptidos, proteínas de fusión, anticuerpos, moléculas de ácidos nucleicos, moléculas orgánicas, moléculas inorgánicas, y moléculas pequeñas que inhiben y/o reducen una infección bacteriana, inhiben y/o reducen la replicación de la bacteria, o inhiben y/o reducen la propagación de las bacterias a otras células o individuos. Los ejemplos específicos de agentes antibacterianos incluyen, pero no se limitan a, antibióticos tales como penicilina, cefalosporina, imipenem, axtreonam, vancomicina, cicloserina, bacitracina, cloranfenicol, eritromicina, clindamicina, tetraciclina, estreptomycin, tobramicina, gentamicina, amikacina, kanamicina, neomicina, espectinomycin, trimetoprim, norfloxacin, rifampicina, polimixina, anfotericina B, nistatina, ketoconazol, isoniazida, metronidazol, y pentamidina.

Una inmunoterapia anti-CD19 se puede administrar en combinación con un agente anti-hongo. Los ejemplos específicos de agentes anti-hongos incluyen, pero no se limitan a, fármacos azoles (*por ejemplo*, miconazol, ketoconazol (NIZORAL®), acetato de caspofungina (CANCIDAS®), imidazol, triazoles (*por ejemplo*, fluconazol (DIFLUCAN®) e itraconazol SPORANOX®)), polieno (*por ejemplo*, nistatina, anfotericina B (FUNGIZONE®), complejo lipídico de anfotericina B ("ABLC") (ABELCET®), anfotericina B de dispersión coloidal ("ABCD") (AMPHOTEC®), anfotericina liposomal B (AMBISONE®)), yoduro de potasio (KI), pirimidina (*por ejemplo*, flucitosina (ANCOBON®) y voriconazol (VFEND®)). La administración de agentes anti-bacterianos y anti-hongos pueden atenuar los efectos o aumento de las enfermedades infecciosas que pueden ocurrir en los métodos de la invención donde las células B de un paciente se depletan significativamente.

Una inmunoterapia anti-CD19 se puede administrar en combinación con uno o más de los agentes descritos anteriormente para atenuar los efectos secundarios tóxicos que pueden acompañar a la administración de las composiciones de la invención. Una inmunoterapia anti-CD19 se puede administrar en combinación con uno o más agentes que se conocen bien en la materia para el uso en la atenuación de los efectos secundarios de la administración de anticuerpo, quimioterapia, toxinas, o fármacos.

Cuando una inmunoterapia anti-CD19 se administra para tratar el mieloma múltiple, las composiciones de la invención pueden administrarse en combinación con o en los regímenes de tratamiento con quimioterapia de altas dosis (melfalán, melfalán/prednisona (MP), vincristina/doxorubicina/ dexametasona (VAD), doxorubicina liposomal/vincristina, dexametasona (DVD), ciclofosfamida, etopósido/dexametasona/citarabina, cisplatino (EDAP)), trasplantes de células madre (*por ejemplo*, trasplante autólogo de células madre o el trasplante alogénico de células madre, y/o trasplante de células madre mini-alógeno (no mieloablativo)), radioterapia, esteroides (*por ejemplo*, corticosteroides, dexametasona, talidomida/dexametasona, prednisona, melfalán/prednisona), terapia de apoyo (*por ejemplo*, bifosfonatos, factores de crecimiento, antibióticos, inmunoglobulina intravenosa, radioterapia de dosis baja, y/o intervenciones ortopédicas), Thalomid™ (talidomida, Celgene), y/o Velcade™ (bortezomib, Milenio).

60

Cuando una inmunoterapia anti-CD19 se administra en combinación con otro anticuerpo o anticuerpos y/o agente, el anticuerpo adicional o anticuerpos y/o agentes se pueden administrar en cualquier secuencia relativa a la administración del anticuerpo de esta invención. Por ejemplo, el anticuerpo adicional o anticuerpos se pueden administrar al individuo humano antes, simultáneamente con, y/o posterior a la administración de un anticuerpo anti-CD19 o inmunoconjugado. El anticuerpo adicional o anticuerpos se pueden presentar en la misma composición farmacéutica como un anticuerpo de la invención, y/o presentar en una composición farmacéutica diferente. La dosis y el modo de administración de un anticuerpo de esta invención y la dosis del anticuerpo adicional o anticuerpos pueden ser iguales o diferentes, de acuerdo con cualquiera de las enseñanzas de las cantidades de dosis y modos de administración según se proporciona en esta solicitud y según se conoce bien en la materia.

5.33. Uso de anticuerpos anti-CD19 en el diagnóstico de tumores malignos de células B

La presente invención incluye también los anticuerpos anti-CD19 de la invención, y composiciones de estos, que se unen inmunespecíficamente al antígeno CD19 humano, cuyos anticuerpos anti-CD19 se conjugan con un agente de diagnóstico o detectable. Los anticuerpos anti-CD19 de ese tipo pueden ser útiles para el monitoreo o pronóstico del desarrollo o progresión de un tumor maligno de células B como parte de un procedimiento de pruebas clínicas, tales como determinar la eficacia de una terapia particular. El diagnóstico y detección de ese tipo se pueden lograr por el acoplamiento de un anticuerpo anti-CD19 que se une inmunespecíficamente al antígeno CD19 humano con una sustancia detectable, que incluyen pero no se limitan a, diversas enzimas, tales como, pero no se limitan a, peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, beta-galactosidasa, o acetilcolinesterasa; grupos prostéticos, tales como, pero no se limitan a, estreptavidina biotina y avidina/biotina; materiales fluorescentes, tales como, pero no se limitan a, umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, fluoresceína diclorotriazinilamina, cloruro de dansilo o ficoeritrina; materiales luminiscentes, tales como pero no se limitan a, luminol; materiales bioluminiscentes, tales como pero no se limitan a, luciferasa, luciferina, y aequorina, materiales radiactivos, tales como, pero no se limitan al yodo (^{131}I , ^{125}I , ^{123}I , ^{121}I), carbono (^{14}C), azufre (^{35}S), el tritio (^3H), indio (^{115}In , ^{113}In , ^{112}In , ^{111}In), y tecnecio (^{99}Tc), talio (^{201}Tl), galio (^{68}Ga , ^{67}Ga), paladio (^{103}Pd), molibdeno (^{99}Mo), xenón (^{133}Xe), flúor (^{18}F), ^{153}Sm , ^{177}Lu , ^{159}Gd , ^{149}Pm , ^{140}La , ^{175}Yb , ^{166}Ho , ^{90}Y , ^{47}Sc , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{142}Pr , ^{105}Rh , ^{97}Ru , ^{68}Ge , ^{57}Co , ^{65}Zn , ^{85}Sr , ^{32}P , ^{153}Gd , ^{169}Yb , ^{51}Cr , ^{54}Mn , ^{75}Se , ^{113}Sn y ^{117}Te ; metales emisores de positrones por medio del uso de diversas tomografías por emisión de positrones, iones metálicos paramagnéticos no radioactivos, y moléculas que se radiomarcen o conjugan con radioisótopos específicos. Cualquier marcador detectable que se puede medir fácilmente se puede conjugar a un anticuerpo anti-CD19 y usar en el diagnóstico de enfermedades de células B. La sustancia detectable puede acoplarse o conjugarse ya sea directamente con un anticuerpo o indirectamente, a través de un intermedio (tal como, por ejemplo, un enlazador conocido en la materia), por medio del uso de procedimientos conocidos en la materia. Ver, por ejemplo, la patente de los Estados Unidos núm. 4,741,900 para los iones metálicos que se pueden conjugar con anticuerpos para el uso como un diagnóstico de acuerdo con la presente invención.

5.34. Uso de anticuerpos anti-CD19 en el monitoreo de la reconstitución inmune

Los anticuerpos anti-CD19 de la invención, y composiciones de estos, que se unen inmunespecíficamente al antígeno CD19 humano, cuyos anticuerpos anti-CD19 se conjugan con un agente de diagnóstico o detectable pueden ser útil para el monitoreo de la reconstitución del sistema inmune a continuación de la terapia depresora o trasplante de médula ósea. El monitoreo de ese tipo se puede lograr por el acoplamiento de un anticuerpo anti-CD19 que se une inmunespecíficamente al antígeno CD19 humano con una sustancia detectable, que incluye pero no se limita a, diversas enzimas, tales como, pero no se limitan a, peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, beta-galactosidasa, o acetilcolinesterasa; grupos prostéticos, tales como, pero no se limitan a, estreptavidina biotina y avidina/biotina; materiales fluorescentes, tales como, pero no se limitan a, umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, fluoresceína diclorotriazinilamina, cloruro de dansilo o ficoeritrina; materiales luminiscentes, tales como, pero no se limitan a, luminol; materiales bioluminiscentes, tales como, pero no se limitan a, luciferasa, luciferina, y aequorina; materiales radiactivos, tales como, pero no se limitan a, yodo (^{131}I , ^{125}I , ^{123}I , ^{121}I), carbono (^{14}C), azufre (^{35}S), tritio (^3H), indio (^{115}In , ^{113}In , ^{112}In , ^{111}In), y tecnecio (^{99}Tc), talio (^{201}Tl), galio (^{68}Ga , ^{67}Ga), paladio (^{103}Pd), molibdeno (^{99}Mo), xenón (^{133}Xe), flúor (^{18}F), ^{113}Sm , ^{177}Lu , ^{159}Gd , ^{149}Pm , ^{140}La , ^{175}Yb , ^{166}Ho , ^{90}Y , ^{47}Sc , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{142}Pr , ^{105}Rh , ^{97}Ru , ^{68}Ge , ^{57}Co , ^{65}Zn , ^{85}Sr , ^{32}P , ^{153}Gd , ^{169}Yb , ^{51}Cr , ^{54}Mn , ^{75}Se , ^{113}Sn y ^{117}Te ; metales emisores de positrones por medio del uso de diversas tomografías por emisión de positrones, iones metálicos paramagnéticos no radioactivos, y moléculas que se radiomarcen o conjugan con radioisótopos específicos. Cualquier marcador detectable que se puede medir se puede conjugar con un anticuerpo anti-CD19 y usar en el diagnóstico de una enfermedad autoinmune o trastorno. La sustancia detectable puede acoplarse o conjugarse ya sea directamente a un anticuerpo o indirectamente, a través de un intermedio (tal como, por ejemplo, un enlazador conocido en la materia), por medio del uso de procedimientos conocidos en la materia. Ver, por ejemplo, la patente de los Estados Unidos núm. 4,741,900 para ion metálico que se puede conjugar a anticuerpos para el uso como un diagnóstico de acuerdo con la presente invención.

5.35. Uso de los anticuerpos anti-CD19 en el diagnóstico de enfermedades o trastornos autoinmunes

Los anticuerpos Anti-CD19 de la invención, y composiciones de estos, que se unen inmunoespecíficamente al antígeno CD19 humano, cuyos anticuerpos anti-CD19 se conjugan con un agente de diagnóstico o detectable pueden ser útiles para monitorear o pronosticar el desarrollo o progresión de una enfermedad autoinmune o trastorno como parte de un procedimiento de pruebas clínicas, tales como determinar la eficacia de una terapia en particular. El diagnóstico y detección de ese tipo se pueden lograr por el acoplamiento de un anticuerpo anti-CD19 que se une inmunoespecíficamente al antígeno CD19 humano con una sustancia detectable, incluyendo pero no se limita a, diversas enzimas, tales como, pero no se limitan a, peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, beta-galactosidasa, o acetilcolinesterasa; grupos prostéticos, tales como, pero no se limitan a, estreptavidina biotina y avidina/biotina; materiales fluorescentes, tales como, pero no se limitan a, umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, diclorotriazinilamina fluoresceína, cloruro de dansilo o ficoeritrina; materiales luminiscentes, tales como pero no se limitan a, luminol; materiales bioluminiscentes, tales como pero no se limitan a, luciferasa, luciferina, y aequorina, materiales radiactivos, tales como, pero no se limitan al yodo (^{131}I , ^{125}I , ^{123}I , ^{121}I), carbono (^{14}C), azufre (^{35}S), el tritio (^3H), indio (^{115}In , ^{113}In , ^{112}In , ^{111}In), y tecnecio (^{99}Tc), talio (^{201}Tl), galio (^{68}Ga , ^{67}Ga), paladio (^{103}Pd), molibdeno (^{99}Mo), xenón (^{133}Xe), flúor (^{18}F), ^{153}Sm , ^{177}Lu , ^{159}Gd , ^{149}Pm , ^{140}La , ^{175}Yb , ^{166}Ho , ^{90}Y , ^{47}Sc , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{142}Pr , ^{105}Rh , ^{97}Ru , ^{68}Ge , ^{57}Co , ^{65}Zn , ^{85}Sr , ^{32}P , ^{153}Gd , ^{169}Yb , ^{51}Cr , ^{54}Mn , ^{75}Se , ^{113}Sn y ^{117}In ; metales emisores de positrones por medio del uso de diversas tomografías por emisión de positrones, iones metálicos paramagnéticos no radioactivos, y las moléculas que se radiomarcen o conjugan con radioisótopos específicos. Cualquier marcador detectable que se puede medir fácilmente se puede conjugar con un anticuerpo anti-CD19 y usar en el diagnóstico de enfermedad autoinmune o trastorno. La sustancia detectable puede acoplarse o conjugarse ya sea directamente a un anticuerpo o indirectamente, a través de un intermedio (tal como, por ejemplo, un enlazador conocido en la materia), por medio del uso de procedimientos conocidos en la materia. Ver, por ejemplo, la patente de los Estados Unidos núm. 4,741,900 para los iones metálicos que se pueden conjugar a anticuerpos para el uso como un diagnóstico de acuerdo con la presente invención.

7. Ejemplos

7.1. Construcción, expresión y características de unión de los anticuerpos humanizados anti-CD19

Las secciones siguientes describen el diseño y la construcción de una variante quimérica del anticuerpo parental HB12B (chHB12B) en la que se sustituyeron las regiones constantes de la cadena pesada y la cadena ligera de ratón con las regiones IgH γ 1 humana y IgL κ humana, respectivamente. Estas secciones describen también estrategias para la generación de variantes humanizadas de las regiones variables de la cadena pesada y ligera del HB12B.

También se describe la actividad de unión a CD19 de los anticuerpos producidos a partir de diversas combinaciones de regiones variables de cadena pesada y ligera (quimérico o humanizado). Por ejemplo, se describen las formas humanizadas del HB12B que presentan un perfil de unión a CD19 comparable con aquella del chHB12B.

Las secciones siguientes describen también varias mutaciones en las regiones de marco humanas que, cuando se introducen en determinados anticuerpos anti-CD19 humanizados, resultan en la unión a CD19 humano comparable con aquella del anticuerpo de referencia, chHB12B que comprende la VH HB12B y la VK HB12B. En la VK estos residuos comprenden, por ejemplo, los residuos de Vernier F36 y H49 y el residuo intercadena F87.

7.1.1. Ensamblaje del gen y clonación para la expresión

Las construcciones se generaron por un método de ensamblaje basado en la PCR descrito por primera vez por Stemmer (Stemmer, W. P. y otros. 1995 Gene, 164:49-53). Este método consiste de cuatro etapas: síntesis de oligonucleótidos, ensamblaje del gen; amplificación del gen y clonación. Se sintetizaron ocho cebadores específicos de genes para cada segmento VH y VK. Los conjuntos de cebadores representativos para el ensamblaje de la región VH HB12B-(3-72/JH4) y la VK HB12B-(A10-Jk4) se muestran en la Tabla 3; los conjuntos de cebadores para las variantes de las regiones VH y VK que comprenden sustituciones de aminoácidos específicos se generaron por la modificación de la secuencia de ácido nucleico que codifica el residuo de aminoácido dado. Los cebadores se diseñaron para superponerse por 15-20 nucleótidos y se ligaron en una región variable completa durante el ciclo térmico. En el caso de VH, un cebador adicional específico al vector (Universal VH FW en la Tabla 3.) se incluyó en el proceso de ensamblaje de genes mediado por la PCR. Los cebadores 5' y 3' externos para la región VH incorporaron un sitio de reconocimiento único para la endonucleasa de restricción XbaI y ApaI respectivamente, para ayudar con las etapas de clonación posteriores. Los cebadores externos 5' y 3' para VK incorporaron un sitio de reconocimiento único para la endonucleasa de restricción XmaI y BsiWI, respectivamente, para ayudar con las etapas de clonación posteriores. Los productos de la PCR del tamaño correcto se digirieron por restricción y se ligaron en el marco dentro de un vector de expresión donde las regiones VH se digirieron con XbaI y ApaI, y las regiones VK se digirieron con XmaI y BsiWI según las instrucciones del fabricante. El vector usado para el ensamblaje de la cadena pesada comprende elementos de control de la transcripción

eucariótica unidos operativamente a un polinucleótido que codifica el líder de la VH, MGDNDIHFAFLSTGVHS (sec. con núm. de ident.: 83) y una región constante de IgH1 γ humana donde dichos elementos de control de la transcripción comprenden un promotor temprano inmediato de CMV y una señal de adición poli A de SV40. El uso de cebadores diseñados apropiadamente para el ensamblaje de VH aseguró que las secuencias de polinucleótidos que codifican el líder VH, la región VH y la región constante de IgH γ 1 se unieran en el marco dentro del vector de expresión final de la cadena pesada. El vector para el ensamblaje de la cadena ligera comprende elementos de control de la transcripción eucariótica unidos operativamente a un polinucleótido que codifica el líder L12 de VK1 humano (la secuencia de aminoácidos MDMRVPAQLLGLLLLWLPGAKC (sec. con núm. de ident.: 84), Bentley, DL & Rabbitts, TH, Nature 288,730-733 (1980)) y una región constante de IgL κ humana donde dichos elementos de control de la transcripción comprenden un promotor temprano inmediato de CMV y una señal de adición poli A de SV40. El uso de cebadores diseñados apropiadamente para el ensamblaje de VK aseguró que las secuencias de polinucleótidos que codificaban el líder L12 de VK1, la región VK y la región constante de IgL κ se unieran en el marco dentro del vector de expresión final de la cadena ligera. El producto de la ligación se usó para transformar células *E. coli* DH10B competentes según los protocolos del fabricante. Las colonias que contenían el plásmido y un inserto de tamaño correcto se pudieron identificar por medio del uso de diversos métodos conocidos en la materia (*por ejemplo*, la digestión por restricción de la preparación del vector de ADN, la amplificación por PCR de las secuencias del vector). Los clones del plásmido con inserto de tamaño correcto se secuenciaron por medio del uso de la reacción de secuenciación dideoxi (por ejemplo BigDye® Terminator v3.0 Cycle Sequencing Ready Reaction Kit, ABI). El ADN del plásmido se preparó a partir de los clones seleccionados por medio del uso del kit Mini y Maxi Plasmid QIAGEN según los protocolos del fabricante.

Los pares de las preparaciones de vectores de expresión del plásmido de ADN que codifican una cadena pesada de inmunoglobulina humanizada o quimérica y una cadena ligera de inmunoglobulina humanizada o quimérica se usaron para cotransfectar células HEK293. Estas células HEK293 cotransfectadas se cultivaron durante tres días para producir medio condicionado que contenía el anticuerpo adecuado para la determinación de las concentraciones totales de IgG y la actividad de unión a CD19.

Las concentraciones totales de Ig en el sobrenadante de las células HEK293 se cuantificaron por medio del uso de un ensayo ELISA de captura. Las moléculas IgG se capturaron en una placa de 96 pocillos a través del anticuerpo específico anti-IgG H+L humana en carnero inmovilizado, y se detectaron con un anticuerpo anti-cadena ligera kappa humana conjugado con HRP. El ensayo se calibró por medio del uso de un AcM IgG1 de referencia de especificidad irrelevante.

Tabla 3. Conjuntos de cebadores representativos para el ensamblaje de la región VH HB12B-(3-72/JH4) y la región Vk HB12B-(A10-Jk4). Los nucleótidos para los genes específicos se imprimen en mayúscula. Los nucleótidos para los vectores específicos se imprimen en minúscula. Los sitios de reconocimiento para las endonucleasas de restricción usadas para el clonaje de los fragmentos VH y Vk se subrayan.

5

Universal VH FW	tatatatat <u>ctaga</u> catatatatgggtgacaatgacatccactttgccttctctcc (sec.con núm. de ident:85)
HB12B-(3-72/JH4) FW I	tccactttgccttctctccacaggtgtccactccGAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGG GAGGCTTGGTCCAGCCTGGAGGGTCCCTG(sec.con núm. de ident:86)
HB12B-(3-72/JH4) RE2	GTTTCATCCAAGAGCTACTGAAGGTGAATCCAGAGGCTGCACAGGA GAGTCTCAGGGACCCTCCAGGC (sec.con núm. de ident:87)
HB12B-(3-72/JH4) FW3	AGCTCTTGGATGAACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTG GAGTGGGTTGGCCGATTTATCCTGGAG (sec.con núm. de ident:88)
HB12B-(3-72/JH4) RE4	GCCCTTGAACCTCCCATTTAGTTAGTATCTCCATCTCCAGGATAA ATCCGGCCAACCCACTCCA (sec.con núm. de ident:89)
HB12B-(3-72/JH4) FW5	GGAAGTTCAAGGGCAGATTCACCATCTCAAGAGATGATTCAAAGA ACTCACTGTATCTGCAAATGAACAG(sec.con núm. de ident:90)
HB12B-(3-72/JH4) RE6	AATCCTGATCTAGCACAGTAATACACGGCCGTGTCCTCGGTTTTCA GGCTGTTCAATTTGCAGATACAG(sec.con núm. de ident:91)
HB12B-(3-72/JH4) FW7	GTGTATTACTGTGCTAGATCAGGATTTATTACTACGGTTTTAGACT TTGACTACTGGG (sec.con núm. de ident:92)
HB12B-(3-72/JH4) RE8	tatatata <u>gggccc</u> ttggtggaggcTGAGGAGACGGTGACCAGGGTTCCTTGGCC CCAGTAGTCAAAGTCTAAA (sec.con núm. de ident:93)
HB12B-(A10-Jk4) FW 1	tatatata <u>cccg</u> gggccaatgtGAAATTGTGCTGACTCAGTCTCCAGACTTTC AGTCTGTG (sec.con núm. de ident:94)
HB12B-(A10-Jk4) RE2	CAACACTTTCGCTGGCTCTGCAGGTGATGGTGACTTTCTCCTTTGG AGTCACAGACTGAAAGTCTGG (sec.con núm. de ident:95)
HB12B-(A10-Jk4) FW3	GCCAGCGAAAGTGTTGATACTTTTGGCATTAGTTTTATGAACTGGT ACCAGCAGAAACCAGATCAGTC (sec.con núm. de ident:96)
HB12B-(A10-Jk4)RE4	CGAGGGGACCCCGGATCCTTGATTGGATGCAGCCTTGATGAGGAG CTTTGGAGACTGATCTGGTTTC (sec.con núm. de ident:97)

(continuación)

HB12B-(A10-Jk4)FW5	GATCCGGGGTCCCCTCGAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAG ATTTCACCCTCACCATCAATAGC (sec.con núm. de ident:98)
HB12B-(A10-Jk4)RE6	GAACCTCCTTACTTTGCTGACAGTAATACGTTGCAGCATCTTCAGC TTCCAGGCTATTGATGGTGAGG (sec.con núm. de ident:99)
HB12B-(A10-Jk4)FW7	GCAAAGTAAGGAGGTTCCATTACGTTTCGGCGGAGGGACCAAGGT GGAGATCAAA (sec.con núm. de ident:100)
HB12B-(A10-Jk4)RE8	tatatatacgtacg TTTGATCTCCACCTTGGTCCCTCCGCCGA (sec.con núm. de ident:101)

7.1.2. Ensayo de unión a CD19 en 300B4

La actividad de unión a CD19 se evaluó por medio del uso de un ensayo ELISA de CD19 humano recombinante basado en células donde dicho ensayo se realizó con el uso de concentraciones equivalentes de cada anticuerpo humanizado o quimérico, lo que facilitó de ese modo las comparaciones directas entre versiones alternativas humanizadas del anticuerpo HB12B y chHB12B.

La capacidad del chHB12B y sus variantes humanizadas para unir hCD19 se evaluó en un ensayo de unión a CD19 basado en células que utilizan las células 300B4 que expresan CD19 humano recombinante en la superficie celular como un agente de captura. Las células 300B4 se cultivaron de acuerdo con protocolos estándares en medio RPMI 1640 que contenía L-glutamina y suplementado con suero fetal bovino al 10%, β -mercaptoetanol en presencia de 1 mg/ml de G418. Se usó un protocolo estándar ELISA para el ensayo de unión a CD19 basado en células. Por ejemplo, los pocillos individuales de una placa de 96 pocillos de fondo U se sembraron con células 300B4 a 1×10^5 y se incubaron durante toda la noche. Las células se lavaron una vez con tampón ELISA antes de la incubación en hielo con los anticuerpos HB12B humano, humanizado, o quimérico. Las reacciones de unión se realizaron en triplicados para cada concentración del anticuerpo que se probó. Se incluyeron en los pocillos de control negativo con un anticuerpo isotipo coincidente de especificidad irrelevante. Luego de la incubación con el anticuerpo, las células 300B4 se lavaron tres veces con 200 microlitros de tampón de ELISA. La cantidad de anticuerpos anti-CD19 quiméricos, humanizados o humanos unidos a las células 300B4 se pudieron detectar usando un anticuerpo anti- kappa humana en carnero conjugado con peroxidasa de rábano picante de acuerdo con protocolos estándares.

7.1.3. Construcción, expresión y características de unión del chHB12B

Un vector de expresión que codifica la cadena pesada del chHB12B que comprende las regiones VH de HB12B murina y la constante de IgH γ 1 humana se construyó de acuerdo con los métodos descritos en la Sección 6.1. Un vector de expresión que codifica la cadena ligera de chHB12B que comprende las regiones VK de HB12B murina y constante de IgL κ humana se construyó de acuerdo con los métodos descritos en la Sección 6.1.

Las células HEK293 se cotransfectaron simultáneamente con los vectores de expresión que codificaban las cadenas pesada y ligeras del chHB12B. Estas células transfectadas se cultivaron durante tres días para permitir la producción del anticuerpo. El medio de cultivo que contenía el anticuerpo chHB12b secretado, soluble se cosechó, y la concentración de anticuerpo chHB12B se determinó de acuerdo con el método descrito en la Sección 6.1.

La unión de chHB12B a CD19 humano se evaluó usando el ensayo ELISA basado en las células 300B4 descrito en la Sección 6.2. Un anticuerpo humano de isotipo coincidente de especificidad irrelevante se incluyó en el ensayo como un control negativo. Los resultados obtenidos usando el ensayo ELISA basado en células mostraron que para las concentraciones de anticuerpo por encima de 100 ng/ml, hubo una unión significativa de anticuerpo quimérico a CD19 humano recombinante expresado en la superficie de las células 300B4, lo que indicó que el chHB12B conservaba la actividad de unión a hCD19 (Figura 2).

7.1.4. Construcción de vectores de expresión que codifican la VH del HB12B humanizado

Las secciones siguientes describen el diseño de variantes humanizadas de la región VH del HB12B que comprende las regiones CDR de HB12B murino y unas regiones adecuadas de marco humano o sustancialmente humano. Estas secciones describen también las estrategias para la generación de variantes de cadenas pesadas de Ig HB12B humanizada.

7.1.4.1. Identificación de las regiones marco del aceptor de cadena pesada humana

Una base de datos de secuencia de aminoácidos que contenía los residuos del marco de todas las regiones V, D y J de la cadena pesada de inmunoglobulina de la línea germinal humana se compilaron. La información necesaria se pudo obtener de una variedad de fuentes, *por ejemplo* V Base: la base de datos de genes de anticuerpos humanos (<http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/>). La base de datos se consultó para los segmentos V y J de la línea germinal humana que mostraban similitud de secuencia con las regiones marco correspondiente de la VH del HB12b murino en residuos claves, *por ejemplo* residuos canónicos, entre cadenas y Vernier.

Los segmentos de la línea germinal humana V3-72 (Tomlinson, MI y otros., J. Mol. Biol., 227:776-798 (1992)) y JH4 (Ravetch, J.V. y otros., Cell 27: 583-591 (1981)) se seleccionaron para servir como marco aceptor para la humanización del anticuerpo HB12B anti-CD19 murino.

7.1.4.2. Generación de cadenas pesadas HB12B humanizadas

La VH HB12B-(3-72/JH4) (sec. con núm. de ident.: 34) se diseñó por la combinación de las CDR de VH de HB12B con los residuos marco de las regiones V3-72/JH4 de la línea germinal humana. Un vector de expresión que comprende VH HB12B-(3-72/JH4) se generó de acuerdo con los métodos descritos en la Sección 6.1.

La VH HB12B-9m (sec. con núm. de ident.: 44) es una variante de VH HB12B-(3-72/JH4) que comprende las siguientes sustituciones de nueve aminoácidos: L20I, F27Y, T28A, R38I, V49I, F67A, R71A, L80M, I91Y (residuos numerados de acuerdo con Kabat). Los cebadores específicos de genes para HB12B-9M se diseñaron como se describió en la Sección 6.1. Un vector de expresión que comprende VH HB12B-9m se generó de acuerdo con los métodos descritos en la Sección 6.1.

7.1.5. Construcción de vectores de expresión que codifican la cadena ligera de Ig HB12B humanizada

Las secciones siguientes describen el diseño de variantes humanizadas de la región VK de HB12B que comprenden regiones CDR de HB12B murino y regiones adecuadas de marco humano, o sustancialmente humano. Estas secciones describen también las estrategias para la generación de variantes de la cadena ligera de Ig HB12B humanizada.

7.1.5.1. Identificación de regiones marco del aceptor de cadena ligera humana

Una base de datos de secuencia de aminoácidos que contenía los residuos de marco de todas las regiones V y J de la cadena ligera de inmunoglobulina de la línea germinal humana se compilaron. La información necesaria se pudo obtener de una variedad de fuentes, *por ejemplo* V Base: la base de datos de genes de anticuerpo humano (<http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/>). La base de datos se consultó para los segmentos V y J de la línea germinal humana que mostraban similitud de secuencia con las regiones marco correspondientes de la VK de HB12b murino en residuos claves, *por ejemplo* residuos canónicos, entre cadenas y Vernier.

Los segmentos Vk A10 de la línea germinal humana (Straubinger, B. y otros., Biol. Chem. Hoppe-Seyler 369:601-607 (1988)) y Jk4 (Hieter, PA y otros., J. Biol. Chem. 257: 1516-1522 (1982)) se seleccionaron para servir como marco aceptor para la humanización del anticuerpo HB12B anti-CD19 murino.

7.1.5.2. Generación de cadenas ligeras de HB12B humanizada

La VK de HB12B-(A10-Jk4) (sec. con núm. de ident.: 52) se diseñó por la combinación de las CDR de VK HB12B con los residuos de marco de las regiones A-10/Jk4 de la línea germinal humana. Un vector de expresión que comprende VK HB12B-(A10-Jk4) se generó de acuerdo con los métodos descritos en la Sección 6.1.

La VK HB12B-364987 (sec. con núm. de ident.: 62) es una variante de VK HB12B-(A10-Jk4) que comprende las sustituciones siguientes de tres aminoácidos: Y40F, K53H, Y91F (residuos numerados de acuerdo con Kabat). Los cebadores específicos de genes para HB12B-364987 se diseñaron como se describió en la Sección 6.1. Un vector de expresión que comprendía VK HB12B-364987 se generó de acuerdo con los métodos descritos en la Sección 6.1.

7.1.6. Características de unión de los anticuerpos HB12B humanizados

Los pares de preparaciones del vector de expresión del plásmido de ADN que codifican las cadenas de inmunoglobulina pesada y ligera (humanizada o quimérica) se usaron para transfectar células HEK293. Estas células HEK293 transfectadas se cultivaron durante tres días para producir medio condicionado que contenía el anticuerpo adecuado para determinar las concentraciones totales de IgG y la actividad de unión a CD19.

La actividad de unión a CD19 humano de los anticuerpos HB12B quiméricos y humanizados se evaluó usando un ensayo ELISA basado en células 300B4 descrito en la Sección 6.2. Un anticuerpo humano de isotipo coincidente de especificidad irrelevante se incluyó en el ensayo como un control negativo. Como se muestra en la Figura 2, se descubrió que la unión de un anticuerpo quimérico que comprendía las cadenas ligeras de chHB12B y las cadenas pesadas de chHB12B y el anticuerpo # 1 humanizado nuevo que comprendía las regiones VH HB12B-(3-72/JH4) y VK HB12B-364987 eran comparables. Para las concentraciones de anticuerpos por encima de 100 ng/ml, hubo una unión específica significativa de ambos anticuerpos a CD19, lo que indicó que el anticuerpo # 1 anti-CD19 humanizado que comprendía las regiones VH HB12B-(3-72/JH4) y VK HB12B 364987 conservaba la actividad de unión a CD19. Sorprendentemente, los anticuerpos humanizados que comprendían la región VH HB12B-9m mostraron una pérdida significativa en comparación con el control CD19 chHB12B.

Los pares de cadenas pesadas y ligeras del HB12B quimérica o humanizada se probaron y su actividad de unión a CD19 humana se resume en la Tabla 4.

Tabla 4. Unión a CD19 de los anticuerpos HB12B quiméricos y humanizados. La actividad de unión a CD19 de diversos anticuerpos HB12B quiméricos y humanizados se evaluó usando un ensayo ELISA basado en células. Las combinaciones VH -VK que muestran la actividad de unión significativa se marcan con "++". Las combinaciones VH-VK sin unión significativa a CD19 humano se marcan con "-".

	chHB12B VK	HB12B-(3-72/JH4) VH	HB12B-9m VH
VK chHB12B	++	++	-
VK HB12B-(A10-Jk4)	-	-	-
VK HB12B-364987	++	++	-

7.1.7. Construcción, expresión y características de unión de las cadenas ligeras de HB12B humanizado

Los protocolos de humanización de los anticuerpos en general tratan de limitar el número de residuos de marco no humano para minimizar la respuesta HAMA. Como consecuencia, se generaron variantes adicionales de VK HB12B humanizado y se evaluó su actividad de unión a hCD19.

La VK HB12B-3649 (sec. con núm. de ident.: 68) es una variante de VK HB12B-(A10-Jk4) que comprende las sustituciones siguientes de dos aminoácidos: Y40F, K53H (numeración de acuerdo con Kabat). Un vector de expresión que comprende VK HB12B-3649 se generó a través de la mutagénesis dirigida a un sitio usando el kit QuickChange (Stratagene, La Jolla, California) en una preparación de ADN de un vector de expresión que comprende VK HB12B-364987 según las instrucciones del fabricante.

La VK HB12B-3687 (sec. con núm. de ident.: 74) una variante de VK HB12B-(A10-Jk4) que comprende las sustituciones siguientes de dos aminoácidos: Y40F y Y91F (numeración de acuerdo con Kabat). Un vector de expresión que comprende VK HB12B-3687 se generó a través de la mutagénesis dirigida a un sitio usando el kit QuickChange (Stratagene, La Jolla, California) en una preparación de ADN de un vector de expresión que comprende VK HB12B-364987 según las instrucciones del fabricante.

La VK HB12B-4987 (sec. con núm. de ident.: 76) es una variante de VK HB12B-(A10-Jk4) que comprende las sustituciones siguientes de dos aminoácidos: K53H y Y91 F (numeración de acuerdo con Kabat). Un vector de expresión que comprende VK HB12B-4987 se generó a través de la mutagénesis dirigida a un sitio usando el kit de QuickChange (Stratagene, La Jolla, California) en una preparación de ADN de un vector de expresión que comprende VK HB12B-364987 según las instrucciones del fabricante.

La VK HB12B-36 (sec. con núm. de ident.: 70) es una variante de VK HB12B-(A10-Jk4) que comprende la siguiente sustitución de aminoácido: Y40F (numeración de acuerdo con Kabat). Un vector de expresión que comprende VK HB12B-36 se generó a través de la mutagénesis dirigida a un sitio usando el kit de QuickChange (Stratagene, La Jolla, California) en una preparación de ADN de un vector de expresión que comprende VK HB12B-(A10-Jk4) según las instrucciones del fabricante.

La VK HB12B-49 (sec. con núm. de ident.: 80) es una variante de VK HB12B-(A10-Jk4) que comprende la siguiente sustitución de aminoácido: Y53F (numeración de acuerdo con Kabat). Un vector de expresión que comprende VK HB12B-49 se generó a través de la mutagénesis dirigida a un sitio usando el kit de QuickChange (Stratagene, La Jolla, California) en una preparación de ADN de un vector de expresión que comprende VK HB12B-(A10-Jk4) según las instrucciones del fabricante.

La HB12B-87 VK (sec. con núm. de ident.: 78) es una variante de VK HB12B-(A10-Jk4) que comprende la siguiente sustitución de aminoácido: Y91F (numeración de acuerdo con Kabat). Un vector de expresión que comprende VK HB12B-87 se generó a través de la mutagénesis dirigida a un sitio usando el kit de QuickChange (Stratagene, La Jolla, California) en una preparación de ADN de un vector de expresión que comprende VK HB12B-(A10-Jk4) según las instrucciones del fabricante.

Los pares de preparaciones del vector de expresión del plásmido de ADN que codifican una cadena pesada que comprende VH HB12B-(3-72/JH4) y cada una de las variantes VK descritas en la Sección 6.1.7 se usaron para cotransfectar las células HEK293. Estas células HEK293 cotransfectadas se cultivaron durante tres días para producir medio condicionado que contenía el anticuerpo humanizado adecuado para determinar las concentraciones totales de IgG y la actividad de unión a CD19.

La actividad de unión a CD19 humano de los anticuerpos HB12B humanizados se evaluó usando un ensayo ELISA basado en células 300B4 descrito en la Sección 6.1.2. El chHB12B se incluyó en el ensayo como un control positivo. Como se muestra en la Figura 3, se descubrió que la unión del chHB12B que comprende VH chHB12B y VK chHB12B y el anticuerpo # 2 humanizado nuevo que comprende las regiones VH HB12B-(3-72/JH4) y VK HB12B-3649 eran comparables. Para las concentraciones de anticuerpos por encima de 100 ng/ml, hubo una unión específica significativa de ambos anticuerpos a hCD19, lo que indicó que el anticuerpo humanizado que comprende VH HB12B-(3-72/JH4) y VK HB12B-3649 conservaba la actividad de unión a hCD19. El anticuerpo humanizado HB12B # 1, que comprende VK HB12B-364987 también mostró unión a CD19 humana. El anticuerpo humanizado HB12B # 3 que comprende VK HB12B-36 presentó unión significativamente reducida a CD19 en comparación con la unión del anticuerpo de control chHB12B.

En conjunto, estos datos indicaron que un número de versiones humanizadas de las cadenas VH y VK de HB12B que se crearon, conservaban las propiedades de unión del anticuerpo de ratón original derivado del hibridoma HB12B.

7.2 Actividad *in vitro* ADCC de los anticuerpos anti-CD19 humanizados

Las secciones siguientes describen la caracterización de la actividad ADCC *in vitro* de los anticuerpos anti-CD19 humanizados.

7.2.1. Preparaciones del anticuerpo anti-CD19 humanizado

El anticuerpo anti-CD19 humanizado # 2 purificado que comprende VH HB12B-(3-72/JH4), VK HB12B-3649, y la región constante de la cadena pesada IgG1 (en lo sucesivo referido como "anticuerpo 3649" o "3649") se prepararon usando técnicas estándar. En resumen, una preparación del vector de expresión del plásmido de ADN que codifica las cadenas pesada y ligera de 3649 se usó para transfectar las células HEK293F. Las células transfectadas se alimentaron en el día 3 y 6 y el medio condicionado que contenía el anticuerpo se cosechó en el día 9. El anticuerpo se purificó a partir del medio condicionado usando una columna prefabricada de proteína A (GE Healthcare). El anticuerpo se eluyó de la columna con tampón de pH bajo, se neutralizó, y se dializó frente a PBS. La concentración del anticuerpo purificado se calculó a partir de la densidad óptica de la solución a 280 nm.

Un vector de expresión de anticuerpos que codifica una variante de Fc 3649 que comprende las sustituciones de los aminoácidos S239D, A330L, y I332E (en lo sucesivo referido como "3649-3M") se generó usando los métodos descritos en US 2004/0132101 y US 2005/0054832, ambos de Lazar y otros. En resumen, el vector de expresión de anticuerpos que codifica 3649 se modificó usando un kit de mutagénesis dirigida a un sitio (*por ejemplo*, QuickChange (Promega)) por la introducción de las sustituciones necesarias de los residuos de nucleótidos dentro de la secuencia de polinucleótido que codifica la región constante de la cadena pesada para generar el vector de expresión del anticuerpo 3649-3M. El anticuerpo 3649-3M purificado se generó por la transfección de células HEK293F con el vector de expresión del anticuerpo 3649-3M. Las células transfectadas se alimentaron en el día 3 y 6 y el medio condicionado que contenía el anticuerpo se cosechó en el día 9. El anticuerpo se purificó a partir del medio condicionado usando una columna prefabricada de proteína A (GE Healthcare). El anticuerpo se eluyó de la columna con tampón de pH bajo, se neutralizó, y se dializó frente a PBS. La concentración del anticuerpo purificado se calculó a partir de la densidad óptica de la solución a 280 nm.

Un vector de expresión de anticuerpos que codifica una variante de Fc 3649 que comprende las sustituciones de los aminoácidos L234F, L235E, y P331S (en lo sucesivo referido como "3649-TM") se generó usando los métodos descritos en US 2004/0132101 y US 2005/0054832, ambos de Lazar y otros. En resumen, el vector de expresión de anticuerpos que codifica 3649 se modificó usando un kit de mutagénesis dirigida a un sitio (*por ejemplo*, QuickChange (Promega)) por la introducción de las sustituciones necesarias de los residuos de nucleótidos dentro de la secuencia de polinucleótido que codifica la región constante de la cadena pesada para generar el vector de expresión del anticuerpo 3649-TM. El anticuerpo 3649-TM purificado se generó por la transfección de células HEK293F con el vector de expresión del anticuerpo 3649-TM. Las células transfectadas se alimentaron en el día 3 y 6 y el medio condicionado que contenía el anticuerpo se cosechó en el día 9. El anticuerpo se purificó a partir del medio condicionado usando una columna prefabricada de proteína A (GE Healthcare). El anticuerpo se eluyó de la columna con tampón de pH bajo, se neutralizó, y se dializó frente a PBS. La concentración del anticuerpo purificado se calculó a partir de la densidad óptica de la solución a 280 nm.

Una composición del anticuerpo 3649 (en lo sucesivo referido como 3649-afuc) que comprende una pluralidad de anticuerpos que tienen el complejo de N-glucósido enlazado a las cadenas de azúcar enlazadas a la Asn297 de la región Fc en la que la fucosa no se une a la N-acetilglucosamina en el extremo reductor se preparó de acuerdo con los métodos establecidos en US 6,946,292 de Kanda y otros. En resumen, las células CHO knock-out para la fucosiltransferasa se transfectaron con una preparación del vector de expresión del plásmido de ADN que codifica las cadenas pesada y ligera de 3649. Las células transfectadas se alimentaron en los días 3 y 6 y el medio condicionado que contenía el anticuerpo se cosechó en el día 9. El anticuerpo se purificó a partir del medio condicionado usando una columna prefabricada de proteína A (GE Healthcare). El anticuerpo se eluyó de la columna con tampón de pH bajo, se neutralizó, y se dializó frente a PBS. La concentración del anticuerpo purificado se calculó a partir de la densidad óptica de la solución a 280 nm.

Las preparaciones de anticuerpos fueron sustancialmente puras de proteínas contaminantes como se demuestra en la Figura 4. La afinidad de unión al antígeno de 3649-afuc es comparable con aquella de 3649 como se muestra en la Figura 5.

7.2.2. Ensayo *in vitro* ADCC

El ensayo de Citotoxicidad CytoTox 96® No radiactivo (Promega) es una alternativa colorimétrica a los ensayos de citotoxicidad por liberación de 51Cr. El ensayo CytoTox 96® mide cuantitativamente la lactato deshidrogenasa (LDH), una enzima citosólica estable que se libera en la lisis celular. La liberación de LDH en sobrenadantes de cultivo se mide con un ensayo enzimático acoplado de 30 minutos, lo que resulta en la conversión de una sal de tetrazolio (INT) en un producto formazano rojo. La cantidad de color formado es proporcional al número de células lisadas.

Los ensayos se realizaron según las instrucciones del fabricante. En resumen, las células diana se lavaron con PBS, se resuspendieron en medios RPMI libres de Fenol 5 a una densidad celular de 0.4×10^6 /ml. Las células efectoras NK se lavaron una vez en PBS y se resuspendieron en medios RPMI libres de Fenol 5 - a una densidad celular de 1×10^6 /ml. Los ensayos se realizaron en placas de fondo U de 96 pocillos. Cada placa de ensayo incluyó una combinación de pocillos experimentales y de control. Los pocillos experimentales se prepararon por la combinación de 50 µl de la dilución apropiada del anticuerpo, 50 µl de la suspensión de células diana y 50 µl de la suspensión de células efectoras. Las densidades de células descritas anteriormente resultaron en una relación 1:2.5 de célula diana a efectora; el concentrado de célula efectora puede ser diluido adicionalmente o concentrado, si se desea una relación diana a efectora diferente. Varios tipos diferentes de pocillos de control se usaron para justificar (i) la liberación espontánea de LDH de las células diana (diana espontánea), (ii) la liberación espontánea de LDH de células efectoras (efector espontáneo), (iii) la liberación máxima de LDH de las células diana (diana máximo), y (iv) la presencia de contaminantes en el medio de cultivo (Fondo). Todos los pocillos en uso sobre una placa de 96 pocillos contenían el mismo volumen final. Las reacciones se prepararon por triplicado. A continuación de la preparación, las placas se centrifugaron a 120 x g durante 3 minutos para sedimentar las células. Se incubó la placa a 37 °C/ 5% de CO₂ durante 4 horas. Cuarenta y cinco minutos antes del final de la incubación 15 µl de tampón de lisis proporcionado por el fabricante se adicionó al pocillo control de liberación máxima de la célula diana. Después de la incubación la placa se centrifugó a 120 x g durante 4 minutos. Se transfirieron 50 µl del sobrenadante de cada pocillo a una nueva placa de fondo plano de 96 pocillos. Se adicionaron 50 µl de la mezcla de sustrato reconstituido (montado a partir de los componentes proporcionados por el fabricante) y la placa se incubó a temperatura ambiente 10-20 minutos protegida de la luz. Se adicionaron 50 µl de tampón de parada proporcionado por el fabricante y la absorbancia a 490 ó 492 nm se midió en un lector de placas. El % de citotoxicidad fue igual (Experimental-Efector espontáneo - Diana Espontáneo)/(diana máximo - diana espontáneo). Antes de calcular el % de citotoxicidad todos los demás valores se redujeron por el fondo.

El 3649 de manera eficiente reclutó las células efectoras para las células diana que expresaban CD20 humano en un ensayo ADCC. La actividad ADCC de la forma afucosilada (3649-afuc) fue aún más robusta. Las variantes Fc con afinidad aumentada (3649-3M) o disminuida (3649-TM), para los receptores Fc γ mostraron actividad ADCC aumentada o disminuida, respectivamente, como se esperaba. La actividad ADCC se observó con ambas células diana humanas inmortalizadas y recién aisladas. Una muestra representativa de los datos experimentales que apoyaban estas afirmaciones se presentó en las Figuras 5 a 9.

7.2.3. ADCC *in vitro* mediada por el anticuerpo anti-CD19 está influenciada por la afinidad de la región Fc al receptor Fc γ RIIIA

La afinidad de unión relativa de diversas preparaciones de anticuerpos humanizados anti-CD19 para el receptor Fc γ RIIIA humano (CD16) pudo determinarse usando un ensayo ELISA. Las placas de microtitulación se recubrieron con 50 μ l de la preparación del anticuerpo (50 μ g/ml) a 4 °C durante toda la noche. Todos los sitios de unión restantes se bloquearon con leche descremada al 4% en tampón PBS (tampón de bloqueo) durante 1 hora a 37 °C. Después de lavar los pocillos, 50 μ l de la proteína bandera Fc γ RIIIA monomérica diluida en serie se adicionaron a cada pocillo y se incubaron durante 60 minutos a 37 °C. 50 μ l de 2.5 mg/ml de anti-bandera-ME-biotina (Sigma) se adicionaron a cada pocillo y se incubaron durante 30 min a 37 °C. Los pocillos se lavaron entre la incubación con cada uno de los reactivos siguientes. 50 μ l de 0.1 μ g/ml de avidina conjugada con HRP (Pierce) se adicionaron a cada pocillo y se incubaron durante 30 min a 37 °C. La detección se llevó a cabo por la adición de 30 μ l de sustrato (Pierce) de tetrametilbenzidina (TMB) seguido por la neutralización con 30 μ l de 0.2 M de H₂SO₄. La absorbancia se leyó a 450 nm.

Como se muestra en la Figura 15, la afinidad de unión del anticuerpo 3649 de la variante de Fc con ADCC aumentada (3649-3M) y el anticuerpo 3649 afucosilado (3649-aFuc) para Fc γ RIIIA fue superior que aquella del anticuerpo 3649 tipo salvaje fucosilado. El experimento se realizó usando una proteína bandera Fc γ RIIIA que comprendía el dominio extracelular de la isoforma de alta afinidad V158 de Fc γ RIIIA humano.

Las variaciones alélicas en el receptor de Fc influyen en la interacción de la región Fc- receptor de Fc, y de este modo también en la función efectora de un anticuerpo. El efecto de los receptores Fc γ RIIIA de alta afinidad y baja afinidad en la ADCC puede estudiarse por la realización de las reacciones ADCC con células efectoras NK recién aisladas que comprenden receptores de variantes alélicas diferentes. La Figura 16 resume los resultados de un experimento de ese tipo. Las reacciones ADCC se realizaron como se describió anteriormente, usando células diana Daudi. Los anticuerpos anti-CD19 # 2 tanto fucosilado (3649) como afucosilado (3649-afuc) se probaron. Las reacciones de control se llevaron a cabo usando un anticuerpo anti-CD20. Las células NK efectoras se aislaron de donantes sanos siguiendo protocolos estándares. El genotipo de la célula NK pudo determinarse utilizando reacciones de PCR específicas de alelo (ver, Leppers-van de Straat y otros., J Immunol Methods. 242 (1-2) :127-32 (2000)). Las Figuras 16A y B muestran que los tres anticuerpos probados mostraron actividad ADCC bajo las condiciones de reacción usadas. La actividad ADCC se detectó usando ya sea una línea de células NK (A) o células NK recién aisladas (B) como efectoras. Las células NK que comprendían al menos una copia de la isoforma de alta afinidad del receptor Fc γ RIIIA (genotipos V158/V158 y V158/F158) fueron células efectoras más eficientes que las células NK homocigotas para los alelos de los receptores de baja afinidad (genotipo F158/F158) (Figura 16C-E). La falta de fucosilación aumentó la actividad ADCC de un anticuerpo a pesar del genotipo Fc γ RIIIA de las células efectoras. La actividad ADCC observada del anticuerpo fucosilado (3649) mediada por células NK V158/V158 o V158/F158 (C, D) fue comparable con la actividad ADCC del anticuerpo afucosilado (3649-aFuc) mediada por las células NK F158/F158 (E).

7.3. Anticuerpos y análisis de inmunofluorescencia

Los anticuerpos anti-CD19 descritos anteriormente, que se unen al antígeno CD19 humano, se pueden usar en los enfoques descritos a continuación. Otros anticuerpos, que pueden emplearse en los experimentos descritos a continuación incluyen los anticuerpos monoclonales de ratón anti-CD22 que se unen a CD22 de ratón, *por ejemplo* el HIB22 (Abcam; Dorken B y otros, J Immunol 136:4470-9 (1986)); anticuerpos monoclonales de ratón específico a CD20 (Uchida y otros, Intl. Immunol, 16:119-129 (2004)); anticuerpo B220 RA3-6B2 (DNAX Corp., Palo Alto, California), y los anticuerpos CD5, CD43 y CD25 (BD PHARMINGEN™, Franklin Lakes, NJ). Los anticuerpos anti Ig o IgM de ratón de isotipo específico se pueden obtener de Southern Biotechnology Associates, Inc. (Birmingham, Alabama).

Cualquiera de las líneas celulares pre-B de ratón, transfectadas con ADNc de hCD19, que se pueden desarrollar usando métodos y materiales conocidos en la materia (*ver, por ejemplo* Alt y otros., Cell, 27:381-388 (1981) y Tedder y Isaacs, J. Immunol., 143:712-717 (1989)), o la suspensión de leucocitos de una única célula, se tiñeron en hielo usando concentraciones óptimas, predeterminadas, de cada anticuerpo marcado fluorescentemente durante 20-30 minutos de acuerdo con los métodos establecidos (Zhou y otros., Mol. Cell. Biol., 14:3884-3894 (1994)). Las células con las propiedades de dispersión de luz frontal y lateral de los linfocitos pudieron analizarse luego en citómetros de flujo

FACSCAN® o FACSCALIBUR® (Becton Dickinson, San Jose, California). La tinción del fondo pudo determinarse usando los anticuerpos de control no reactivos (CALTAG™ Laboratories, Burlingame, California) con las ventanas colocadas para excluir las células no viables. Para cada muestra examinada, diez mil células con las propiedades de dispersión de luz frontal y lateral de las células mononucleares se analizaron siempre que fue posible, con la intensidad de fluorescencia que se mostró en una escala logarítmica de cuatro décadas.

Ratones. Los ratones transgénicos que expresan hCD19 y sus compañeros de camada de tipo salvaje (WT) se pueden producir como se describe en la materia (Zhou y otros., Mol. Cell. Biol., 14:3884-3894 (1994)). Por ejemplo, los ratones hCD19tg se pueden generar de fundadores hCD19 original (*por ejemplo*, C57BL/6 x B6/SJL), y cruzar después sobre un fondo C57BL/6 por al menos 7 generaciones. Después de múltiples generaciones de retrocruzamiento, se obtendrían ratones en el que sus células B expresarían la densidad de CD19 humano en la superficie celular a aproximadamente la misma densidad encontrada en las células B humanas.

Los ratones cruzados con los ratones deficientes ($\text{FCR}\gamma^{-/-}$, B6.129P2-Fcerg1^{tm1}) de cadena γ ($\text{FCR}\gamma$) común del FcR (receptor de Fc) estaban disponibles de Taconic Farms (Germantown, Nueva York) y pudieron usarse para generar compañeros de camada hCD19^{+/+} FcR $\gamma^{-/-}$ y WT. Los ratones homocigotos para un transgén c-Myc (EM-cMycTG, C57BL/6J-TgN (IghMyc); The Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine) se describieron en la materia (Harris y otros, J. Exp. Med., 167: 353 (1988) y Adams y otros, Nature, 318:533 (1985)). Los ratones c-MycTG (fondo B6/129) pudieron cruzarse con ratones hCD19tg para generar los descendientes hemicigotos hCD19tg cMycTG^{+/+}, que pudieron identificarse mediante la selección por PCR. Los ratones Rag1^{-/-} (B6.12957-Rag1^{tm1Mom}/J) estaban disponibles del laboratorio Jackson. Los ratones deficientes de macrófagos pudieron generarse por las inyecciones en la vena de la cola de liposomas encapsulados con clodronato (0.1 ml/10 gramos de peso corporal; Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri) en ratones C57BL/6 en el día -2, 1 y 4 de acuerdo con métodos estándares (Van Rooijen y Sanders, J. Immunol. Methods, 174:83-93 (1994)). Todos los ratones debieron alojarse en una instalación de barrera libre de agentes patógenos específicos y se usaron por primera vez a las 6-9 semanas de edad.

ELISA. Las concentraciones de Ig en el suero se determinaron por ELISA usando IgM, IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3 e IgA de ratón purificadas por afinidad (Southern Biotechnology Associates, Inc., Birmingham, Alabama) para generar las curvas estándar como se describió (Engel y otros., Immunity, 03:39 (1995)). Los niveles de autoanticuerpos IgM e IgG en suero frente a ADNdc, ADNsc e histona se determinaron por ELISA usando placas de microtitulación recubiertas como se describió (Sato y otros, J. Immunol., 157:4371 (1996)) con ADN de doble cadena (dc) de timo de ternera (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri), ADN hervido de timo de ternera (que contiene ADN de simple cadena (sc)) o histona (Sigma-Aldrich).

Inmunoterapia. Los anticuerpos control de isotipo no reactivo, y anti-CD19 estériles (0.5-250µg) en 200 µl de solución salina tamponada con fosfato (PBS) se inyectaron a través de las venas laterales de la cola. Por ejemplo, los experimentos pueden usar una cantidad fijada de anticuerpo (*por ejemplo*, 250 µg). Los números de leucocitos en la sangre se cuantificaron mediante hemocitómetro a continuación de la lisis de glóbulos rojos, las frecuencias de células B B220 + se determinaron mediante la tinción por inmunofluorescencia con análisis de citometría de flujo. Las dosis de anticuerpos en humanos y ratones pueden compararse usando la herramienta de Oncología para calcular la dosis (www.fda.gov/CDER/cancer/animalframe.htm).

Inmunizaciones. Los ratones WT de dos meses se inmunizaron i.p. con 50 µg de 2,4,6-trinitrofenilo (TNP) conjugado a lipopolisacárido (LPS) (Sigma, St. Louis, Missouri) ó 25 µg de 2,4-dinitrofenol (DNP) conjugado a FICOLL® (Biosearch Technologies, San Rafael, CA) en solución salina. Los ratones se inmunizaron también i.p. con 100 µg de DNP conjugada a hemocianina extraída del molusco llamado lapa californiana (DNP-KLH, CALBIOCHEM®-NOVABIOCHEM® Corp., La Jolla, California) en adyuvante completo de Freund y se reforzó 21 días más tarde con DNP-KLH con adyuvante incompleto de Freund. Se tomaron muestras de sangre de los ratones antes y después de las inmunizaciones, como se indicó. Los títulos de anticuerpos específicos a DNP o TNP en muestras individuales de suero se midieron por duplicado usando placas ELISA recubiertas con DNP-BSA (CALBIOCHEM®-NOVABIOCHEM® Corporation, La Jolla, California) o TNP-BSA (Biosearch Technologies, San Rafael, California) de acuerdo con métodos estándares (Engel y otros., Immunity, 3:39-50 (1995)). Los sueros de ratones inmunizados con TNP-LPS se diluyeron 1:400, con sueros de DNP-FICOLL® y ratones inmunizados con DNP-BSA se diluyeron 1:1000 para el análisis ELISA.

Análisis estadístico. Todos los datos pueden expresarse como las medias ± SEM con la prueba t de Student usada para determinar el significado de las diferencias entre las medias de las muestras.

7.4. Expresión de CD19 humano en ratones transgénicos

Los ratones transgénicos hCD19tg, que pudieron desarrollarse como se describió en la presente, u otros animales transgénicos que expresen CD19 humanos se pueden usar para evaluar diferentes regímenes terapéuticos que

comprendan anticuerpos anti-CD19, tales como las variaciones en la concentración de la dosificación, la cantidad y el horario. La eficacia en pacientes humanos de los regímenes terapéuticos diferentes se puede predecir usando los dos indicadores descritos a continuación, es decir, la depleción de las células B en determinados fluidos corporales y/o tejidos y la capacidad de un anticuerpo monoclonal anti-CD19 humano o humanizado para unir a las células B. En modalidades particulares, los regímenes de tratamiento que son eficaces en ratones transgénicos a CD19 humano pueden usarse con composiciones y métodos de la invención para tratar trastornos de células B humanas y enfermedades que incluyen, pero no se limitan a, tumores malignos de células B y enfermedades o trastornos autoinmunes.

Para determinar si el CD19 humano se expresa en las células B de ratones transgénicos (hCD19tg) que expresan el transgén CD19 humano, las células B se extraen de la médula ósea, sangre, bazo y lavado peritoneal de estos ratones. La expresión de CD19 humano y CD19 de ratón se evaluó en estas células por el contacto de las células con anticuerpos anti-CD19 que se unen específicamente al CD19 humano o CD19 de ratón (mCD19). La unión del anticuerpo a las células del linaje B se detectó usando dos tinciones de inmunofluorescencia de color con análisis de citometría de flujo. Los niveles relativos de expresión de mCD19 y hCD19, se evaluaron midiendo la intensidad de fluorescencia media (anti-hCD19 para hCD19 y anti-mCD19 para mCD19), respectivamente.

El nivel de expresión de unos transgenes CD19 humano y CD20 humano se determinó esencialmente como se describió anteriormente. Los linfocitos circulantes se aislaron de ratones C57B16 CD19 tg^{+/-}, C57B16 hCD19 tg^{+/+}, Balb/c hCD20 tg^{+/-} y Balb/c de tipo salvaje usando los procedimientos estándares. Los animales se alojaron en una instalación libre de patógenos. La edad y el número de animales usados de cada genotipo se enumeraron en la Figura 10. Las células aisladas se tiñeron con los anticuerpos anti CD19 de ratón conjugado con PerCP Cy5.5 (clon 1D3, BD Biosciences), anti-CD3 conjugado con PE (por ejemplo, clon 17A2, BD Biosciences), anti CD19 humano conjugado con Floor® Alexa 488 (clon H1B19, BD Biosciences), y anti CD20 humano conjugado con Alexa Fluor® 647 (por ejemplo, clon 2H7, AbD Serotec). Las células inmunoteñidas se analizaron en un citómetro de flujo. La población de células B se definió como células anti-CD19⁺, anti-CD3⁻ de ratón. La intensidad de fluorescencia media de las células anti-CD19⁺, anti-CD3⁻ de ratón detectadas en los canales hCD19 y hCD20 se describe en la Figura 10A. La expresión de CD19 humano se detectó como se esperaba solo en las células transgénicas hCD19. La expresión de hCD19 fue dependiente de la dosis, los niveles de tinción en tg^{+/+} fue aproximadamente el doble que se vio en las células B tg^{+/-}. El nivel de expresión de hCD19 fue estable en todos los grupos de edad examinados.

El porcentaje de células B entre los linfocitos circulantes se calculó para todas las muestras. Las células B se definieron como células anti-CD19⁺, anti-CD3⁻ de ratón para el propósito del cálculo. Los resultados se muestran en la Figura 10B. Los animales con un transgén hCD19 tuvieron un reducido número de células B entre los linfocitos circulantes. La reducción del número de células B fue más pronunciada en los animales hCD19 tg^{+/+}. Estos resultados concuerdan con las observaciones publicadas anteriormente (Zhou y otros., Mol. Cell. Biol., 14:3884-3894 (1994)).

7.5. Agotamiento de células B *in vivo* mediado por anticuerpos anti-CD19

Los anticuerpos anti-CD19 de la invención, que se unen a CD19 humano, se pueden evaluar por su capacidad para depletar *in vivo* las células B de hCD19tg en sangre, bazo y ganglios linfáticos. Por ejemplo, cada anticuerpo se administra a los ratones, ya sea en 250 ó 50 µg/ratón, una dosis única de aproximadamente 10 a 50 veces menor que la dosis de 375 mg/m² suministrada principalmente cuatro veces para la terapia anti-CD20 en los humanos (Maloney y otros., J. Clin. Oncol., 15:3266-74 (1997) y McLaughlin y otros., Clinical status and optimal use of rituximab for B cell lymphomas, Oncology (Williston Park), 12:1763-9 (1998)). La depleción de las células B de la sangre, bazo y ganglios linfáticos de los ratones hCD19tg se determina mediante tinción por inmunofluorescencia con citometría de flujo. Los resultados usando los anticuerpos anti-CD19 identificados como capaces de depletar las células B pueden correlacionarse con el uso en humanos y los anticuerpos con las propiedades de los anticuerpos identificados se pueden usar en las composiciones y métodos de la invención para el tratamiento de trastornos de células B humanas y las enfermedades que incluyen pero no se limitan a, tumores malignos de células B y enfermedades o trastornos autoinmunes.

El anticuerpo anti-CD19 humanizado 3649 se probó en un ensayo de depleción de células B esencialmente como se describió anteriormente. A los ratones C57B16 hCD19 tg^{+/-} y C57B16 hCD19 tg^{+/+} se les administró una única dosis i.v. de 50 ó 250 µg del anticuerpo 3649. Se usaron dos grupos control. Los miembros del primer grupo recibieron 50 ó 250 µg del anticuerpo R347 de especificidad irrelevante; los miembros del segundo grupo recibieron 50 ó 250 µg de la variante 3649-TMFC con actividad ADCC disminuida (ver Figura 6). Los números de animales en cada grupo se describen en las Figuras 11 y 12. Los animales se alojaron en una instalación libre de patógenos. A los 7 días posteriores al tratamiento las células mononucleares se aislaron de la sangre circulante y los bazos. Las células aisladas se tiñeron con los anticuerpos anti-CD19 de ratón conjugados con PerCP Cy5.5 (clon 1D3, BD Biosciences) y anti CD20 de ratón conjugado con APC-Cy5.5 (clone RA3-6B2, Invitrogen). Las muestras inmunoteñidas se analizaron en un

citómetro de flujo. Las células B se definieron como células anti- CD19 + de ratón, anti- B220+ de ratón para los propósitos del experimento. El porcentaje de células B entre los linfocitos circulantes se presenta en la Figura 11. El porcentaje y número absoluto de células B entre las células del bazo se describe en la Figura 12. Una dosis única de 50 µg del anticuerpo anti-CD19 3649 fue suficiente para lograr la depleción significativa de las células B circulantes y esplénicas. El nivel de depleción estuvo influenciado por la dosis de anticuerpos y la densidad superficial de hCD19. La depleción fue más completa en los animales hCD19 tg +/- que recibieron 250 µg del anticuerpo. La depleción fue más amplia entre los linfocitos circulantes que en el bazo en todos los animales evaluados.

Un estudio separado se realizó también para medir la capacidad de diversas preparaciones de los anticuerpos anti-CD19 3649 para depletar las subpoblaciones de células B circulantes, esplénicas, peritoneal, y de médula ósea en un animal hCD19 tg +/- . El experimento se realizó como sigue: Ratones C57B16 HCD19 tg +/- de tres a cuatro meses de edad de sexo coincidente se inyectaron a través de las venas de la cola lateral con preparaciones estériles libres de endotoxinas del anticuerpo anti-CD19 diluidas en PBS a 10, 50 ó 250 µg por dosis por ratón. Se probaron los siguientes anticuerpos anti-CD19: el anticuerpo anti-CD19 # 2 fucosilado (3649), el anticuerpo anti-CD19 # 2 afucosilado (3649-aFuc), el anticuerpo anti-CD19 # 2 de la variante de Fc de ADCC aumentada (3649-3M), y el anticuerpo anti-CD19 # 2 de la variante de Fc de ADCC reducida (3649-TM). Un grupo de animales control se inyectaron con un anticuerpo control de isotipo coincidente de especificidad irrelevante (R347). Siete días posteriores a la inyección, los ratones se sacrificaron y se recogieron las células de la sangre, bazo, médula ósea y cavidad peritoneal. Los glóbulos rojos se lisaron siguiendo protocolos estándares y el conteo total de células viables se determinó usando una máquina de conteo celular automatizada Via Cell. Las suspensiones de células individuales aisladas se inmunotifieron y se analizaron en un citómetro de flujo siguiendo los protocolos estándares. Los anticuerpos usados para la inmunotinción se enumeraron en la Tabla 5. Los resultados de la depleción se resumieron en las Tablas 6-21. Los resultados de la depleción obtenidos usando el anticuerpo anti-CD19 # 2 afucosilado (3649-aFuc) se presentaron en la Figura 28. El fenotipo de activación de las células NK de los animales tratados con el anticuerpos anti-CD19 # 2 afucosilado o fucosilado (3649-aFuc o 3649, respectivamente) se presentó en la Figura 29. Las definiciones del subconjunto de células B usadas durante el análisis son como sigue:

Sangre:	células B: B220+, CD19 + de ratón
Bazo:	células B: B220+, CD19 + de ratón
	Células B de transición: después de la activación en células B, CD93 +
	Células B 1 de transición (T1): IgM + CD23-
	Células B 1 de transición (T2): IgM + CD23 +
	Células B 1 de transición (T3): IgM de bajo contenido de CD23 +
	Células B maduras: después de la activación en células B, CD93-
	Células B foliculares: IgM+CD23+
	Células B de la zona marginal: IgM de alto contenido de CD23-
Médula ósea:	células B: B220+, CD19 + de ratón
	Células Pro-B: después de la activación en células B, CD43 + IgMPre-
	Células B: después de la activación en células B, CD43-IgM+
	y las células B maduras: después de la activación en células B, CD43-IgM +
	Células B inmaduras: CD43 -IgM + CD93+
	Células B maduras: CD43- IgM+ CD93 + bajo / -
Cavidad peritoneal:	células B: IgM +

Tabla 5. Anticuerpos usados para la identificación de las células B en experimentos de depleción *in vivo*. Las células muertas se detectaron por tinción con 7-AAD.

	Antígeno	Tinte	Número de clones	Fuente
Bazo	B220	FITC PerCP-	RA3-6B2	BD Bioscience
	CD19	Cy5.5	1D3	BD Bioscience
	CD23	PE	B3B4	Biolegend
	hCD19	PE-Alexa 610	SJ25-C1	Invitrogen
	IgM	PE-Cy7	II/41	eBioscience
	ClqRp	Apc	AA4.1	eBioscience
Médula ósea	B220	FITC PerCP-	RA3-6B2	BD Bioscience
	CD19	Cy5.5	1D3	BD Bioscience
	CD43	PE	S7	BD Bioscience
	hCD19	PE-Alexa 610	SJ25-C1	Invitrogen
	IgM	PE-Cy7	II/41	eBioscience
	ClqRp	Apc	AA4.1	eBioscience
Cavidad peritoneal	B220	FITC PerCP-	RA3-6B2	BD Bioscience
	CD19	Cy5.5	1D3	BD Bioscience
	CD43	PE	S7	BD Bioscience
	hCD19	PE-Alexa 610	SJ25-C1	Invitrogen
	IgM	PE-Cy7	II/41	eBioscience
	CD5	Apc	53-7.3	eBioscience
Sangre	hCD19 CD3	Alexa 488 PE	SJC25	Invitrogen
	mCD19	PerCP Cy5.5	1D3	BD Bioscience
	B220	Alexa 647	RA3-6B2	BD Bioscience

Tabla 6. Resumen de los resultados de la depleción de las células B circulantes. Los anticuerpos 3649, 3649-3M, 3649-TM o R347 control se administraron a los ratones hCD19tg+/- siguiendo el protocolo descrito anteriormente. El % de células B se definió como la fracción de linfocitos de la sangre B220+, CD19 +de ratón; la población de linfocitos se detectó basado en el perfil característico dispersado lateralmente y hacia delante (ver la Figura 17A para los detalles). El % de depleción se calculó como $100 \times (\% \text{ de células B (anticuerpo control)} - \% \text{ de células B (anticuerpo experimental)}) / \% \text{ de células B (anticuerpo control)}$. Los números de depleción negativos se usan cuando el tamaño de una población de células en el animal tratado fue más grande que el tamaño correspondiente en el animal control.

Anticuerpo	Dosis (µg/ratón)	% células B	% depleción
R347	10	26.8%	N/A
R347	50	37.9%	N/A
R347	250	22.2%	N/A
3649	10	16.9%	36.94%
3649	50	1.5%	96.12%
3649	250	1.0%	95.64%
3649-3M	10	1.1%	95.82%
3649-3M	50	0.1%	99.84%
3649-TM	50	32.8%	13.47%
3649-TM	250	26.4%	(-18.7%)

Tabla 7. Resumen de los resultados de la depleción de las células B esplénicas. Los anticuerpos 3649, 3649-3M, 3649-TM o R347 control se administraron a ratones hCD19tg+/- siguiendo el protocolo descrito anteriormente. El % de células B se definió como la fracción de linfocitos B220+, CD19 +de ratón (ver la Figura 17B para los detalles). El % de depleción se calculó como $100 \times (\text{número de células (anticuerpo control)} - \text{número de células (anticuerpo experimental)}) / \text{número de células (anticuerpo control)}$. Los números de depleción negativos se usaron cuando el tamaño de una población de células en el animal tratado fue más grande que el tamaño correspondiente en el animal control.

Anticuerpo	Dosis (µg/ratón)	% células B	Número de células/ animal	% depleción
R347	10	17.2%	5,991,451	N/A
R347	50	22.5%	4,620,997	N/A
R347	250	25.7%	5,317,874	N/A
3649	10	13.4%	3,267,904	45.5%
3649	50	6.8%	773,147	83.3%
3649	250	7.8%	947,293	82.2%
3649-3M	10	4.1%	532,244	91.1%
3649-3M	50	1.6%	102,285	97.8%
3649-TM	50	28.5%	6,199,144	(-34.1%)
3649-TM	250	21.8%	4,182,489	21.4%

Tabla 8. Resumen de los resultados de la depleción de las células B esplénicas. Los anticuerpos 3649, 3649-3M, 3649-TM o R347 control se administraron a ratones hCD19tg+/- siguiendo el protocolo descrito anteriormente. El % de células B transicionales se definió como la fracción de células B CD93+ (ver la Figura 17B para los detalles). El % de depleción se calculó como $100 \times (\text{número de células (anticuerpo control)} - \text{número de células (anticuerpo experimental)}) / \text{número de células (anticuerpo control)}$.

Anticuerpo	Dosis (µg/ratón)	% células B transicionales	Número de células/ animal	% depleción
R347	10	17.4%	1,131,356	N/A
R347	50	18.4%	937,279	N/A
R347	250	17.0%	975,450	N/A
3649	10	11.1%	402,770	64.4%
3649	50	3.0%	24,173	97.4%
3649	250	4.0%	39,299	96.0%
3649-3M	10	7.2%	43,106	96.2%
3649-3M	50	5.2%	5,272	99.4%
3649-TM	50	12.4%	840,608	10.3%
3649-TM	250	10.2%	455,248	53.3%

Tabla 9. Resumen de los resultados de la depleción de las células B T1 esplénicas. Los anticuerpos 3649, 3649-3M, 3649-TM o R347 control se administraron a ratones hCD19tg+/- siguiendo el protocolo descrito anteriormente. Las células B T1 se definieron como la fracción de células B transicionales IgM+, CD23- (ver la Figura 17B para los detalles). El % de depleción se calculó como $100 \times (\text{número de células (anticuerpo control)} - \text{número de células (anticuerpo experimental)}) / \text{número de células (anticuerpo control)}$.

Anticuerpo	Dosis (µg/ratón)	% células B T1	Número de células/animal	% depleción
R347	10	28.8%	335,185	N/A
R347	50	36.0%	332,727	N/A
R347	250	34.6%	367,735	N/A
3649	10	27.2%	107,298	68.0%
3649	50	23.3%	5,845	98.2%
3649	250	30.4%	12,678	96.6%
3649-3M	10	24.2%	10,438	96.9%
3649-3M	50	20.4%	1,168	99.6%
3649-TM	50	29.4%	253,730	23.7%
3649-TM	250	27.3%	125,491	65.9%

Tabla 10. Resumen de resultados de la depleción de las células B T2 esplénicas. Los anticuerpos 3649, 3649-3M, 3649-TM o R347 control se administraron a ratones hCD19tg+/- siguiendo el protocolo descrito anteriormente. Las células B T2 se definieron como la fracción de células B transicionales IgM+, CD23+ (ver la Figura 17B para los detalles). El % de depleción se calculó como $100 \times (\text{número de células (anticuerpo control)} - \text{número de células (anticuerpo experimental)}) / \text{número de células (anticuerpo control)}$.

Anticuerpo	Dosis (µg/ratón)	% células B T2	Número de células/animal	% depleción
R347	10	21.3%	242,018	N/A
R347	50	17.3%	166,575	N/A
R347	250	23.0%	212,106	N/A
3649	10	23.4%	95,554	60.5%
3649	50	18.9%	4,322	97.4%
3649	250	16.6%	6,945	96.7%
3649-3M	10	26.4%	11,368	95.3%
3649-3M	50	10.9%	607	99.6%
3649-TM	50	16.7%	135,944	18.4%
3649-TM	250	21.6%	93,662	55.8%

Tabla 11. Resumen de los resultados de la depleción de las células B T3 esplénicas. Los anticuerpos 3649, 3649-3M, 3649-TM o R347 control se administraron a ratones hCD19tg+/- siguiendo el protocolo descrito anteriormente. Las células B T3 se definieron como la fracción de células B transicionales CD93+, IgM baja, CD23+ (ver la Figura 17B para los detalles). El % de depleción se calculó como $100 \times (\text{número de células (anticuerpo control)} - \text{número de células (anticuerpo experimental)}) / \text{número de células (anticuerpo control)}$. Los números de depleción negativos se usaron cuando el tamaño de una población de células en el animal tratado fue más grande que el tamaño correspondiente en el animal control.

Anticuerpo	Dosis (µg/ratón)	% células B T3	Número de células/ animal	% depleción
R347	10	34.3%	378,181	N/A
R347	50	25.2%	242,767	N/A
R347	250	30.7%	306,514	N/A
3649	10	33.1%	135,097	64.3%
3649	50	25.4%	5,652	97.7%
3649	250	21.1%	8,062	97.4%
3649-3M	10	26.2%	11,148	97.1%
3649-3M	50	9.4%	518	99.8%
3649-TM	50	47.8%	399,685	(-64.6%)
3649-TM	250	37.9%	172,129	43.8%

Tabla 12. Resumen de los resultados de la depleción de las células B maduras esplénicas. Los anticuerpos 3649, 3649-3M, 3649-TM o R347 control se administraron a ratones hCD19tg+/- siguiendo el protocolo descrito anteriormente. Las células B maduras se definieron como la fracción de células B CD93- (ver la Figura 17B para los detalles). El % de depleción se calculó como $100 \times (\text{número de células (anticuerpo control)} - \text{número de células (anticuerpo experimental)}) / \text{número de células (anticuerpo control)}$. Los números de depleción negativos se usaron cuando el tamaño de una población de células en el animal tratado fue más grande que el tamaño correspondiente en el animal control.

Anticuerpo	Dosis (µg/ratón)	% células B maduras	Número de células/ animal	% depleción
R347	10	80.0%	5,175,585	N/A
R347	50	80.7%	3,883,914	N/A
R347	250	82.1%	4,454,167	N/A
3649	10	86.3%	3,042,745	41.2%
3649	50	96.2%	794,477	79.5%
3649	250	94.3%	933,936	79.0%
3649-3M	10	88.7%	532,482	89.7%
3649-3M	50	93.5%	108,806	97.2%
3649-TM	50	87.5%	5,724,882	(-47.4%)
3649-TM	250	87.5%	3,792,089	14.9%

Tabla 13. Resumen de resultados de la depleción de las células B foliculares esplénicas. El anticuerpo 3649, 3649-3M, 3649-TM o R347 control se administró a ratones hCD19tg+/- siguiendo el protocolo descrito anteriormente. Las células B foliculares se definen como la fracción de células B maduras IgM+, CD23+ (ver la Figura 17B para los detalles). El % de depleción se calculó como $100 \times (\text{número de células (anticuerpo control)} - \text{número de células (anticuerpo experimental)}) / \text{número de células (anticuerpo control)}$. Los números de depleción negativos se usan cuando el tamaño de una población de células en el animal tratado fue más grande que el tamaño correspondiente en el animal control.

Anticuerpo	Dosis (µg/ratón)	% células B foliculares	Número de células/ animal	% depleción
R347	10	78.2%	4,053,717	N/A
R347	50	69.3%	2,731,740	N/A
R347	250	74.4%	3,298,335	N/A
3649	10	76.9%	2,345,011	42.2%
3649	50	38.8%	310,160	88.6%
3649	250	45.6%	427,691	87.0%
3649-3M	10	58.2%	306,833	92.4%
3649-3M	50	40.6%	40,611	98.5%
3649-TM	50	79.9%	4,573,294	(-67.4%)
3649-TM	250	81.6%	3,091,310	6.3%

Tabla 14. Resumen de los resultados de la depleción de las células B de la zona marginal esplénica. Los anticuerpos 3649, 3649-3M, 3649-TM o R347 control se administraron a ratones hCD19tg+/- siguiendo el protocolo descrito anteriormente. Las células B de la zona marginal se definieron como la fracción de células B maduras IgM alta, CD23- (ver la Figura 17B para los detalles). El % de depleción se calculó como $100 \times (\text{número de células (anticuerpo control)} - \text{número de células (anticuerpo experimental)}) / \text{número de células (anticuerpo control)}$. Los números de depleción negativos se usaron cuando el tamaño de una población de células en el animal tratado fue mayor que el tamaño correspondiente en el animal control.

Anticuerpo	Dosis (µg/ratón)	% células B de la zona marginal	Número de células/ animal	% depleción
R347	10	10.6%	546,769	N/A
R347	50	14.3%	526,975	N/A
R347	250	19.0%	861,171	N/A
3649	10	10.8%	326,581	40.3%
3649	50	36.9%	291,707	44.6%
3649	250	40.1%	375,834	56.4%
3649-3M	10	20.6%	110,411	79.8%
3649-3M	50	22.0%	26,845	94.9%
3649-TM	50	14.6%	835,215	(-58.54%)
3649-TM	250	7.9%	297,329	65.5%

Tabla 15. Resumen de los resultados de la depleción de las células B de médula ósea. Los anticuerpos 3649, 3649-3M, 3649-TM o R347 control se administraron a ratones hCD19tg+/- siguiendo el protocolo descrito anteriormente. Las células B se definieron como la fracción de linfocitos B220+, CD19 + de ratón (ver la Figura 17C para los detalles). El % de depleción se calculó como $100 \times (\text{número de células (anticuerpo control)} - \text{número de células (anticuerpo experimental)}) / \text{número de células (anticuerpo control)}$.

Anticuerpo	Dosis (µg/ratón)	% células B	Número de células/ animal	% depleción
R347	10	36.5%	1,423,555	N/A
R347	50	23.0%	1,253,562	N/A
R347	250	49.0%	1,638,383	N/A
3649	10	23.9%	828,302	41.8%
3649	50	5.3%	192,629	84.6%
3649	250	15.1%	325,810	80.1%
3649-3M	10	12.2%	380,642	73.3%
3649-3M	50	3.6%	100,271	92.0%
3649-TM	50	28.6%	1,192,432	4.9%
3649-TM	250	59.2%	1,551,662	5.3%

Tabla 16. Resumen de los resultados de la depleción de las células pro-B de médula ósea. Los anticuerpos 3649, 3649-3M, 3649-TM o R347 control se administraron a ratones hCD19tg+/- siguiendo el protocolo descrito anteriormente. Las células pro-B se definieron como la fracción de células B CD43+, IgM- (ver la Figura 17C para los detalles). El % de depleción se calculó como $100 \times (\text{número de células (anticuerpo control)} - \text{número de células (anticuerpo experimental)}) / \text{número de células (anticuerpo control)}$. Los números de depleción negativos se usaron cuando el tamaño de una población de células en el animal tratado fue más grande que el tamaño correspondiente en el animal control.

Anticuerpo	Dosis (µg/ratón)	% células pro-B	Número de células/ animal	% depleción
R347	10	8.0%	106,735	N/A
R347	50	10.8%	135,709	N/A
R347	250	12.9%	298,552	N/A
3649	10	17.6%	143,882	(-34.8%)
3649	50	44.6%	87,312	35.7%
3649	250	59.7%	233,214	21.9%
3649-3M	10	42.2%	160,572	(-50.4%)
3649-3M	50	49.5%	50,159	63.0%
3649-TM	50	9.1%	110,932	18.3%
3649-TM	250	18.9%	298,063	0.2%

Tabla 17. Resumen de los resultados de la depleción de las células pre-B de médula ósea. Los anticuerpos 3649, 3649-3M, 3649-TM o R347 control se administraron a ratones hCD19tg+/- siguiendo el protocolo descrito anteriormente. Las células pre-B se definieron como la fracción de células B CD43-, IgM- (ver la Figura 17C para los detalles). El % de depleción se calculó como 100x (número de células (anticuerpo control) - número de células (anticuerpo experimental)) / número de células (anticuerpo control).

Anticuerpo	Dosis (µg/ratón)	% células pre-B	Número de células/ animal	% depleción
R347	10	54.2%	786,256	N/A
R347	50	53.4%	665,597	N/A
R347	250	44.9%	1,037,445	N/A
3649	10	44.3%	368,091	53.2%
3649	50	44.3%	82,854	87.6%
3649	250	28.7%	112,154	89.2%
3649-3M	10	44.0%	166,139	78.9%
3649-3M	50	43.4%	42,831	93.6%
3649-TM	50	52.5%	618,151	7.1%
3649-TM	250	40.8%	631,574	39.1%

Tabla 18. Resumen de los resultados de la depleción de las células B inmaduras/maduras de la médula ósea. Los anticuerpos 3649, 3649-3M, 3649-TM o R347 control se administraron a ratones hCD19tg+/- siguiendo el protocolo descrito anteriormente. Las células B inmaduras/maduras se definieron como la fracción de células B CD43-, IgM+ (ver la Figura 17C para los detalles). El % de depleción se calculó como 100x (número de células (anticuerpo control) - número de células (anticuerpo experimental)) / número de células (anticuerpo control). Los números de depleción negativos se usaron cuando el tamaño de una población de células en el animal tratado fue más grande que el tamaño correspondiente en el animal control.

Anticuerpo	Dosis (µg/ratón)	% células B inmaduras/maduras	Número de células/ animal	% depleción
R347	10	34.7%	488,578	N/A
R347	50	30.3%	382,746	N/A
R347	250	36.1%	835,327	N/A
3649	10	32.5%	267,869	45.2%
3649	50	7.8%	16,149	95.8%
3649	250	7.4%	27,688	96.7%
3649-3M	10	9.9%	38,723	92.1%
3649-3M	50	4.3%	4,340	98.9%
3649-TM	50	35.0%	421,214	(-10.1%)
3649-TM	250	34.6%	532,935	36.2%

Tabla 19. Resumen de los resultados de la depleción de las células B inmaduras de médula ósea. Los anticuerpos 3649, 3649-3M, 3649-TM o R347 control se administraron a ratones hCD19tg+/- siguiendo el protocolo descrito anteriormente. Las células B inmaduras se definieron como la fracción de células B inmaduras/maduras CD93+ (ver la Figura 17C para los detalles). El % de depleción se calculó como $100 \times (\text{número de células (anticuerpo control)} - \text{número de células (anticuerpo experimental)}) / \text{número de células (anticuerpo control)}$. Los números de depleción negativos se usaron cuando el tamaño de una población de células en el animal tratado fue más grande que el tamaño correspondiente en el animal control.

Anticuerpo	Dosis (µg/ratón)	% células B	Número de células/ animal	% depleción
R347	10	46.4%	230,643	N/A
R347	50	47.6%	181,178	N/A
R347	250	43.9%	183,209	N/A
3649	10	33.2%	89,491	61.2%
3649	50	43.6%	7,542	95.8%
3649	250	18.2%	2,515	98.6%
3649-3M	10	65.6%	24,592	89.3%
3649-3M	50	41.9%	1,780	99.0%
3649-TM	50	39.4%	161,537	10.8%
3649-TM	250	37.1%	204,694	(-11.7%)

Tabla 30. Resumen de los resultados de la depleción de las células B maduras de la médula ósea. Los anticuerpos 3649, 3649-3M, 3649-TM o R347 control se administraron a ratones hCD19tg+/- siguiendo el protocolo descrito anteriormente. Las células B maduras se definen como la fracción de células B inmaduras/maduras CD93 bajo/- (ver la Figura 17C para los detalles). El % de depleción se calculó como $100 \times (\text{número de células (anticuerpo control)} - \text{número de células (anticuerpo experimental)}) / \text{número de células (anticuerpo control)}$. Los números de depleción negativos se usaron cuando el tamaño de una población de células en el animal tratado fue más grande que el tamaño correspondiente en el animal control.

Anticuerpo	Dosis (µg/ratón)	% células B maduras	Número de células/ animal	% depleción
R347	10	52.0%	249,983	N/A
R347	50	41.3%	159,933	N/A
R347	250	49.2%	205,556	N/A
3649	10	63.6%	169,712	32.1%
3649	50	22.6%	3,904	97.6%
3649	250	39.2%	5,435	97.4%
3649-3M	10	31.4%	13,102	94.8%
3649-3M	50	18.7%	802	99.5%
3649-TM	50	58.9%	252,755	(-58.0%)
3649-TM	250	55.8%	290,984	(-41.6%)

Tabla 31. Resumen de los resultados de la depleción de las células B de la cavidad peritoneal. Los anticuerpos 3649, 3649-3M, 3649-TM, HB12B o R347 control se administraron a ratones hCD19tg+/- siguiendo el protocolo descrito anteriormente. Las células B de la cavidad peritoneal se definieron como la fracción de linfocitos peritoneales IgM+ (ver la Figura 17D para los detalles). El % de depleción se calculó como $100 \times (\% \text{ de células B (anticuerpo control)} - \% \text{ de células B (anticuerpo experimental)}) / \% \text{ de células B (anticuerpo control)}$. Los números de depleción negativos se usaron cuando el tamaño de una población de células en el animal tratado fue más grande que el tamaño correspondiente en el animal control.

Anticuerpo	Dosis ($\mu\text{g/ratón}$)	% células B	% depleción
R347	10	25.9%	N/A
R347	50	30.3%	N/A
R347	250	55.6%	N/A
3649	10	16.8%	35.3%
3649	50	20.1%	33.6%
3649	250	35.8%	35.6%
3649-3M	10	15.3%	41.1%
3649-3M	50	13.1%	56.9%
3649-TM	50	26.7%	11.9%
3649-TM	250	56.5%	(-1.65%)
HB12B	50	23.6%	22.0%
HB12B	250	23.3%	58.2%

7.5.1. La densidad CD19 influye en la eficacia de depleción de las células B inducida por el anticuerpo CD19

Para determinar si la capacidad de un anticuerpo anti-CD19 para depletar las células B es dependiente de la densidad de CD19, los anticuerpos anti-CD19 de la invención pueden administrarse a ratones con diferentes niveles de expresión de hCD19. Los resultados obtenidos demostrarán si la densidad de CD19 humano en las células B y el isotipo del anticuerpo pueden influir en la depleción de las células B en presencia de un anticuerpo anti-CD19. El mismo ensayo se puede usar para determinar si otros anticuerpos anti-CD19 pueden depletar efectivamente las células B. Los resultados se pueden correlacionar para el tratamiento de pacientes humanos con diferentes niveles de expresión de CD19. De este modo, los métodos para examinar la presencia y la densidad de CD19, descritos en la presente, pueden usarse en individuos humanos para identificar a los pacientes o poblaciones de pacientes para los que determinados anticuerpos anti-CD19 pueden depletar las células B y/o determinar las dosis adecuadas.

Para determinar si la densidad de CD19 influye en la eficacia de la depleción de las células B inducida por el anticuerpo anti-CD19, puede examinarse la depleción de las células B en el bazo y la sangre representativa en ratones hCD19tg después del tratamiento con los anticuerpos anti-CD19 de la invención (7 días, 250 $\mu\text{g/ratón}$). Los resultados se espera que demuestren que la densidad del CD19 influye en la eficacia de depleción de las células B *in vivo* por los anticuerpos anti-CD19. Por ejemplo, el bajo nivel de expresión de CD19 en los ratones hCD19tg puede esperarse que tenga una marcada influencia en la depleción de las células B circulantes o en el tejido por el anticuerpo administrado. El aclaramiento de las células B se puede evaluar 24 horas después del tratamiento con el AcM anti-CD19 o el control de ratones individuales.

7.5.2. Determinación de si la depleción de las células B del tejido es dependiente del FC γ R-

La administración de un AcM anti-CD19 de la invención debe resultar en la depleción de las células B del tejido, los ensayos siguientes se pueden usar para demostrar la dependencia en la expresión del FC γ R. A través de un proceso de entrecruzamiento de ratones hCD19tg con ratones que carecen de expresión de determinado FC γ R, se pueden generar ratones que expresan hCD19 y pierden la expresión de determinado FC γ R. Los ratones de ese tipo se pueden usar en ensayos para evaluar la capacidad de los anticuerpos anti-CD19 para depletar las células B a través de vías que involucran la expresión del FC γ R, *por ejemplo*, la ADCC. De este modo, los anticuerpos anti-CD19 identificados en estos ensayos se pueden usar para modificar por ingeniería los anticuerpos anti-CD19 quiméricos, humanos o humanizados.

usando las técnicas descritas anteriormente. Los anticuerpos de ese tipo se pueden a su vez usar en las composiciones y métodos de la invención para el tratamiento de trastornos de las células B humanas y las enfermedades que incluyen, pero no se limitan a, las enfermedades y trastornos autoinmunes.

- 5 El sistema inmune innato media la depleción de las células B después del tratamiento con anticuerpos anti-CD20 a través de procesos dependientes del Fc γ R. Las células efectoras de ratón expresan cuatro clases de Fc γ R diferentes para moléculas IgG, Fc γ RI de alta afinidad (CD64), y Fc γ RII de baja afinidad (CD32), Fc γ RIII (CD16), y Fc γ RIV. Los Fc γ RI, Fc γ RIII y Fc γ RIV son complejos hetero-oligoméricos en los que las cadenas α de unión al ligando respectivo se asocian con un cadena γ común (FcR γ). La expresión de la cadena FcR γ se requiere para el ensamblaje del Fc γ R y para desencadenar las funciones efectoras, incluyendo la fagocitosis por los macrófagos. Dado que los ratones FcR $\gamma^{-/-}$ carecen de moléculas Fc γ RI de alta afinidad (CD64) y Fc γ RIII de baja afinidad (CD16) y Fc γ RIV, los ratones FcR $\gamma^{-/-}$ que expresan hCD19 se pueden usar para evaluar el papel de Fc γ R en la depleción de las células B del tejido después del tratamiento con el anticuerpo anti-CD19

15 7.5.3. Durabilidad de la depleción de las células B inducida por el anticuerpo anti-CD19

- Para evaluar la eficacia y duración de la depleción de las células B, a los ratones hCD19tg se les puede administrar una única inyección de dosis baja (*por ejemplo*, 250 μ g) del anticuerpo anti-CD19 y la duración y la dosis respuesta de depleción de las células B se sigue como una función del tiempo. Se espera que los resultados demuestren que las células B circulantes se depletan durante una cantidad sustancial de tiempo (*por ejemplo* una semana a seis meses), seguida por una recuperación gradual de las células B llevadas por la sangre

7.6. Persistencia de CD19 en la superficie de las células B después de la administración del anticuerpo anti-CD19

- 25 Si la internalización del CD19 influirá en la depleción de las células B *in vivo* se puede evaluar comparando la expresión de CD19 en la superficie celular después de la administración de los anticuerpos anti-CD19 de la presente invención. Por ejemplo, la expresión *in vivo* de CD19 en la superficie celular y el aclaramiento de las células B en los ratones hCD19tg tratados con un anticuerpo anti-CD19 de la presente invención o el anticuerpo control de isotipo coincidente (250 μ g) se puede estudiar como una función del tiempo. De este modo, las células del bazo B se pueden cosechar y probar para el CD19 en el tiempo cero (antes de la administración del anti-CD19), y a 1, 4, y 24 horas de la posterior administración del anticuerpo. Las células B aisladas pueden tratarse también *in vitro* con concentraciones saturantes de cada anticuerpo anti-CD19 además del anticuerpo secundario isotipo específico *in vitro* con el análisis de citometría de flujo para visualizar la expresión total de CD19 en la superficie celular. Cuando se mantiene el CD19 en la superficie de las células B, indicará la susceptibilidad constante a la ADCC, la CDC, y la apoptosis. Si el CD19 persiste en la superficie celular después de la unión de un anticuerpo anti-CD19, la célula B seguirá accesible a la ADCC, la CDC, o la actividad apoptótica. Los resultados de ese tipo demostrarían, en parte, por qué los anticuerpos anti-CD19 y los regímenes de tratamiento de la invención serán eficaces en la terapia de suministro para trastornos y enfermedades de las células B humanas que incluyen, pero no se limitan a, el rechazo de trasplantes y las enfermedades y trastornos autoinmunes.

40 7.7. Tratamiento con el anticuerpo anti-CD19 puede anular la inmunidad humoral y autoinmunidad

- En el caso de la terapia con CD19 disminuya la representación de células B, entonces los ensayos descritos en este ejemplo se pueden usar para demostrar que los anticuerpos anti-CD19 de la invención son capaces de eliminar o atenuar la respuesta inmune. Estos ensayos pueden usarse también para identificar otros anticuerpos anti-CD19 que pueden usarse para modificar por ingeniería los anticuerpos anti-CD19 quiméricos, humanos o humanizados usando las técnicas descritas anteriormente. Los anticuerpos de ese tipo pueden usarse a su vez en las composiciones y los métodos de la invención para el tratamiento de las enfermedades y los trastornos autoinmunes en humanos, así como para la terapia de trasplante.

- 50 El efecto de la depleción de las células B inducido por el anticuerpo anti-CD19 sobre los niveles del anticuerpo en el suero se pueden evaluar suministrando a los ratones hCD19tg una única inyección del anticuerpo anti-CD19 y evaluando después la reducción de los niveles de inmunoglobulinas en esos ratones. Por ejemplo, compañeros de camada de dos meses de edad pueden tratarse con una única inyección de un anticuerpo anti-CD19 de la presente invención o un anticuerpo control (*por ejemplo*, 250 μ g) en el día 0. Los niveles de anticuerpos se determinan luego por ELISA. Se espera que los resultados mostraran que después de 1 a 2 semanas, los niveles de anticuerpos de IgM, IgG2b, IgG3, e IgA en el suero se reducen significativamente, y permanecen reducidos durante al menos 10 semanas.

- La influencia de la depleción de las células B en las respuestas de anticuerpos tipo 1 independiente de células T (TI-1) y tipo 2 (TI-2) pueden también evaluarse por la inmunización de ratones hCD19tg con TNP-LPS o DNP-Ficoll (en el día cero), 7 días después del tratamiento con el anticuerpo anti-CD19 o el anticuerpo control. Se espera que no se observen respuestas significativas de anticuerpos IgM IgG e IgA específicas al hapteno en los ratones tratados con el anticuerpo

anti-CD19 inmunizados con cualquier antígeno. Las respuestas de anticuerpos al Ag dependiente de células T (DT), DNP-KLH, pueden evaluarse también usando ratones tratados con anticuerpos anti-CD19 7 días antes de la inmunización, donde se espera que los ratones inmunizados con DNP-KLH tratados con anticuerpo anti-CD19 mostrarán inmunidad humoral reducida.

7.8. Tratamiento con el anticuerpo anti-CD19 junto con el tratamiento con el anticuerpo anti-CD22

El ensayo descrito en la presente se puede usar para determinar si las terapias de combinación, *por ejemplo*, los anticuerpos anti-CD19 en combinación con la quimioterapia, la terapia con toxina o la radioterapia, tienen efectos beneficiosos, tales como una depleción de las células B aditiva o más que aditiva. Los resultados de las terapias de combinación probadas en modelos animales pueden correlacionarse con los humanos por medios bien conocidos en la materia.

Los anticuerpos anti-CD20 son eficaces en la depleción *in vivo* de las células B humanas y de ratón. Por lo tanto, el beneficio del tratamiento simultáneo con un anticuerpo anti-CD19 de la presente invención y los anticuerpos anti CD20 (*por ejemplo*, MB20-11; ver, Yazawa y otros, Proc Natl Acad Sci Estados Unidos. 102 (42) :15178-83 (2005)) pueden evaluarse para determinar si esto aumentará la depleción de las células B. Los ratones se pueden tratar con dosis subóptimas (*por ejemplo*, 2 µg, 5 µg, 10 µg, 20 µg, o 50 µg) de cada anticuerpo ya sea individualmente o como una combinación de ambos anticuerpos. Se espera que los resultados demuestren que los tratamientos simultáneos con los anticuerpos anti-CD19 y anti-CD20 son beneficiosos. De una manera similar, la eficacia puede determinarse para el tratamiento con una combinación de un anticuerpo anti-CD19 de la presente invención con un anticuerpo anti-CD22, o una combinación de un anticuerpo anti-CD19 de la presente invención, un anticuerpo anti-CD20, y un anticuerpo anti-CD22.

7.9. Eficacia terapéutica de la administración subcutánea (s.c.) de un anticuerpo anti-CD19 de la invención

El ensayo descrito en la presente puede usarse para determinar si una vía de administración subcutánea de un anticuerpo anti-CD19 de la invención puede depletar efectivamente las células B. Los resultados de la eficacia de las diferentes vías de entrega probadas en modelos animales se pueden correlacionar con los humanos por medios bien conocidos en la materia.

Por ejemplo, los ratones hCD19tg se pueden tratar con un anticuerpo anti-CD19 de la invención a 250 µg, ya sea por administración subcutánea (s.c.), intraperitoneal (i.p.) o intravenosa (i.v.). Los valores se determinan para la media de los números de células B, B220 + (±SEM) en la sangre (por ml), en la médula ósea, el bazo, el ganglio linfático y la cavidad peritoneal en siete días según se evalúa usando la citometría de flujo. Los resultados se esperan que demuestren que la administración subcutánea (s.c.), intraperitoneal (i.p.) e intravenosa (i.v.) de un anticuerpo anti-CD19 de la invención efectivamente depletarán *in vivo* las células B del tejido y las circulantes.

La presente invención no está limitada en el alcance por las modalidades específicas descritas en la presente. De hecho, diversas modificaciones de la invención, además de aquellas descritas serán evidentes para aquellos con experiencia en la materia a partir de la descripción anterior y las figuras que se acompañan. Se pretende que esas modificaciones caigan dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

7.10. Anticuerpos anti-CD19 reducen el crecimiento tumoral en un modelo *in vivo* de linfoma

Los anticuerpos anti-CD19 de la invención, que se unen al CD19 humano, pueden evaluarse por su capacidad para reducir el crecimiento tumoral en modelos animales *in vivo*. Por ejemplo, los ratones SCID se inyectarían con líneas celulares de linfoma humano para establecer un xenoinjerto de tumor (*por ejemplo*, inyección s.c. de células Raji). Posteriormente, a los ratones se les darían varias dosis de un anticuerpo anti-CD19 de la invención (*por ejemplo*, 5 veces 100 µg de anticuerpo/ratón). Al crecimiento tumoral se le realizaría un seguimiento usando métodos estándares (*por ejemplo*, volumen del tumor, peso del animal, parálisis). El efecto del tratamiento con el anti-CD19 sobre el crecimiento tumoral puede determinarse comparando los animales que reciben el tratamiento con el anticuerpo anti-CD19 o control. Los resultados obtenidos usando los anticuerpos anti-CD19 identificados como capaces de reducir el crecimiento tumoral pueden correlacionarse con el uso en humanos, y los anticuerpos capaces de reducir el crecimiento tumoral pueden usarse en las composiciones y métodos de la invención para el tratamiento de los trastornos y las enfermedades de las células B humanas, que incluyen, pero no se limitan a, los tumores malignos de célula B.

Para determinar si la capacidad del anticuerpo anti-CD19 para reducir el crecimiento tumoral depende de la densidad de CD19, líneas de células tumorales con diferentes perfiles de expresión de CD19 pueden probarse en el ensayo de crecimiento tumoral *in vivo* descrito anteriormente. Por ejemplo, todas las células Daudi, Raji, Namalwa, y Ramos tienen niveles significativos de CD19 en su superficie celular; por otro lado la línea celular de mieloma múltiple RPMI 8226 no

expresa CD19. Los resultados obtenidos pueden demostrar si la densidad de CD19 humano en la superficie celular tumoral puede influir en el crecimiento tumoral reduciendo la actividad de un anticuerpo anti-CD19. Los resultados se pueden correlacionar con el tratamiento de pacientes humanos con niveles diversos de expresión de CD19. De este modo, los métodos para examinar la presencia y densidad CD19, descritos en la presente, pueden usarse en individuos humanos para identificar a los pacientes o poblaciones de pacientes para los que determinados anticuerpos anti-CD19 pueden reducir el crecimiento de las células B malignas y/o para determinar las dosis adecuadas.

Para determinar si la capacidad del anticuerpo anti-CD19 para reducir el crecimiento tumoral depende de FcγR, el ensayo de crecimiento tumoral *in vivo* descrito anteriormente se realizaría usando ratones SCID con la actividad del receptor Fcγ comprometida (por ejemplo, FcRγ^{-/-}). A través de un proceso de entrecruzamiento de ratones SCID con ratones que carecen de la expresión de determinado FcγR, pueden generarse ratones SCID que también carecen de la expresión de determinado FcγR (por ejemplo, ratones SCID, FcRγ^{-/-}). Los ratones de ese tipo pueden usarse en ensayos para evaluar la capacidad de los anticuerpos anti-CD19 para reducir el crecimiento tumoral a través de vías que involucran la expresión del FcγR, por ejemplo, la ADCC. Basado en los resultados, los anticuerpos anti-CD19 con la ADCC aumentada pueden modificarse por ingeniería usando las técnicas descritas anteriormente. Esos anticuerpos pueden a su vez usarse en las composiciones y los métodos de la invención para el tratamiento de trastornos y enfermedades de las células B humanas que incluyen, pero no se limitan a, los tumores malignos de células B.

A continuación están los detalles de los experimentos que demuestran la capacidad del anticuerpo anti-CD19 humanizado para reducir el crecimiento tumoral en un modelo animal *in vivo*. En el día 1 del experimento, ratones SCID CB-17 hembras de 4-6 semanas de edad se inyectaron s.c. con 5×10^6 células Raji de linfoma humano en su flanco posterior. Las células Raji expresaban niveles significativos de CD19 en su superficie y eran sensibles a la ADCC dirigida por el 3649 (ver las Figuras 7 y 8). Los grupos de 10 animales inyectados con células Raji se trataron con un anticuerpo anti-CD19 humanizado, anticuerpo control anti-CD20, anticuerpo control de isotipo de especificidad irrelevante. Múltiples diferentes dosis de un anticuerpo pueden probarse juntas. Un ejemplo no limitativo para el esquema de tratamiento fue de 5 dosis i.p. cada dos semanas de 10 mg/kg de anticuerpo comenzando en el día 4. También se incluyó un grupo de animales control adicional que recibió PBS sólo. El volumen del tumor se midió usando métodos estándares. Los animales con volumen del tumor superior a 2000 mm³ o con signos de morbilidad se sacrificaron humanitariamente. El crecimiento tumoral se representó en el tiempo.

En el experimento resumido en la Figura 13, diez animales inyectados con las células Raji se trataron todos con 5 dosis i.p. cada dos semanas con 10 mg/kg de (i) anticuerpo anti-CD20, (ii) la variante de Fc 3649-TM con la ADCC reducida, (iii) anticuerpo 3649, o (iv) anticuerpo control R347 comenzando en el día 4. Un grupo control adicional de 10 animales recibieron sólo PBS. El tratamiento con el anticuerpo anti-CD19 3649 y el anticuerpo control positivo anti-CD20 redujo significativamente el crecimiento tumoral. La desviación estándar en el tamaño del tumor para los grupos que recibieron el anticuerpo 3649 o el anti-CD20 aumentó con el tiempo debido a la presencia de individuos completamente libres de tumor en ambos grupos de tratamiento. La variante de Fc 3649-TM no tuvo un efecto significativo sobre el crecimiento del tumor, sugiriendo que el efecto de reducción del crecimiento tumoral del anticuerpo anti-CD 19 humanizado 3649 es mediado a través de la ADCC.

En el experimento resumido en la Figura 14, diez animales inyectados con células Raji se trataron con 5 dosis i.p. cada dos semanas de (i) anticuerpo anti-CD20 a 10 mg/kg (anti-CD20), (ii) variante de Fc 3649-TM con la ADCC reducida a 10 mg/kg (3649TM), (iii) anticuerpo 3649 a 10 mg/kg (3649), (iv) anticuerpo 3649 a 2.5 mg/kg (3649*) o (v) anticuerpo control R347 a 10 mg/kg comenzando en el día 4. El tratamiento con el anticuerpo anti-CD19 3649, el anticuerpo anti-CD-19 3649-3M humano con ADCC aumentada y el anticuerpo anti-CD20 de control positivo redujeron significativamente el crecimiento tumoral. La variante de Fc del anticuerpo anti-CD19 3649-TM no tuvo un efecto significativo sobre el crecimiento del tumor, sugiriendo que el efecto de reducción del crecimiento tumoral del 3649 es mediado a través de la ADCC.

En el experimento resumido en la Figura 30, diez animales inyectados con células Raji se trataron con 5 dosis i.p. cada dos semanas de (i) anticuerpo anti-CD20 a 10 mg/kg (anti-CD20), (ii) anticuerpo 3649 a 10 mg/kg (3649), (iii) anticuerpo 3649 afucosilado a 2.5 ó 10 mg/kg (3649-afuc) o (iv) anticuerpo control R347 a 10 mg/kg comenzando en el día 4. El tratamiento con el anticuerpo anti-CD19 3649, el anticuerpo anti-CD-19 3649-afuc y el anticuerpo anti-CD20 control positivo redujeron significativamente el crecimiento tumoral.

7.11. Anticuerpos anti-CD 19 3649 de madurados por afinidad

Las secciones siguientes describen la identificación de las variantes de CDR del anticuerpo anti-CD19 3649 madurado por afinidad que muestran una afinidad de unión aumentada hacia el antígeno CD19 humano presentado en la superficie celular en comparación con el anticuerpo original anti-CD19 3649. La sección describe también la caracterización *in vitro* de los anticuerpos anti-CD19 madurados por afinidad.

7.11.1. Identificación de anticuerpos de la variante 3649 madurados por afinidad

Los anticuerpos anti-CD19 de la variante 3649 se identificaron por la selección de genotecas de fragmentos Fab que comprenden las variantes de las secuencias de las CDR (ver, la publicación de la solicitud de patente de los Estados Unidos núm. 2006/0121042; Wu, H., *Methods Mol Biol.*, 207:197-212 (2003); Wu y Un, *Methods Mol Biol* 207:213-33 (2003). ; Wu y otros, *J. Mol Biol.*, 350:126-144 (2005); Wu y otros, *Proc Natl Acad Sci Estados Unidos* 95:6037-6042 (1998)).

Reactivos: Todos los productos químicos fueron de grado analítico. Las enzimas de restricción, enzimas de modificación del ADN, T4 ligasa y ADN-polimerasa T7 se adquirieron de New England Biolabs, Inc. (Beverly, Massachusetts). Los oligonucleótidos hechos por encargo se sintetizaron por Operon (Huntsville, Alabama). Las perlas magnéticas de estreptavidina se adquirieron de Dynal (Lake Success, Nueva York).

Construcción del vector de expresión de fago del Fab 3649: Los polinucleótidos que codifican los dominios VH y VK del anticuerpo anti-CD19 3649 se clonaron dentro de un vector de expresión de fago basado en M13 que facilita la expresión de los fragmentos Fab bajo el control del promotor *lacZ* (Dall'Acqua y otros., *Methods* 36:43-60 (2005)). El vector comprende la primera región constante de la cadena pesada de $\gamma 1$ humana, el dominio constante de una cadena ligera kappa humana (κ) y dos sitios de hibridación para la clonación de los genes VH y VK. La clonación se llevó a cabo por mutagénesis de hibridación (Kunkel y otros, *Proc Natl Acad Sci Estados Unidos* 82: 4778-82 (1985)) como se describe en Wu y An, *Methods Mol Biol*, 207:213-33 (2003). En resumen, los polinucleótidos que codifican la región VH y VK de 3649 se amplificaron usando aproximadamente 0.5 pmol de cada uno de los cebadores de oligonucleótidos específicos para los genes siguientes: 3649 VH Fab Fw (sec. con núm. de ident.: 128), 3649 VH Fab Rev (sec. con núm. de ident.: 129), 3649 VK Fab Fw (sec. con núm. de ident.: 130), y 3649 VK Fab Rev (sec. con núm. de ident.: 131) (ver Tabla 32). La secuencia de nucleótidos 5' de cada cebador comprende secuencias específicas del vector M13 para permitir la hibridación entre los productos de la PCR y el vector de cadena simple. La secuencia de nucleótidos de los cebadores 3649 VH Fab Fw (sec. con núm. de ident.: 128) y 3649 VK Fab Fw (sec. con núm. de ident.: 130) comprende una secuencia de nucleótidos 28/25, respectivamente, correspondiente a la secuencia líder del gen 3 de M13. La secuencia de nucleótidos 5' de los cebadores 3649 VH Fab Rev (sec. con núm. de ident.: 129) y 3649 VK Fab Rev (sec. con núm. de ident.: 131) comprende una secuencia de nucleótidos 28/30 correspondiente a la primera región constante de la cadena pesada $\gamma 1$ humana y el dominio constante de una cadena ligera kappa humana (κ), respectivamente. Los cebadores directos 3649 VH Fab Fw (sec. con núm. de ident.: 128) y 3649 VK Fab Fw (sec. con núm. de ident.: 130) se biotinilaron para ayudar al aislamiento de la cadena negativa de los fragmentos de la PCR. Los polinucleótidos que codifican los genes 3649 VH y VK se amplificaron por PCR a partir de las correspondientes construcciones de expresión de la IgG1 3649 descritos anteriormente usando las combinaciones de cebadores 3649 VH Fab Fw (sec. con núm. de ident.: 128)/3649 VH Fab Rev (Sec. con núm. de ident.: 129) y 3649 VK Fab Fw (sec. con núm. de ident.: 130)/3649 VK Fab Rev (sec. con núm. de ident.: 131), respectivamente. Los productos de la PCR se purificaron por electroforesis/electroelución en gel de agarosa, y posteriormente se fosforilaron usando T4 polinucleótido quinasa (Roche). La cadena negativa de los fragmentos de la PCR se aisló por la disociación del producto de la PCR de doble cadena con hidróxido de sodio, la depleción de la cadena más biotinilada por medio del uso de perlas magnéticas recubiertas con estreptavidina, y se recuperaron las cadenas negativas por precipitación con etanol. Las cantidades equimolares de la cadena negativa aislada de los fragmentos de la PCR de VH y VK se hibridaron con el molde M13 MD101-5A uridinilado de simple cadena, y se trataron con T4 ADN polimerasa (Roche), T4 ADN ligasa (Roche) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las secuencias de nucleótidos específicas de M13 incorporadas en los polinucleótidos de cadena negativa aisladas de VH y VK específicamente hibridaron con dos regiones separadas del ADN del vector M13, cada uno de los cuales contenía un lazo palindrómico que comprendía un sitio de reconocimiento para la endonucleasa de restricción XbaI. Debido a que los lazos palindrómicos auto hibridaban incluso en presencia de secuencias hibridadas de VH o VK, los complejos de ADN se trataron con digestión con XbaI de las hibridadas, la ADN T4 polimerasa/ ADN T4 ligasa lo que permitió la selección de las cadenas negativas del vector recién sintetizadas que comprendían tanto los dominios VH y VK fusionados en el marco con las regiones constantes kappa κ humana y la primera constante humana $\gamma 1$, respectivamente, a expensas de la cadena positiva del molde parental digerido. El producto de reacción se digirió con XbaI, se inactivó por calor y se electroporó dentro de las células DH10B. Las células transformadas DH10B se titularon en placas bacterianas con un césped de *Escherichia coli* XL-1 Blue. El ADN de fago aislado de varias placas independientes se secuenció para ayudar a la identificación de un clon que codifica el fragmento Fab 3649.

Tabla 32. Cebadores de la PCR usados para generar los polinucleótidos que codifican los 3649 VH y VK usados para la mutagénesis por hibridación. Los residuos específicos de 3649 se subrayan.

Nombre		Sec. con núm. de ident.
3649 VH M13 Fw	<u>GCTGGTGGTGCCGTTCTATAGCCATAGCGAG</u> <u>GTGCAGCTGGTGGAGTCTGG</u>	128
3649 VH M13 Rev	<u>GGAAGACCGATGGGCCCTTGGTGGAGGCTGA</u> <u>GGAGACGGTGACCAGGGTTCCTTG</u>	129
3649 VK M13 Fw	<u>GGTCGTTCCATTTTACTCCCACTCCGAAATTG</u> <u>TGCTGACTCAGTCTCCAGACTTTCAG</u>	130

Generación de genotecas de Fab orientadas a un único CDR: Dos genotecas separadas de sustituciones de aminoácidos únicos se prepararon para cada una de las seis regiones de las CDR del anticuerpo 3649. Las genotecas "NSS" comprendían todas las variantes posibles de aminoácidos únicos sustituidos de una CDR dada donde el aminoácido sustituto es cualquiera de los ocho aminoácidos codificados por el codón degenerado NSS. Las genotecas "NWS" comprendían todas las variantes posibles de aminoácidos únicos sustituidos de una CDR dada donde el aminoácido sustituto es cualquiera de los doce aminoácidos codificados por el codón degenerado NWS. Las genotecas individuales se prepararon por mutagénesis de hibridación del vector fago que codifica el Fab 3649 descrito anteriormente (Kunkel y otros, Proc Natl Acad Sci Estados Unidos 82: 4778-82 (1985); Wu y An, Methods Mol Biol., 207: 213-33 (2003)). En resumen, dos conjuntos de oligonucleótidos degenerados de cadena negativa se prepararon para cada uno de las seis CDR. Los conjuntos "NSS" y "NWS" comprendieron todas las posibles sustituciones de codones únicos de una región CDR con los codones degenerados NSS y NWS, respectivamente. Los conjuntos de oligonucleótidos usados para la preparación de las genotecas orientadas en la CDR1 de la cadena pesada se enumeran como un ejemplo en la Tabla 33. Cada oligonucleótido degenerado de cadena negativa se fosforiló antes de hibridar a una proporción molar de 10:1 con un ADN molde del fago Fab 3649 de cadena única uridinilada. La temperatura de la reacción de hibridación se redujo de 95 °C a 55 °C durante 1 hora. La T7 ADN polimerasa y la T4 ligasa se adicionaron al material hibridado y se incubaron durante 1.5 horas a 37 °C. Los productos finales de la síntesis de la cadena negativa obtenidos usando oligonucleótidos diferentes de un conjunto específico de CDR único se combinaron; las mezclas NSS y NWS, sin embargo, se mantuvieron por separado y se seleccionaron de forma independiente. Típicamente, un µl de la reacción de síntesis de la cadena negativa mezclada se electroporó en XL1-Blue para la formación de la placa sobre el césped bacteriano de XL1-Blue. Los clones de fagos individual se eluyeron con 200µl de tampón de 10 mM de Tris (pH 7.4), 100 mM de NaCl y se almacenaron a 4 °C. La genoteca se caracterizó por la secuenciación de 24 clones de fagos seleccionados de manera aleatoria para determinar la distribución de las mutaciones dentro de la CDR, así como para calcular la velocidad de mutagénesis.

Tabla 33. Oligonucleótidos usados para la generación de genotecas orientadas a la CDR1 de cadena pesada 3649. Los codones NSS y NWS que comprenden oligonucleótidos se usaron para la generación de las genotecas "NSS" y "NWS" separadas. Los nucleótidos que codifican los residuos de la CDR se subrayaron.

Nombre		Sec. con núm. de ident.
HCDR1/NSS1	GCCTGGCGGACCC<u>ASSNCATCCAAGAGCT</u>ACTG AAGGTGAATCCAG	132
HCDR1/NSS2	GCCTGGCGGACCCAG<u>TTSSNCCAAGAGCT</u>ACTGA AAGGTGAATCCAG	133
HCDR1/NSS3	GCCTGGCGGACCCAG<u>TTTCATSSNAGAGCT</u>ACTGA AAGGTGAATCCAG	134
HCDR1/NSS4	GCCTGGCGGACCCAG<u>TTTCATCCASSNGCT</u>ACTGA AAGGTGAATCCAG	135
HCDR1/NSS5	GCCTGGCGGACCCAG<u>TTTCATCCAAGASSN</u>ACTGA AAGGTGAATCCAG	136
HCDR1/NWS1	GCCTGGCGGACCCAW<u>SNCATCCAAGAGCT</u>ACTG	137
HCDR1/NWS2	GCCTGGCGGACCCAG<u>TTWSNCCAAGAGCT</u>ACTG AAGGTGAATCCAG	138
HCDR1/NWS3	GCCTGGCGGACCCAG<u>TTTCATWSNAGAGCT</u>ACTG AAGGTGAATCCAG	139
HCDR1/NWS4	GCCTGGCGGACCCAG<u>TTTCATCCAWSNGCT</u>ACTG AAGGTGAATCCAG	140
HCDR1/NWS5	GCCTGGCGGACCCAG<u>TTTCATCCAAGAWSN</u>ACTG AAGGTGAATCCAG	141

Selección primaria de genotecas Fab orientadas a CDR únicos: La selección primaria consistió en un ELISA de punto único (SPE) realizado usando el sobrenadante que contenía el Fab secretado de 1 ml del cultivo de fagos y las células 300B4 que expresaban el CD19 humano recombinante como agente de captura. Una selección exhaustiva de una genoteca se puede normalmente lograr probando un número de clones individuales igual a tres veces el tamaño de la genoteca teniendo en cuenta la velocidad de mutagénesis. Por ejemplo, el agotamiento de una genoteca de sustitución "NSS" de VH CDR1 (residuos de 5 aminoácidos) (8 aminoácidos posibles codificados por el codón degenerado NSS) con una velocidad de mutagénesis 50% puede lograrse por la selección aleatoria de $5 \times 8 \times 2 = 80$ clones individuales. En el experimento descrito en la presente ~ 400 clones se seleccionaron, sin embargo, para cada genoteca independientemente de la longitud de la CDR, o la eficiencia de síntesis. Los sobrenadantes de cultivos de fago a

pequeña escala se aislaron como se describe en Wu y An, *Methods Mol Biol.*, 207:213-33 (2003). En resumen, 0.75 ml de células TG1 creciendo exponencialmente se inocularon con 75 µl del concentrado de fago eluido en presencia de 0.5 mM de IPTG y se incubaron a 37 °C durante 1 h en placas de 96 pocillos. Los cultivos de las placas se movieron a temperatura ambiente y se cultivaron durante toda la noche en un agitador orbital. Las bacterias de 0.36 ml de los cultivos de toda la noche se recogieron por filtración a través de una membrana de nylon de unión baja a proteína (por ejemplo Silent screen plate de Nalgene) y se trataron sobre el filtro con 200 µl de tampón TES (30 mM de Tris pH 8.0, 2 mM de EDTA, sacarosa al 20%) con 2 mg/ml de lisozima durante 10 minutos a temperatura ambiente para liberar el Fab secretado del espacio periplásmico. El fragmento Fab que contenía los extractos se recogieron por filtración. La concentración del fragmento Fab en el extracto se determinó usando ensayos estándares. El ELISA basado en las células 300B4 se realizó como se describió *arriba*. El Fab 3649 original que expresaba el clon del fago se incluyó en los ensayos ELISA basados en células como un control positivo. La afinidad de unión relativa de los fragmentos de la variante Fab se comparó por la representación de la señal de ELISA frente a la concentración del Fab. Por ejemplo, la Figura 18 muestra los resultados obtenidos con los Fab de la variante 3649 que comprendían una sustitución aleatoria de aminoácido único dentro de la VH CDR3. Los Fab 4B7 y 4G6 mostraron afinidad de unión aumentada significativamente a las células 300B4 que expresaban el CD19 humano en comparación con el Fab 3649 parental.

Selección secundaria de las genotecas de Fab orientadas a CDR únicos: los clones Fab de la variante CDR con una señal de ELISA de la selección primaria de al menos 10% superior que aquella de los Fab 3649 parental se volvieron a crecer a una escala de 15 ml, y se volvieron a probar por el mismo ELISA basado en las células 300B4 en pocillos duplicados para confirmar el resultado positivo. Los extractos del Fab a la escala de 15 ml se prepararon siguiendo el protocolo descrito en Wu, H., *Methods Mol.*, 207:197-212 (2003). La concentración del Fab se determinó usando ensayos estándares. El ELISA basado en las células 300B4 se realizó como se describió *arriba*. El Fab 3649 original se incluyó en el ensayo como un control positivo. Los clones con una señal de selección secundaria de al menos 10% superior que aquella del control del Fab 3649 se secuenciaron para determinar la identidad de las sustituciones de aminoácidos únicos que conducían a la unión aumentada al antígeno CD19 humano. Las sustituciones de aminoácidos identificadas por la secuenciación de los clones aislados del Fab anti-CD19 con afinidad mejorada se enumeran en la Tabla 34.

Tabla 34. Lista de las sustituciones únicas de aminoácidos beneficiosas a partir de las genotecas de Fab orientadas a las CDR. Las posiciones de los aminoácidos se numeran de acuerdo con Kabat.

	Clon	Sustitución	Posición		Clon	Sustitución	Posición
VH CDR1	2A11	Ser>Thr	32	VL CDR1	8A10	Asp>Ile	27C
	1H1	Trp>Glu	33		9D11	Thr>His	27D
	5H12	Trp>Leu	33		2B8	Ile>Leu	30
	1AB	Asn>Phe	35		1C10	Met>Arg	33
	1C5	Asn>Tyr	35		1H10	Met>Thr	33
	3C3	Asn>Asp	35		12E3	Met>Ile	33
	6H6	Asn>Leu	35				
VH CDR2	3A11	Thr>Ser	57	VL CDR2	10D3	Ala>Tyr	50
	4G8	Thr>Pro	57		10G4	Ala>Glu	50
	3E9	Thr>Asn	57		2C12	Gln>Thr	54
	4D4	Asn>Leu	60		4F10	Gln>Pro	54
	5A11	Asn>Tyr	60		9B10	Gly>Tyr	55
	2H11	Gly>Ala	61				
VH CDR3	4B7	Leu>Arg	100B	VL CDR3	2F7	Ser>Thr	91
	7E3	Leu>His	100B		GE10	Phe>Ile	96
	12E3	Leu>Phe	100B		2C12	Phe>Asn	96
	7H11	Leu>Tyr	100B				
	11G12	Thr>Pro	99				

Generación de la genoteca de Fab combinatoria: Dos genotecas combinatorias que comprenden todas las combinaciones posibles de sustituciones beneficiosas de aminoácido único identificadas a partir de las genotecas orientadas a la CDR se generaron por mutagénesis de hibridación. La primera genoteca combinatoria se generó usando un conjunto de oligonucleótidos degenerados que codificaban tanto a los residuos parentales 3649 así como las sustituciones beneficiosas identificadas de aminoácidos únicos (Tabla 35). Una segunda genoteca combinatoria se generó usando un conjunto separado de oligonucleótidos degenerados que codificaban sólo los residuos de sustitución más beneficiosos de aminoácidos únicos, pero no los residuos parentales de 3649 (Tabla 36). Las dos genotecas se generaron y se seleccionaron por separado. La generación de la genoteca se hizo como se describe en Wu, H., Methods Mol Biol., 207:197-212 (2003); Wu y An, Methods Mol., 207:213-33 (2003). En resumen, los conjuntos de cebadores degenerados se sintetizaron y se fosforilaron. La mutagénesis de hibridación se realizó mediante el uso de todos los cebadores en una reacción de hibridación y síntesis única. La generación, las pruebas y la selección de la genoteca, se realizaron como se describió *arriba*. El perfil de ELISA de los seis clones Fab combinatorios con la más alta afinidad de unión para las células 300B4 que expresaban el CD19 humano recombinante se mostró en la Figura 19. El clon 7E12 se recuperó de la primera genoteca combinatoria generada con oligonucleótidos degenerados de codificación tanto de los residuos originales como de los de sustitución beneficiosa de la CDR. Los clones 14H5, 15D7, 15D1, 16C9, y 16C4 se recuperaron de la segunda genoteca combinatoria generada con oligonucleótidos degenerados que codificaban sólo los residuos de sustitución más beneficiosa de la CDR. Todos los clones de fago enumerados en la Figura 19 se secuenciaron para determinar la secuencia de aminoácidos de las regiones de la variante de la CDR con afinidad de unión mejorada a CD19 humano.

Tabla 35. Oligonucleótidos redundantes para la generación de una genoteca de fagos combinatoria. El conjunto de oligonucleótidos enumerado en la presente descripción codifican para los dos residuos parentales y los residuos de sustitución beneficiosos identificados a partir de las genotecas de sustituciones únicas orientadas a la CDR.

Nombre		Sec. con núm. de ident.
H1CDR1H	CTGGCGGACCCAGTHCATCMAAGWGCTACTGA AGGTGAATCC	142
H2CDR1HP3E	CTGGCGGACCCAGTHCATCTCAGWGCTACTGA AGGTGAATCC	143
H3CDR1HP3WP4L	CTGGCGGACCCAGAGCATCMAAGWGCTACTGA AGGTGAATCC	144
H4CDR1HP3EP4L	CTGGCGGACCCAGAGCATCTCAGWGCTACTGA AGGTGAATCC	145

	Nombre		Sec. con núm. de ident.
	H5CDR2H	CTGCCCTTGAACCTCSCATWGTTAGDATCT CCATCTCCAG	146
5	H6CDR2HP9N	CTGCCCTTGAACCTCSCATWGTTATTATCTC CATCTCCAG	147
	H7CDR2HP12L	CTGCCCTTGAACCTCSCAAGGTAGTTAGDATCT CCATCTCCAG	148
10	H8CHR2HP9N,P12L	CTGCCCTTGAACCTCSCAAGGTAGTTATTATCTC CATCTCCAG	149
15	H9CDR3HP8H/Y	CCCAGTAGTCAAAGTCGTRAACCGTAGKAATA AATCCTGATCTAGC	150
	H10CDR3HP8F	CCCAGTAGTCAAAGTCSAAAACCGTAGKAATA AATCCTGATCTAGC	151
20	H11CDR3HP8R	CCCAGTAGTCAAAGTCTCGAACCGTAGKAATA AATCCTGATCTAGC	152
25	L12aCDR1Lp7Ip8H	CTGCTGGAACCAGTTYVTAAAACTAAKGCCAA AATGAATAACACTTTCGCTGGC	153
	L13aCDR1Lp8H	CTGCTGGAACCAGTTYVTAAAACTAAKGCCAA AATGATCAACACTTTCGCTGGC	154
30	L14aCDR1Lp7I	CTGCTGGAACCAGTTYVTAAAACTAAKGCCAA AAGTAATAACACTTTCGCTGGC	155
35	L15aCDR1Lp11p14	CTGCTGGAACCAGTTYVTAAAACTAAKGCCAA AAGTATCAACACTTTCGCTGGC	156
	L16CDR2Lp1Y	GGGGACCCCGGATCCTTGATTGGATGCATAATG GATGAGGAGCTTTGG	157
40	L17CDR2Lp1Yp6Y	GGGGACCCCGGAGTATTGATTGGATGCATAATG GATGAGGAGCTTTGG	158
45	L8CDR2Lp1Yp5T/P	GGGGACCCCGGATCCTGKATTGGATGCATAATG GATGAGGAGCTTTGG	159
	L19CDR2Lp1E/A	GGGGACCCCGGATCCTTGATTGGATGCCKCATG GATGAGGAGCTTTGG	160
50	L20CDR2Lp1E/Ap6Y	GGGGACCCCGGAGTATTGATTGGATGCCKCATG GATGAGGAGCTTTGG	161
55	L21CDR2Lp1E/Ap5T/ P	GGGGACCCCGGATCCTGKATTGGATGCCKCATG GATGAGGAGCTTTGG	162
	L22CDR3Lp3T/Sp8F/ T	CTCCGCCGAACGTGAWTGGAACCTCCTTAGWT TGCTGACAGTAATACG	163

L23CDR3Lp3T/Sp8N	CTCCGCCGAACGTGTTTGGAACCTCCTTAGWTT GCTGACAGTAATACG	164
------------------	--	-----

5

Tabla 36. Oligonucleótidos redundantes para la generación de una genoteca de fagos combinatoria. El conjunto de oligonucleótidos enumerado en la presente descripción codifica solamente los residuos de sustitución más beneficiosos identificados a partir de las genotecas de sustituciones únicas orientadas a la CDR.

10

15

20

25

30

Nombre		Sec. con núm. de ident.
L24CDR1Lp7Ionly	AACTAATGCCAAAaGTAatAACACTTTCGCTGG CTCTG	165
L25CDR1Lp7Ip9Honly	CATAAACTAATGCCAAAatgAatAACACTTTC GCTGGCTCTGCAGG	166
L26CDR1Lp8Honly	CCAGTTCATAAACTAATGCCAAAatgATCAA CACTTTCGCTGGCTC	167
L27CDR2Lp1Eonly	GGATCCTTGATTGGATGCctCATGGATGAGGA GCTTTGG	168
L28CDR3Lp8I/Nonly	GTCCCTCCGCCGAACGTGwtTGGAACCTCCTT ACTTTGC	169
H29CDR1Hp3Eonly	CCTGGCGGACCCAGTTCATCtcAGAGCTACTG AAGGTGAATCC	170
H30CDR1Hp3Ep5Yonly	CCTGGCGGACCCAGTaCATCtcAGAGCTACTG AAGGTGAATCC	171
H31CDR1Hp5Yonly	CCTGGCGGACCCAGTaCATCCAAGAGCTACTG AAGGTGAATCC	172
H32CDR2Hp13Aonly	GAATCTGCCCTTGAACCTCgCATTGTAGTTAG TATCTCCATC	173
H33CDR3Hp8Ronly	CTTGGCCCCAGTAGTCAAAGTCTcgAACCGTA GTAATAAATCCTG	174
H34CDR3Hp8R/Honly	CTTGGCCCCAGTAGTCAAAGTCgygAACCGTA GTAATAAATCCTG	175

7.11.2. Caracterización de anticuerpos anti-CD19 de la variante de afinidad aumentada

5 Los polinucleótidos que codifican las regiones variables de las variantes de Fab 7E12, 14H5, 15D7, 15D1, 16C9 y 16C4 con actividad de unión anti-CD19 mejorada se amplificaron por PCR a partir de los correspondientes vectores de fago M13 que codifican la región V usando la *Pfu* ADN polimerasa (ver, Dall'Acqua y otros., Methods 36:43-60 (2005)). Los polinucleótidos se clonaron después individualmente en vectores de expresión de mamíferos que codifican un potenciador temprano inmediato principal de citomegalovirus humano (hCMVie), el promotor y una región 5' sin traducir.

10 (M. Boshart y otros., Cell 41:521-530 (1985)). En este sistema, una cadena humana γ 1 se secretó junto con una cadena κ humana (S. Johnson, y otros., Infect. Dis. 176:1215-1224 (1997)). Las diferentes construcciones se expresaron transitoriamente en células HEK-293 y se cosecharon 72 y 144 horas posteriores a la transfección. Las IgG1 humanas secretadas, solubles se purificaron de medios condicionados directamente usando 1 ml de columnas de proteína A HiTrap según las instrucciones del fabricante (APBiotec, Inc., Piscataway, New Jersey). Las IgG1 humanas purificadas

15 (típicamente homogeneidad > 95%, según se calculó por SDS-PAGE) se dializaron frente a tampón fosfato salino (PBS), se congelaron rápido y se almacenaron a -70 °C.

7.11.2.1. Ensayos ELISA basados en células

20 La capacidad de los anticuerpos IgG 7E12, 14H5, 15D7, 15D1, 16C9 y 16C4 para unirse al CD19 humano se evaluó en unos ensayos de unión a CD19 basados en células. Tres líneas celulares diferentes se usaron como reactivos de captura: (i) células 300B4 que expresaban CD19 recombinante humano (Figura 20.), (ii) células Raji (Figura 21.), y (iii) células Daudi (Figura 22). Las tres líneas de células se cultivaron de acuerdo con protocolos estándares. Un procedimiento estándar de ELISA se usó para el ensayo de unión a CD19 basado en células. Por ejemplo, pocillos individuales de una placa de fondo en U de 96 pocillos se sembraron con 1×10^5 células 300B4 y se incubaron durante toda la noche. Las células se lavaron una vez con tampón ELISA antes de la incubación en hielo con diversas cantidades de anticuerpos anti-CD19. Las reacciones de unión se realizaron por triplicado para cada concentración de los anticuerpos probados. Los pocillos de control positivo usando el anticuerpo anti-CD19 3649 se incluyeron en el ensayo. Después de la incubación con el anticuerpo, las células 300B4 se lavaron tres veces con 200 microlitros de tampón de ELISA. Los anticuerpos anti-CD19 unidos a la superficie celular se detectaron usando un anticuerpo anti-kappa humano en carnero conjugado con peroxidasa de rábano picante de acuerdo con los protocolos estándares.

Las curvas de unión del ELISA de los anticuerpos IgG anti-CD19 3649, 7E12, 14H5 y 15D7 y 15D1, 16C9 y 16C4 usando células 300B4, células Raji, o células Daudi como reactivos de captura se muestran en las Figuras 20-22. Todos los anticuerpos probados excepto para 16C9 y 15D1 mostraron afinidad de unión significativamente superior para el CD19 humano presentado en la superficie celular, que los anticuerpos control 3649. La afinidad de unión de 16C9 y 15D1 coincidió con la del anticuerpo 3649 cuando las células 300B4 se usaron como reactivo de captura. La afinidad de unión al CD19 humano de los anticuerpos 16C9 y 15D1 fue superior que aquella del anticuerpo control 3649 cuando las células Raji o células Daudi se usaron como reactivos de captura.

7.11.2.2. Variantes del anticuerpo 14H5 anti-CD19 con sitio de desamidación modificado

La secuencia primaria de aminoácidos de los anticuerpos 3649, 7E12, 14H5, 15D7, y 16C9 comprende un motivo de desamidación NG (residuos 60-61 de la CDR2 de VH). Tres variantes de desamidación negativas de 14H5 se generaron por el cambio del residuo asparagina (N) por tirosina (Y), ácido aspártico (D), o leucina (L) en la posición 60 de Kabat. Las regiones VH de la variante 14H5 que comprendían Y60, D60 y L60 se designaron como 14H5-YG (sec. con núm. de ident.: 107), 14H5-DG (sec. con núm. de ident. 108), y 14H5-LG (sec. con núm. de ident.: 109), respectivamente. Los vectores de expresión de los anticuerpos que comprenden polinucleótidos que codifican las variantes 14H5 de desamidación negativas se generaron usando técnicas estándares de clonación molecular. La IgG anti-CD19 expresada transitoriamente 14H5-YG, 14H5-DG, y 14H5-LG se purificó como se describió anteriormente. La afinidad de unión de los anticuerpos 14H5-YG, 14H5-DG, y 14H5-LG se determinó usando un ensayo ELISA basado en células que utilizó las células 300B4 que expresaban el CD 10 recombinante humano como un reactivo de captura. Los anticuerpos anti-CD10 14H5 y 16C4 se emplearon como controles positivos. Los resultados obtenidos se presentaron en la Figura 23. La afinidad de unión de los anticuerpos 14H5-YG, 14H5-DG, y 14H5-LG a las células 300B4 que expresaban el CD19 humano recombinante fue inferior que aquella de cualquiera de los anticuerpos 14H5 o 16C4.

7.11.2.3. Cinética de disociación de los anticuerpos anti-CD19 madurados por afinidad

La cinética de disociación de los anticuerpos IgG anti-CD19 7E12, 14H5, 15D7, 15D1, 16C9 y 16C4 se determinó por el seguimiento durante el tiempo de la eliminación de los anticuerpos anti-CD19 unidos a la superficie celular. En resumen, las células Ramos se incubaron con el anticuerpo anti-CD19 madurado por afinidad 7E12, 14H5, 15D7, 15D1, 16C9 o

16C4 siguiendo protocolos estándares de tinción. Las células se lavaron a continuación de la incubación para eliminar cualquier anticuerpo primario no unido y se incubaron además a 37 °C durante 0, 30, o 60 minutos. Al final del período de incubación, las células se tiñeron con el reactivo secundario anti-IgG del fragmento Fc humano en ratón conjugado con EPR siguiendo protocolos estándares y se analizaron en un citómetro de flujo. Los lotes de control de las células se incubaron con el anticuerpo anti-CD19 3649 o un anticuerpo anti-CD20 control de referencia antes de la incubación a 37 °C. La intensidad de fluorescencia media en diversos intervalos de tiempo que usan los diferentes anticuerpos se muestra en la Figura 24A. El 100% de la intensidad de fluorescencia media correspondió a la intensidad de la tinción observada en el tiempo 0 con un anticuerpo dado.

La pérdida de la intensidad de fluorescencia media observada con los anticuerpos anti-CD19 madurados por afinidad 7E12, 14H5, 15D7, 15D1, 16C9, y 16C4 fue menor que aquella observada con el anticuerpo control de referencia anti-CD20. En contraste, las células Ramos teñidas con el anticuerpo anti-CD19 3649 mostraron una pérdida más rápida de la intensidad de fluorescencia media que las células teñidas con el anticuerpo control de referencia anti-CD20 (Figura 24A).

En un experimento separado, las células Ramos se tiñeron con un anticuerpo 16C4, 3649, o HB12B anti-CD19 conjugado con Alexa 647 siguiendo los protocolos estándares. A continuación de la tinción, las células se lavaron para eliminar el anticuerpo no unido y se incubaron además a 37 °C durante 0, 30, o 60 minutos. Las células se analizaron posteriormente en un citómetro de flujo. Un anticuerpo anti-CD20 conjugado fluorescentemente se incluyó en el experimento como un control de referencia. La intensidad de fluorescencia media (MFI) que se observó en diversos intervalos de tiempo se muestra en la Figura 24B. La MFI se expresó como una fracción del valor de MFI observada en el tiempo 0. La pérdida de MFI detectada con el anticuerpo 16C4 anti-CD19 madurado por afinidad fue significativamente más lenta que la pérdida de MFI observada con los anticuerpos 3649 o HB12B anti-CD19. El anticuerpo control de referencia anti-CD20 mostró la misma cinética de disociación como los anticuerpos 3649 y HB12B anti-CD19.

7.11.2.4. Tinción de la superficie celular por los anticuerpos anti-CD19 madurados por afinidad

Las células Daudi se inmunotiñeron con los anticuerpos 7E12, 14H5, 15D7, 15D1, 16C9 y 16C4 anti-CD19 y un reactivo secundario anti-fragmento (Fab') 2 de IgG humana en carnero conjugado con RPE de acuerdo con protocolos estándares. Las células inmunoteñidas se analizaron en un citómetro de flujo. La intensidad de fluorescencia media (MFI) de las células teñidas en diferentes concentraciones de anticuerpos primarios se representa en la Figura 25. Las células teñidas con el anticuerpo anti-CD19 3649 se incluyeron como control de referencia. La intensidad de la tinción detectada con los anticuerpos 7E12, 14H5, 15D7, 16C9, 16C4 anti-CD19 fue superior que aquellas de las células teñidas con el anticuerpo 3649 en todas las concentraciones probadas. La intensidad de la tinción detectada con el 15D1 fue similar a la intensidad de la tinción detectada con el anticuerpo 3649 a bajas concentraciones de anticuerpo (0.5 mg/ml o inferior). La MFI de las células teñidas con el 15D1 fue superior, sin embargo, que aquella de las células teñidas con el anticuerpo 3649 en concentraciones elevadas del anticuerpo (1 mg/ml o superior).

7.11.2.5. Actividad ADCC *in vitro* de los anticuerpos anti-CD19 madurados por afinidad

La actividad ADCC *in vitro*, de los anticuerpos anti-CD19 madurados por afinidad se midió usando los ensayos descritos en la presente. Por ejemplo, los resultados obtenidos con los anticuerpos 16C4, 14H5 y 14H5-DG usando células Daudi diana se presentan en la Figura 26. El anticuerpo 3549 anti-CD19 se usó como un control de referencia. Los tres anticuerpos de madurados por afinidad mostraron actividad ADCC aumentada en concentraciones de anticuerpos de 0.1 mg/ml o menor en comparación con el anticuerpo 3649 control de referencia. La actividad ADCC de los anticuerpos 16C4, 14H5, 14H5-DG coincidió con la actividad del anticuerpo 3649 a 1 mg/ml o concentraciones superiores de los anticuerpos.

La actividad ADCC *In vitro* de los anticuerpos anti-CD19 afucosilados madurados por afinidad se midió también usando los ensayos descritos en la presente. Por ejemplo, la ADCC mediada por el anticuerpo 16C4 afucosilado (16C4-aFuc) se midió usando células Daudi diana (Figura 26). Los experimentos incluyeron también anticuerpos 16C4, 3649-aFuc, y anti-CD20 como controles de referencia. La ADCC de 16C4-aFuc fue significativamente superior que aquella de los anticuerpos 3649-aFuc, anti-CD20, o fucosilado de referencia 16C4. La ADCC mediada por el 16C4-aFuc fue comparable con aquella de los anticuerpos.

La actividad ADCC *in vitro* de los anticuerpos 16C4, 16C4-aFuc y 3649 aFuc anti-CD19 se caracterizó adicionalmente en un ensayo estandarizado de ADCC *in vitro* usando una variedad de células diana. Un anticuerpo anti-CD20 se incluyó en el ensayo como un control. Las células diana usadas representaron una variedad de tumores malignos de células B, así como diferentes densidades del CD19 en la superficie celular (Tabla 37). La expresión relativa de CD19 y CD20 en la superficie de las células diana se determinó por citometría de flujo siguiendo protocolos estándares. En la Tabla 37 se enumera la intensidad de fluorescencia media (MFI) de las células diana teñidas con los anticuerpos anti-CD20 o anti-

CD19 16C4 marcados fluorescentemente. Las reacciones de ADCC se realizaron siguiendo los protocolos descritos anteriormente. Las reacciones se prepararon por triplicado usando 50,000 células efectoras y 20,000 células diana para lograr una relación E:T de 2.5:1. Las células NK transgénicas que expresaban CD16 y polipéptidos de señalización asociados al FC ϵ RI- γ sirvieron como células efectoras. Las reacciones de ADCC se dejaron proceder durante 4 horas a 37°C. La actividad ADCC se determinó a concentraciones diferentes de los anticuerpos. Los datos se representaron cómo el % de citotoxicidad como una función de la concentración del anticuerpo. La muerte celular máxima y los valores de EC50 (concentraciones de anticuerpos requeridas para la mitad de la citotoxicidad en las condiciones usadas) se establecieron para células diana/combinaciones de anticuerpos usando métodos estándares. En la Tabla 37 se presentaron los resultados finales. Las células Oci-LY 19, Karpas-422, Nalm-6, y Namalwa que representaban DLGG, NHL, ALL, y linfoma de Burkitt, respectivamente, fueron sensibles a la citotoxicidad mediada por el anticuerpo 16C4-afuc pero en gran medida no sensibles al ADCC mediado con anti-CD20. Las células Daudi, Toledo, RL y Raji fueron significativamente más sensibles a la citotoxicidad mediada por el anticuerpo 16C4-aduc que a la ADCC mediada por el anti-CD20.

Tabla 37. Evaluación cuantitativa de la ADCC mediada por el anticuerpo anti-CD19, 16C4, 16c4-afuc y 3649-afuc. MFI a 1 μ g/ml: intensidad de fluorescencia media de las células teñidas con 1 μ g/ml de anticuerpo fluorescentemente marcado; ADCC EC50: concentración de anticuerpo que produce la mitad de la muerte máxima bajo las condiciones usadas; % máximo de muerte celular a 10 μ g/ml: máxima muerte de las células diana alcanzada con 10 μ g/ml de anticuerpo en el ensayo ADCC bajo las condiciones usadas.

		anti-CD20	16C4	anti-CD20		16C4-aFuc		3649-aFuc		16C4	
		MFI a 1 μ g/ml	MFI a 1 μ g/ml	ADCC EC50 (ng/ml)	% máximo muerte celular a 10 μ g/ml	ADCC EC50 (ng/ml)	% máximo muerte celular a 10 μ g/ml	ADCC EC50 (ng/ml)	% máximo muerte celular a 10 μ g/ml	ADCC EC50 (ng/ml)	% máximo muerte celular a 10 μ g/ml
Líneas celulares diana	Daudi (Burkitt)	253	161	0.041	51	0.0031	50	0.0576	51	0.0576	16
	Granta-519 (NHL/MCL)	403	75	0.0663	34	n.d.	6	n.d.	9	n.d.	0
	Toledo (DLCL)	312	472	0.0319	55	0.0075	48	0.0155	53	0.0545	12
	Oci-LY19 (DLCL)	12	258	n.d.	4	0.0163	47	0.0518	54	n.d.	6
	Karpas-422 (NHL)	45	53	n.d.	5	0.0181	62	0.0442	64	n.d.	6
	Farage (DLCL)	581	226	0.0113	54	0.0141	48	0.0536	48	0.0927	13
	Nalm-6 (ALL)	26	448	n.d.	14	0.0199	35	0.0605	39	n.d.	17
	Karpas-1106P	102	66	0.0137	71	0.009	59	0.0142	59	0.533	16
	DB (DLCL)	70	61	0.2399	46	n.d.	34	n.d.	42	n.d.	6
	RL (NHL)	261	344	0.0296	56	0.0073	45	0.0194	46	0.0393	15
	Raji (Burkitt)	422	823	0.008	40	0.003	43	0.009	44	0.012	26
	Namalwa (burkitt)	664	298	n.d.	7	0.012	23	0.04	25	n.d.	4

7.11.2.6. Depleción *in vivo* de las células B por los anticuerpos anti-CD19 madurados por afinidad

Los anticuerpos anti-CD19 madurados por afinidad se probaron en un ensayo de depleción de células B esencialmente como se describió anteriormente. Los animales C57B16 hCD19 tg +/- se trataron con una única dosis i.v. de 10, 50, o 250 µg del anticuerpo anti-CD19 16C4 de madurados por afinidad (16C4) o el anticuerpo anti-CD19 14H5DG madurados por afinidad (14H5DG). Los animales control de referencia se trataron con (i) anticuerpo anti-CD19 3649 (3649), (ii) anticuerpo anti-CD19 3649 variante de Fc de ADCC aumentada (3649 3M), y (iii) anticuerpo anti-CD19 3649 afucosilado (3649 -afuc). Los animales control negativo se trataron con (i) anticuerpo anti-CD19 3649 variante de Fc de ADCC comprometida (3649 TM) o (ii) un anticuerpo de especificidad irrelevante (R347). Los linfocitos circulantes y linfocitos esplénicos se aislaron 7 días después del tratamiento con el anticuerpo. Las células aisladas se inmunotifieron como se describió en la Tabla 5 para identificar diversas poblaciones de células B. Las muestras se analizaron en un citómetro de flujo siguiendo los protocolos estándares.

El anticuerpo anti-CD19 16C4 madurado por afinidad logró una depleción de células B ligeramente superior que el anticuerpo parental anti-CD193649. Los anticuerpos 3649-afuc y 3649 3M lograron una mejor depleción que el anticuerpo 16C4 madurados por afinidad. El anticuerpo anti-CD19 14H5DG madurados por afinidad fue menos eficiente en la depleción de las células B que el anticuerpo anti-CD193649 parental.

7.11.2.7. Recuperación a largo plazo de linfocitos B a continuación de la administración de una dosis de depleción única de anticuerpos anti-CD19 madurado por afinidad

La recuperación a largo plazo del compartimiento de las células B se estudió a continuación de la administración de una dosis depletante única del anticuerpo monoclonal anti-CD1916C4-afuc. Veinticinco ratones C57B16 hCD19 tg +/- (13 machos, 12 hembras, de 2.5-3 meses de edad) se dividieron en 5 grupos. Una semana antes de administrar los anticuerpos experimentales (semana -1) los animales se examinaron para la salud general, se pesaron y una pequeña alícuota de la sangre se recogió de cada uno de ellos para análisis. En el día 0 del experimento 250 µg del AcM 16C4-afuc, 50 µg del AcM 16C4-afuc, 10 µg del AcM 16C4-afuc, 250µg del anticuerpo de control R347 de especificidad irrelevante, o PBS se administraron por vía intravenosa a los animales en los grupos 1, 2, 3, 4 y 5, respectivamente. En el día 7 (semana 1), y en intervalos de una semana después, los ratones en cada grupo se examinaron y se tomaron muestras de sangre. Las muestras de sangre se sometieron a citometría de flujo para determinar los números de células B, células T, células NK T, neutrófilos, monocitos y células dendríticas. Las muestras de sangre se analizaron además para determinar la concentración en el suero de IgM, IgG1, IgG2b, IgG2c, IgG3, IgA, IgM anti-ADNdc, IgG anti-ADNdc, IgM anti-ADNsc, IgG anti-ADNsc, así como los niveles en el suero de IL-7, CXCL12, CXCL13 y BAFF. Las mediciones se realizaron siguiendo los procedimientos estándar. El esquema del experimento y los resultados obtenidos se presentaron en la Figura 38.

Ningún efecto adverso obvio se observó a continuación del tratamiento del fármaco. Los animales en todos los grupos experimentales mantuvieron niveles de actividad y peso normal (Figura 38B). Los niveles de células B de los animales que recibieron el anticuerpo anti-CD19 16C4-afuc fueron significativamente inferior que aquellos de los animales control (Figura 38C y D). La depleción de las células B fue completa, incluso en los animales que reciben 10 µg de 16C4-afuc. La duración de la depleción de células B fue dependiente de la dosis; la duración de la depleción aumentó con la dosis superior del anticuerpo 16C4-afuc. Las células B en los animales que recibieron 10 µg de 16C4-afuc comenzaron a recuperarse en la semana 3 y alcanzaron los niveles normales en la semana 5. La recuperación de los animales que recibieron 50 µg de 16C4-afuc tomó 9 semanas. Los animales que recibieron 250 µg de 16C4-afuc estuvieron todavía casi completamente sin células B en la semana 11 del experimento. Las concentraciones en la sangre de las células T, las células NK-T, las células NK, las células dendríticas, los neutrófilos y los monocitos no se afectaron por el anticuerpo 16C4-afuc (datos no presentados). Los niveles en el suero de IgM, IgG1 e IgG2b se redujeron también por el tratamiento con el anticuerpo 16C4-afuc (Figuras 38E-G). La reducción en los niveles de inmunoglobulinas fue sensible a la dosis; sólo se observó reducción significativa en los niveles en los animales tratados con 50 o 250 µg del anticuerpo 16C4-afuc. La recuperación en los niveles de inmunoglobulinas mayormente sigue la recuperación del compartimiento de células B.

7.11.2.8. Análisis IEF-PAGE de los anticuerpos anti-CD19

El análisis nativo de electroforesis en gel de poliacrilamida por isoelectroque (IEF-PAGE) se realizó en los anticuerpos anti-CD19 16C4, 16C9, 7E12, 14H5, 15D7, 15D1, 14H5-DG y 3649 siguiendo protocolos estándares. Los geles prefabricados de anfolinas (Amersham Biosciences, intervalo de pI 3.5 a 9.5) se cargaron con 8 µg de proteína purificada. Las muestras de proteína se dializaron en tampón 10 mM de Histidina pH 6.0 antes de cargar en el gel. Los estándar de marcadores de pI de amplio intervalo (pI intervalo 3-10, 8 µl, Amersham) se usaron para determinar los valores relativos de pI. La electroforesis se realizó a 1500 V, 50 mA durante 105 minutos. El gel se fijó durante 45 minutos y se tiñó durante toda la noche a temperatura ambiente usando tinte Azul Simple (Invitrogen). El destefido se

llevó a cabo con una solución de etanol al 25%, ácido acético al 8 %. Los puntos isoelectrónicos se determinaron usando un Densitómetro Bio-Rad GS-800 con software Quantity One Imaging. El gel teñido con Coomassie se muestra en la Figura 27. El punto isoelectrónico de los anticuerpos 16C4, 16C9, 7E12, 14H5, 15D7, 15D1, DG-14H5, y 3649 fue 7.83, 8.04, 7.69, 7.76, 7.61, 7.72, 7.48, y 7.75, respectivamente.

7.11.3 Anticuerpos anti-CD19 de la variante de Fc madurados por afinidad

Los vectores de expresión del anticuerpo que codifican un anticuerpo de la variante de Fc 16C4 que comprende las sustituciones de aminoácidos L234F/L235F/P331S o L234F/L235Y/P331S (en lo sucesivo referidos como "16C4-235F" o "16C4-235Y") se generaron usando los métodos descritos en US2004/0132101 y US2005/0054832, ambos de Lazar y otros. En resumen, el vector de expresión del anticuerpo que codifica 16C4 se modificó usando un kit de mutagénesis dirigida a un sitio (*por ejemplo*, QuickChange (Promega)) por la introducción de las sustituciones necesarias de los residuos de nucleótidos dentro de la secuencia del polinucleótido que codifica la región constante de la cadena pesada para generar el vector de expresión del anticuerpo 16C4-235F o 16C4-235Y. El anticuerpo 16C4 de la variante de Fc purificado se generó por la transfección de las células HEK293F con el vector de expresión del anticuerpo adecuado. Las células transfectadas se alimentaron en el día 3 y 6 y el medio condicionado que contenía el anticuerpo se cosechó en el día 9. El anticuerpo se purificó a partir del medio condicionado usando una columna de proteína A pre-fabricada (GE Healthcare). El anticuerpo se eluyó de la columna con tampón de pH bajo, se neutralizó, y se dializó frente a PBS. La concentración del anticuerpo purificado se calculó a partir de la densidad óptica de la solución a 280 nm.

La medición de las constantes de equilibrio de unión (K_D): Las constantes de equilibrio de unión de todos los receptores $Fc\gamma$ ($Fc\gamma RI$, $Fc\gamma RIIA$, $Fc\gamma RIIB$, $Fc\gamma RIIA-V158$ humanos, así como $Fc\gamma RIIB$, $Fc\gamma RIIB$ y $Fc\gamma RIV$ murinos) para 16C4 y sus variantes de Fc se midieron en un instrumento BIAcore 3000 (Uppsala, Suecia). En resumen, todas las IgG se inmovilizaron en celdas de flujo separadas de dos chips sensores CM5 usando la química de acoplamiento amino estándar como se recomienda por el fabricante. Los niveles de IgG inmovilizadas con intervalo de 8194 a 8725 RU. Se prepararon las soluciones concentradas de los dominios extracelulares expresados recombinantemente de todos los $Fc\gamma R$ en cualquiera de 4000 ó 16000 nM y después se diluyeron en serie hacia abajo hasta las concentraciones deseadas usando el tampón del instrumento (50 mM de tampón HBS que contenía 0.01 M de HEPES, pH 7.4, 0.15 M de NaCl, 3 mM de EDTA y P-20 al 0.005%). Las inyecciones duplicadas de cada concentración de $Fc\gamma R$ se inyectaron luego sobre todas las superficies de IgG a una velocidad de flujo de 5 μ l/min. Los datos de la unión se recogieron durante aproximadamente 50 minutos, seguido por un pulso de 30 segundos de 5mM de HCl entre las inyecciones para regenerar las superficies de IgG. Varias inyecciones de tampón se intercalaron también durante toda la serie de la inyección. Una de estas inyecciones de tampón se usó junto con los datos de referencia de las células para corregir los conjuntos de datos sin procesar. Después que se recogieron todos los datos de unión, los conjuntos de datos individuales se promediaron para cada concentración γ y, después, se ajustó una isoterma de unión 1:1 de la cual se obtuvieron las constantes de equilibrio de unión, K_D . Esto se llevó a cabo usando el software de evaluación BIA, v 4.1. Los valores K_D (nM) se presentan en la Tabla 38.

Tabla 38. Afinidades de unión (K_D , nM) de varias IgG1 humanas al $Fc\gamma R$ humano y de ratón.

	16C4	16C4-235F	16C4-235Y
$Fc\gamma RI$ humano	19	1530	8650
$Fc\gamma RIIA$ humano	1280	6360	6980
$Fc\gamma RIIB$ humano	14500	6810	17100
$Fc\gamma RIIA (V158)$ humano	574	4610	5140
$Fc\gamma RIIB$ de ratón	1470	2820	2670
$Fc\gamma RIV$ de ratón	329	11100	N/A
$Fc\gamma RIIB$ de ratón	6360	10900	9240

7.12. Aislamiento de las variantes del anticuerpo anti-CD19/16C4 madurado por afinidad

Las variantes del anticuerpo 16C4 madurado por afinidad se identificaron usando los protocolos descritos en la presente. La selección consistió de dos etapas. La primera etapa se enfocó en la identificación de los Fab de la variante 16C4 que comprendía la sustitución de aminoácido único que resultó en anticuerpos con la actividad de unión aumentada mostraban el por el CD19 humano en la superficie celular. Los Fab de la variante 16C4 que comprendían una única

sustitución beneficiosa de aminoácido se identificaron a través de la selección de genotecas de presentación en fagos orientadas a CDR únicas. La segunda etapa de la selección consistió de la selección de una genoteca combinatoria de clones Fab que representaban todas las combinaciones posibles de sustituciones beneficiosas de aminoácido único identificados ya sea (i) en la primera etapa del proceso de maduración de la afinidad de 16C4 o (ii) durante el proceso de maduración de la afinidad del anticuerpo anti-CD193649.

Las genotecas de presentación en fagos de CDR específicas se generaron como se describió anteriormente. Las genotecas se seleccionaron probando un gran número de clones de fago (aproximadamente 400 clones por genoteca) en el ensayo de unión basado en células de punto único (Lu y otros, J. Immunol. Methods 314:74-79 (2006)). Los reactivos y materiales desechables se adquirieron de Meso Scale Discovery, los ensayos se realizaron siguiendo las instrucciones del fabricante. En resumen, 5,000 células Raji o 300B4/pocillo se sembraron y se incubaron durante 1 hora a RT en 25 µl de PBS 1X; los pocillos se bloquearon con 25 µl de SFB al 30% durante 20 min a RT; el sobrenadante se desechó; se adicionaron 25 µl de Ac anti-CD19 en cada pocillo y se incubaron durante 1 hora a RT; los pocillos se lavaron 3 veces con PBS 1X, se adicionaron 25 µl de 0.25 µg/ml de anti- Fab'-MSDTag humano en carnero a cada pocillo y se incubaron durante 1 hora a RT; se lavaron los pocillos 3 veces con PBS 1X; la señal se leyó con 150 µl de tampón T de lectura 1X. La curva de unión de un clon representativo que comprende una sustitución beneficiosa de aminoácido en la CDR2 de la VH se muestra en la Figura 32. Las sustituciones beneficiosas de aminoácidos únicos identificados a partir de las genotecas específicas de la CDR de 16C4 se enumeran en la Tabla 39.

Tabla 39. Sustituciones beneficiosas de aminoácidos únicos identificados a partir de las genotecas de presentación en fago específicas de la CDR basada en el anticuerpo 16C4.

	Clon	Sustitución	Posición
VH CDR1	17B7	Ser>Val	32
VH CDR2	64D4	Pro>Leu	52A
VL CDR2	40A5	Gln>Arg	54
	40C10	Gln>Thr	54
	43A10	Gln>Ala	54
VL CDR3	2F7	Gln>Ala	89

Las genotecas combinatorias de presentación de fago se prepararon como se describió anteriormente. Los oligonucleótidos específicos de Fab 16C4 usados para la generación de genotecas se enumeran en la Tabla 40. Los clones Fab individuales de la genoteca combinatoria se probaron para la unión a células 300B4 y Raji (Lu y otros., J. Immunol. Methods 314:74-79 (2006)). Las curvas de unión de los clones Fab representativos se muestran en la Figura 33A-B. Los clones Fab con la actividad de unión aumentada a las células 300B4, células Raji, o ambas se secuenciaron usando métodos estándares. Un resumen de los cambios de aminoácidos que se encuentran en las secuencias CDR de los clones Fab únicos se presenta en la Figura 33C.

Tabla 40. Oligonucleótidos redundantes para la generación de una genoteca combinatoria de fagos.

	Nombre		Sec. con núm. de ident.
5	L35 CDR2L p5T/R	GGACCCCGGATCCTSTATTGGATGCCTCATGG	176
	L36 CDR2L L36 CDR2L p5T/R,p6Y	CCTCGAGGGGACCCCGGAGTATSTATTGGAT GCCTCATGGATG	177
	L37 CDR2L p5A/P	GGACCCCGGATCCTGSATTGGATGCCTCATGG	178
	L38 CDR2L p5A/P,p6Y	CCTCGAGGGGACCCCGGAGTATGSATTGGAT GCCTCATGGATG	179
10	L39 CDR3L p3S/T,p8N/I	CTCCGCCGAACGTGWTGGAACCTCCTTAGW TTGCTGACAGTAATACG	180
	L40 CDR3L p1A/P, p3S/T,5R	CGCCGAACGTGAATGGAACCCGCTTAGWTTG CG CACAGTAATACGTTGCAGC	181
	L41 CDR3L p3S/T,p5R	CGCCGAACGTGAATGGAACCCGCTTAGWTTG CTGACAGTAATACGTTG	182
15	L42 CDR3L p1A/P, p3S/T,p8N/I	CTCCGCCGAACGTGWTGGAACCTCCTTAGW TTGCGCACAGTAATACGTTGC	183
	H43 CDR1H p2V	CCTGGCGGACCCAGTTCATCCAAACGCTACT GAAGGTGAATCC	184
	H44 CDR1H p2V,p3W/L, p5N/Y	GCCTGGCGGACCCAGTWCATCMAAACGCTA CTGAAGGTGAATC	185
20	H45 CDR1H p2V,p3W/L, p5L	GAGCCTGGCGGACCCAGAGCATCMAAACGCT ACTGAAGGTGAATC	186
	H46 CDR2H p4L/P, p9T/N,p12N/Y	CTTGAACTTCACATWGTAGTTAKTATCTCCAT CTCCARGATAAATCCGGCCA	187
25	H47 CDR2H p4L/P, p9T/N	CTTGAACTTCACATTGTAGTTAKTATCTCCAT CTCCARGATAAATCCGGCCA	188
	H48 CDR2H p4L/P, p12N/Y	CTTGAACTTCACATWGTAGTTAGTATCTCCAT CTCCARGATAAATCCGGCCA	189
30	H49 CDR3H p5P/T	GTCAAAGTCGCGAACCGTAGKAATAAATCCT GATCTAGC	190

Seis clones Fab de la variante 16C4 de madurada por afinidad con actividad de unión mejorada por el antígeno CD19 humano presentado en la superficie celular, se transformaron en anticuerpos IgG1 completos usando los métodos descritos en la presente. La actividad de unión de los anticuerpos anti-CD19 madurados por afinidad 3C3, 6F7, 2B11, 6C11, 9G7, y 5C4 se caracterizaron en diversos ensayos basados en células. En la Figura 34 se presentan los resultados obtenidos usando las células 300.B4 en un ensayo ECL basado en células (Lu y otros., J. Immunol. Methods 314:74-79 (2006)). La actividad de unión de los anticuerpos de la variante 16C4 madurados por afinidad fue superior que aquella del control de anticuerpos 16C4 o 3649.

Tinción de la superficie celular por anticuerpos anti-CD19 madurados por afinidad. Las células Daudi y Raji se inmunotifieron con los anticuerpos 3C3, 6C11, y 9G7 anti-CD19 y un reactivo secundario anti-fragmento (Fab') 2 de IgG humana en carnero conjugada con RPE de acuerdo a los protocolos estándares. Las células inmunoteñidas se analizaron en un citómetro de flujo. La intensidad de fluorescencia media (MFI) de las células teñidas en diferentes concentraciones de anticuerpos primarios se representa en la Figura 35. Las células teñidas con el anticuerpo anti-CD19 16C4 se incluyeron como control de referencia. La intensidad de la tinción detectada con los anticuerpos 3C3 y 6C11 madurados por afinidad en células Raji a la concentración de anticuerpo 0.0625-0.25 µg/ml fue superior que aquella detectada con el control 16C4. La intensidad de la tinción de las células Raji de los anticuerpos madurados por afinidad y control fue la misma a la concentración de anticuerpo 0.5-10 µg/ml. La tinción de células Raji por el anticuerpo 9G7 fue similar al anticuerpo control a concentraciones de anticuerpos inferiores (0.0625-0.25 µg/ml) y más débil que el control a las concentraciones de anticuerpos superiores (0.5-10 µg/ml). La mediana FI de las células Daudi teñidas por 9G7 y 6C11 fue superior que aquellas de las células teñidas por 16C4. La mediana FI de las células Daudi teñidas por 3C3 fue superior que las células control a la concentración de anticuerpos 0.0625 y 0.125 µg/ml, y sustancialmente la misma que aquella de las células control a concentración de anticuerpo 0.25-10 µg/ml.

Actividad ADCC *in vitro* de anticuerpos anti-CD19 de la variante 16C4 madurados por afinidad. La actividad ADCC *in vitro*, de los anticuerpos anti-CD19 madurados por afinidad se midió usando los ensayos descritos en la presente. Por ejemplo, los resultados obtenidos con los anticuerpos 3C3, 6C11, y 9G7 usando células diana Raji y Daudi se presentan en las Figuras 36 y 37, respectivamente. El anticuerpo anti-CD19 16C4 se usó como un control de referencia. Los tres anticuerpos madurados por afinidad mostraron sustancialmente la misma actividad ADCC que el control durante el intervalo de concentración probado (0.0001-10 µg/ml).

Las personas con experiencia en la materia entienden que las variantes del anticuerpo anti-CD19 16C4 madurado por afinidad pueden modificarse adicionalmente de acuerdo con los protocolos descritos en la presente. Específicamente, los anticuerpos 3C3, 6C11, y 9G7 pueden modificarse para comprender cualquiera de las regiones Fc de las variantes descritas en la presente. Una versión afucosilada de los anticuerpos puede prepararse también. Los anticuerpos madurados por afinidad pueden caracterizarse también usando los ensayos descritos en la presente. Específicamente, la capacidad de los anticuerpos 3C3, 6C11, y 9G7 para mediar la ADCC, depletar *in vivo* las células B, reducir el tamaño de xenoinjertos tumorales, inhibir la proliferación de células B estimuladas con anti-IgM/CpG puede probarse siguiendo los protocolos descritos en la presente.

7.13. Inhibición de la proliferación de las células B mediada por el anticuerpo anti-CD19

7.13.1. Fosforilación del CD19 inducida por el tratamiento con el anticuerpo anti-CD19

Diez millones de células se incubaron durante 15 minutos en presencia de 5 µg/ml de los anticuerpos anti-CD19 3649, 3649-3M, 3649-afuc, 3649-TM o 16C4. Las células control tratadas con el anticuerpo R347 de especificidad irrelevante, así como las células control sin tratamiento con anticuerpos se incluyeron en el experimento como controles negativos. Después de la incubación, se prepararon lisados de células y se sometieron a inmunoprecipitación de acuerdo con protocolos estándares. El material inmunoprecipitado y lisado celular de entrada se separaron en una SDS-PAGE de Laemmli, se transfirieron a un soporte sólido (Invitrogen nitrocelulosa Catálogo # LC2001) y sometieron a transferencia de tipo Western. La inmunoprecipitación se realizó con 2 µg del anticuerpo anti-CD19 HB12B siguiendo los protocolos estándares. La proteína total CD19 y los niveles de CD19 fosforilados se detectaron en el material inmunoprecipitado por transferencia de tipo Western usando el anticuerpo anti-CD19 (1:1000) (Cell Signaling Technology # 3574) o (1:250) antifosfo tirosina (PY20) (Santa Cruz Biotechnology # sc -508 HRP), respectivamente. La proteína fosforilada Erk1/2 y los niveles de proteína total ERK1/2 en el lisado celular de entrada se detectaron por transferencia de tipo Western usando el anticuerpo antifosfo (1:2000) ERK1/2 (Cell Signaling Technology #9106S) y anti-Erk1/2 (1:1000), respectivamente.

En la Figura 39A se muestran los resultados de la inmunoprecipitación de HB12B seguido por transferencia de tipo Western. Además de las muestras inmunoprecipitadas de la experimentación diversa ("3649", "3649-3M", "3649-aFuc", "3649-TM" o "16C4") y los lisados de célula control ("nulo" y "R347"), la membrana contuvo también un anticuerpo HB12B sólo en el carril control ("Ac solo"). Los niveles totales de proteína CD19 fueron sustancialmente idénticos en

todas las muestras inmunoprecipitadas. Los niveles de CD19 fosforilados fueron significativamente superiores en las muestras inmunoprecipitadas de lisados de células preparados de las células anti-CD19 tratadas que en las muestras control. En la Figura 39B se muestran los resultados de la inmunotransferencia en lisados totales de células. Los niveles totales de proteína Erk1/2 fueron sustancialmente idénticos en todos los lisados de células. Los niveles de Erk1/2 fosforilados fueron significativamente superiores en los lisados de las células preparadas a partir de las células tratadas con anti-CD19 que en las muestras control.

7.13.2. Tratamiento con anti-CD19 no inhibe la activación de ERK1/2 mediado por anti-IgM

Un millón de células se estimularon con 5 µg/ml del anticuerpo anti-IgM o PMA (50 ng/ml)/ionomicina (1 µM) durante cinco o diez minutos en presencia ya sea de 10 µg/ml del anticuerpo anti-CD19 3648-3M o 10 µg/ml del anticuerpo control R347. Las células con sólo el tratamiento de 3649 o R347 se incluyeron como controles. Las células se cosecharon y se lisaron al final del período de incubación. El lisado total de célula se separó en un SDS-PAGE de Laemmli, se transfirieron a una membrana de soporte de nitrocelulosa y se sometieron a transferencia de tipo Western siguiendo los protocolos estándares. La transferencia de tipo Western usando el anticuerpo anti-fosfo Erk1/2 y el anticuerpo anti-Erk1/2 se realizó para detectar en el lisado de células los niveles de Erk1/2 fosforilado y Erk1/2 total, respectivamente. Los resultados se muestran en la Figura 39C-D.

Los niveles de Erk1/2 total fueron sustancialmente idénticos en todos los lisados celulares. El nivel de Erk1/2 fosforilado de la línea de base en las células tratadas sólo con el anticuerpo 3649 fue superior que aquellas células tratadas sólo con R347. La estimulación con anti-IgM o PMA/ionomicina aumentó los niveles de Erk1/2 fosforilados por encima de la línea de base, tanto en las células tratadas con 3649 como con R347. El nivel de fosforilación de ERK1/2 fue significativamente superior después de la estimulación con PMA/ionomicina que después de la estimulación con el anticuerpo anti-IgM.

7.13.3. Tratamiento con el anticuerpo anti-CD19 inhibe la proliferación de células B inducida por anti-IgM/CD40

Las células B periféricas se purificaron de 200 ml de sangre usando un kit de aislamiento de células B (Miltenyi Biotec # 130-091-151). 100,000 células se sembraron en una placa de fondo U de 96 pocillos (100 µl de 1×10^6 células/ml). A continuación, se añadieron a las células la concentración apropiada de anticuerpo en un volumen de 50 µl. La placa se devolvió a la incubadora durante 15 minutos. Después, el estímulo se adicionó a las células en un volumen de 50 µl. El volumen final de la mezcla células/anticuerpo/estímulo fue de 200 µl. Las células se incubaron durante tres días. El número de células se leyó en el tercer día usando el ensayo de viabilidad celular luminiscente CellTiter-Glo® (Promega). Los experimentos en las líneas celulares inmortalizadas se sembraron con 10,000 células por pocillo.

El efecto del tratamiento con el anticuerpo anti-CD19 en la proliferación de las células B inducida por anti-IgM/CD40 B se muestra en la Figura 40. Las células B se sembraron en presencia de 10 µg/ml del anticuerpo anti-CD193649, 3649-TM, y 3649-3M. 15 minutos más tarde las células B se estimularon con anti-IgM (5 µg/ml) sola, anti IgM-(5 µg/ml)/CD40 (1 µg/ml), o CpG (1 µg/ml) solo. La estimulación de las células B se dejó continuar durante tres días. Los números de células viables se midieron al final del experimento usando el ensayo de viabilidad celular luminiscente CellTiter-Glo® (Promega). Las células tratadas con el anticuerpo R347 de especificidad irrelevante se incluyeron como control. Los números de células viables se aumentaron por la estimulación con anti-IgM/CD40 o CpG, pero no solo por la estimulación de IgM. La proliferación de células inducida por anti-IgM/CD40 se inhibió significativamente por el tratamiento con el anticuerpo anti-CD19. El nivel de inhibición (40%) fue idéntico para todos los anticuerpos anti-CD19 probados. La proliferación de las células inducida por CpG no se afectó por el tratamiento con anticuerpo anti-CD19.

7.13.4. Tratamiento con el anticuerpo anti-CD19 inhibe la proliferación celular inducida por el anti-IgM/CpG B

La proliferación celular en respuesta a diversos estímulos se evaluó usando el ensayo CFSE. En resumen, las células B purificadas se resuspendieron en tampón fosfato salino (PBS) a aproximadamente 10 millones de células por mililitro. A eso se adicionó un volumen igual de 1 µM de CFSE en PBS. La concentración final de CFSE fue .5 µM y las células estaban a 5 millones por mililitro. La suspensión se mantuvo en la oscuridad durante 10 minutos. Un volumen igual de suero fetal bovino (FCS) se adicionó a la mezcla para quitar el CFSE extracelular. Las células se lavaron y se diluyeron en los medios. 100,000 células marcadas con CFSE se sembraron en una placa de fondo U de 96 pocillos (100 µl de 1×10^6 célula/ml). A continuación, la concentración apropiada de anticuerpo se adicionó a las células en un volumen 50 µl. La placa se devolvió a la incubadora durante 15 minutos. A continuación, el estímulo se adicionó a las células en un volumen de 50 µl. El volumen final de la mezcla células/anticuerpo/estímulo fue 200 µl. Las células se incubaron durante cuatro días. Al final de la incubación, las células se lavaron, se tiñeron con 7-amino-actinomicina D (7-AAD) (BD Bioscience), y se analizaron en un citómetro de flujo. La señal CFSE de las células vivas se detectó. La reducción de la

señal en el perfil CFSE de una población de células fue indicativa de la división celular. El grado de reducción de la señal CFSE se correlacionó con los niveles de proliferación celular.

La células B periféricas purificadas se estimularon con anti-IgM (1µg/ml)/CpG (2µg/ml) o CpG (2µg/ml) solo durante cuatro días. La proliferación celular se evaluó usando el ensayo CFSE. La Figura 41A muestra el perfil CFSE de las células estimuladas y el control no estimulado. La señal CFSE de las células estimuladas con IgM (1µg/ml)/CpG (2µg/ml) fue significativamente inferior que aquellas las células control indicando que la estimulación con IgM (1µg/ml)/CpG (2µg/ml) resultó en una proliferación celular extensiva. El perfil CFSE de las células estimuladas con CpG sólo indicó la proliferación celular sólo limitada.

El anticuerpo 16C4 anti-CD19 inhibió la proliferación de células B inducida por anti-IgM/CpG. Las células B periféricas purificadas se estimularon con anti-IgM (1µg/ml)/CpG (2µg/ml) en presencia de 5 µg/ml de anticuerpo control R347 o 5 µg/ml del anticuerpo 16C4 anti-CD19 durante cuatro días. La proliferación celular se evaluó usando el ensayo CFSE. La Figura 41B muestra el perfil CFSE de las células B estimuladas con IgM (1µg/ml)/CpG (2µg/ml) en presencia de los anticuerpos R347 o 16C4. El perfil CFSE de las células B estimuladas con anti-IgM (1µg/ml)/CpG (2µg/ml) en presencia del anticuerpo R347 fue indicativa de la proliferación celular extensiva. El perfil CFSE de las células B estimuladas con anti-IgM (1µg/ml)/CpG (2µg/ml) en presencia del anticuerpo 16C4 anti-CD19 fue indicativo de menos proliferación celular extensiva que aquella observada en las células control.

7.13.5. Anticuerpos anti-CD19 de la variante de Fc muestran propiedades inhibitoras alteradas

Las células B periféricas purificadas se estimularon durante cuatro días con anti-IgM (1µg/ml)/CpG (2µg/ml) en presencia de 5 µg/ml del anticuerpo control R347, anticuerpo 3649-3M anti-CD19 de la variante de Fc o anticuerpo 3649-M anti-CD19 de la variante de Fc. La proliferación celular se evaluó usando el ensayo CFSE. La Figura 42A muestra el perfil CFSE de las células B estimuladas con anti-IgM (1µg/ml)/CpG (2µg/ml) en presencia del anticuerpo control R347. El perfil CFSE muestra que $23.5 + 26.5 + 23.2 = 73.2\%$ de células B experimentaron al menos una ronda de división celular. Las Figuras 42B y C muestran el perfil CFSE de las células B estimuladas con anti-IgM (1µg/ml)/CpG (2µg/ml) en presencia de las variantes de Fc del anticuerpo anti-CD19 3649-TM y 3649-3M, respectivamente. Los perfiles CFSE muestran que el 44.8% y el 30.3% de las células B estimuladas en presencia de las variante de Fc del anticuerpo anti-CD19 3649-TM y 3649-3M, respectivamente, experimentaron al menos una ronda de división celular durante el largo período de incubación de cuatro días. Una inspección cercana de los tres perfiles CFSE reveló que no sólo el número de células que experimentaron al menos una división, sino también el número de células que experimentaron más de una división cayó con la proliferación celular más alta y más baja observada en presencia de R347 y 3649-3M, respectivamente. El tratamiento con 3649-TM inhibió la proliferación celular menos eficazmente que el tratamiento con 3649-3M.

Las células B purificadas se estimularon durante cuatro días con anti-IgM (5µg/ml)/CpG (1µg/ml) en presencia de 5µg/ml de los anticuerpos R347, la variante de Fc del R347-3M, 3649, la variante de Fc del 3649-3M, o la variante de Fc del 3649-TM. La proliferación celular se evaluó usando el ensayo CFSE. El perfil CFSE de las células B estimuladas en presencia de R347 se incluyó en todos los paneles como un estándar de referencia. Los perfiles CFSE de células B estimuladas en presencia de los anticuerpos la variante Fc del R347-3M, 3649, la variante de Fc del 3649-3M, y la variante de Fc del 3649-TM se mostraron en los paneles A-D. La proliferación celular en presencia de la variante de Fc del R347-3M fue la misma que la observada en presencia del estándar de referencia R347. Los tres anticuerpos anti-CD19 inhibieron la proliferación celular. Los anticuerpos tipo salvaje 3649 y la variante de Fc del 3649-TM variante de Fc inhibieron la proliferación celular en el mismo grado. El 3649-3M fue más eficaz en la inhibición de la proliferación de células B que cualquiera de los anticuerpos 3649 o 3649-TM.

Sinergismo inhibitorio de los anticuerpos anti-CD19 y anti-receptor IIB de Fc gamma (Fc γ RIIB o CD32b): El siguiente diseño experimental probará además si existe una interacción sinérgica entre la inhibición de la proliferación de las células B mediada por los anticuerpos anti-CD19 y anti-CD32b. Las células B purificadas se estimularán durante cuatro días con anti-IgM (2 µg/ml)/CpG (2 µg/ml) en presencia de (i) un anticuerpo anti-CD32b (por ejemplo, AT10), (ii) un anticuerpo anti-CD19 o (iii) tanto anticuerpos anti-CD32b como CD19. La proliferación celular se podrá evaluar usando el ensayo CFSE. El sinergismo sobre la inhibición de la proliferación de células B mediada por los anticuerpos anti-CD32b y anti-CD19 se espera que conduzca a una más baja proliferación de células B en presencia de ambos anticuerpos que la proliferación celular observada en presencia de cualquier anticuerpo solo.

7.13.6. Los anticuerpos anti-CD19 se internalizan eficientemente.

Ensayo de internalización del anticuerpo: Las células se incubaron con 5 µg/ml de anticuerpos marcados con Alexa Flour 488 a 37°C hasta 60 minutos. Una alícuota de las células se eliminó a intervalos de 10 minutos, se lavó, se dividió en dos partes, y se colocó en hielo. Una mitad de la alícuota se dejó sin tratar en hielo. La segunda alícuota se trató en hielo

durante 45 segundos con una solución de PBS de pH bajo (2.0) que contenía 0.03 M de sacarosa y FCS al 10% para quitar todas las moléculas de anticuerpo unidas a la superficie celular. Tanto las muestras tratadas con ácido como las no tratadas se lavaron, se fijaron con formaldehído al 4%, y se analizaron en un citómetro de flujo. El % del anticuerpo internalizado se calculó como la relación de la señal de fluorescencia de las células lavadas con ácido (solo señal interna) y aquellas de las células sin tratar (señal total de la superficie celular y los compartimentos internos).

En la Figura 44 se muestra la internalización de los anticuerpos HB12B, 3649, y 16C4 por las células Raji durante un período de tiempo de 60 minutos. Las curvas de internalización muestran que la absorción del anti-CD19 alcanzó un máximo alrededor de los 20-30 minutos. La internalización máxima fue aproximadamente 50% para los anticuerpos HB12B y 3649 y ~30% para el anticuerpo 16C4.

7.13.7. Pérdida del CD19 de la superficie celular después de 24 horas de tratamiento con el anticuerpo anti-CD19.

Las células se incubaron en presencia de un anticuerpo anti-CD19 durante 24 horas. Una población de células control se incubó en presencia del anticuerpo R347 de especificidad irrelevante. A continuación de la incubación, las células se cosecharon, se lavaron y se incubaron en hielo durante 10 minutos en una solución de tinción que comprendía 5 µg/ml del anticuerpo anti-CD19 durante 10 minutos. El anticuerpo anti-CD19 unido a la superficie se detectó por la tinción de las células durante 10 minutos con un anticuerpo secundario anti-IgG humana en carnero conjugado con PE. Las células inmunoteñidas se fijaron en paraformaldehído al 4% y analizaron en un citómetro de flujo. La pérdida del CD19 en la superficie se calculó comparando la intensidad de fluorescencia media (MFI) de las células tratadas con anticuerpos anti-CD19 con la MFI de las células inmunoteñidas tratadas con R347 (0% de pérdida en la superficie) y las células tratadas con R347 teñidas solo con el anticuerpo secundario (100% pérdida en la superficie).

En la Figura 45 se muestra la pérdida en la superficie del CD19 en las células Raji y las células B primarias después de la incubación durante 24 horas en presencia de 5 µg/ml de los anticuerpos anti-CD19 3649, 3649-3M, 3649-TM, 3648-afuc, y 16C4. Una pérdida de 55-70% y 65-90% de la expresión en la superficie de CD19 se detectó en las células Raji y las células B primarias, respectivamente, después del tratamiento con los anticuerpos anti-CD19.

Aquellos con experiencia en la materia reconocerán, o serán capaces de determinar usando no más que la experimentación rutinaria, muchos equivalentes a las modalidades específicas de la invención descrita en la presente. Los equivalentes de ese tipo se pretenden que se incluyan mediante las reivindicaciones siguientes.

Listado de secuencias

<110> MedImmune, Inc.
Damschroder, Melissa
Kiener, Peter
Wu, Herren
Dall'Acqua, William
Herbst, Ronald
Coyle, Anthony

<120> ANTICUERPOS ANTI CD19 HUMANIZADOS Y SU USO EN EL TRATAMIENTO DE
ONCOLOGÍA, TRANSPLANTE Y ENFERMEDAD AUTOINMUNE

<130> BC105PCT

<140> PCTUS0777916

<141> 2007-09-07

<150> 60/842,935

<151> 2006-09-08

<150> 60/866,917

<151> 2006-11-22

<150> 60/911,397

<151> 2007-04-12

<150> 60/915,309

<151> 2007-05-01

ES 2 383 710 T3

<150> 60/939,429
 <151> 2007-05-22

5 <160> 238
 <170> Versión de PatentIn 3.3

10 <210> 1
 <211> 367
 <212> ADN
 <213> Mus musculus

15 <400> 1
 gaggtgcagc tgcaggagtc tggacctgag ctggtaaagc ctggggcttc agtgaagatg 60
 tcctgaagg cttctggata cacattcact agctatgta tgcactgggt gaagcagaag 120
 cctgggcagg gccttgagtg gattggatat ttaatcctt acaatgatgg tactgattac 180
 20 tatgagaagt tcaaaggcaa ggccacactg actcagaca aatcctccag cacagcctac 240
 atggcgctca gcagcctgac ctctgaggac tctgcggtct attactgtgc aagagggacc 300
 25 tattactacg gtagtagcta ccccttgac tactggggcc aaggcaccac tctcacagtc 360
 tcctcag 367

30 <210> 2
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

35 <400> 2
 Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

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

45 Val Met His Trp Val Lys Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

50 Gly Tyr Phe Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Asp Tyr Tyr Glu Lys Phe
 50 55 60

55 Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ser Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

60 Ala Arg Gly Thr Tyr Tyr Tyr Gly Ser Ser Tyr Pro Phe Asp Tyr Trp

ES 2 383 710 T3

100 105 110

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

10 <210> 3
<211> 333
<212> ADN
<213> Mus musculus

15 <400> 3
gatgttggga tgaccagac tccactcact ttgtcggta ccattggaca accagcctct 60
ttctctgca agtcaagtca gaggccttta tatagtaatg gaaaaaccta ttgaattgg 120
ttattacaga ggccaggcca gtctccaaag cgcctaatacc atctggtgtc taaactggac 180
20 tctgtccctg acaggttcac tggcagtgga tcaggaacag attttacact gaaaatcggc 240
agagtggagg ctgaggattt gggagtttat tactgcgtgc aaggtagaca tttccgtac 300
acgttcggag gggggaccaa actagaaata aaa 333

25 <210> 4
<211> 111
<212> PRT
<213> Mus musculus

30 <400> 4

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

40 Gln Pro Ala Ser Phe Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser
20 25 30

45 Asn Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser
35 40 45

50 Pro Lys Arg Leu Ile His Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Val Pro Asp
50 55 60

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

60 Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Val Gln Gly Thr
85 90 95

His Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

ES 2 383 710 T3

<210> 5
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Mus musculus
 5
 <400> 5
 agctatgta tgcac 15
 10
 <210> 6
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 15
 <400> 6
 Ser Tyr Val Met His
 1 5
 20
 <210> 7
 <211> 51
 <212> ADN
 <213> Mus musculus
 25
 <400> 7
 tattttaatc cttacaatga tggactgat tactatgaga agtcaaagg c 51
 30
 <210> 8
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 35
 <400> 8
 Tyr Phe Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Asp Tyr Tyr Glu Lys Phe Lys
 1 5 10 15
 40
 gly
 45
 <210> 9
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Mus musculus
 50
 <400> 9
 gggacctatt actacggtag tagctacccc ttgactac 39
 55
 <210> 10
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 10
 60
 Gly Thr Tyr Tyr Tyr Gly Ser Ser Tyr Pro Phe Asp Tyr

ES 2 383 710 T3

	1	5	10	
5	<210> 11 <211> 48 <212> ADN <213> Mus musculus			
10	<400> 11 aagtcaagtc agagcctctt atataagtaac ggaaaaacct atttgaat 48			
15	<210> 12 <211> 16 <212> PRT <213> Mus musculus			
20	<400> 12 Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser Asn Gly Lys Thr Tyr Leu Asn 1 5 10 15			
25	<210> 13 <211> 21 <212> ADN <213> Mus musculus			
30	<400> 13 ctggtgtcta aactggactc t 21			
35	<210> 14 <211> 7 <212> PRT <213> Mus musculus			
40	<400> 14 Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser 1 5			
45	<210> 15 <211> 27 <212> ADN <213> Mus musculus			
50	<400> 15 gtgcaaggta cacattttcc gtacacg 27			
55	<210> 16 <211> 9 <212> PRT <213> Mus musculus			
60	<400> 16 Val Gln Gly Thr His Phe Pro Tyr Thr 1 5			

ES 2 383 710 T3

5 <210> 17
 <211> 363
 <212> ADN
 <213> Mus musculus

10 <400> 17
 caggtccagt tgcagcagtc tggacctgag ctggtgaagc ctggggcctc agtgaagatt 60
 tcctgcaaag cttctggcta cgcattcagt agctcttga tgaactgggt gatacagagg 120
 cctggacagg gtcttgagtg gattggacgg atttacctg gagatggaga tactaactac 180
 15 aatgggaagt tcaagggcaa ggccacactg actgcagaca aatcctccag tacagcctac 240
 atgcagctca gcagcctgac ctctgtggac tctcggtct atttctgtc aagatcagga 300
 20 ttattacta cggttttaga ctttgactac tggggccacg gcaccactct cacagtctcc 360
 tca 363

25 <210> 18
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

30 <400> 18
 Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

35 Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Ser Ser
 20 25 30

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

45 Gly Arg Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Gly Lys Phe
 50 55 60

50 Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

55 Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Val Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
 85 90 95

60 Ala Arg Ser Gly Phe Ile Thr Thr Val Leu Asp Phe Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

His Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
 115 120

ES 2 383 710 T3

<210> 19
 <211> 333
 <212> ADN
 5 <213> Mus musculus

 <400> 19
 gacattgtgc tgacgcagtc tccaacctct ttggctgtgt ctctagggca gagggccacc 60
 10 atctcctgca gagccagcga aagtgtgat actttggca ttagtttat gaactggtc 120
 caacagaaac caggacagcc acccaaactc ctcatcatg ctgcatcaa tcaaggatcc 180
 15 ggggtccctg ccaggttag tggtagtggg tctgggacgg acttcagcct caacatccat 240
 cctatggagg aggatgatag tgcaatgtat ttctgtcagc aaagtaagga ggttcattc 300
 acgttcggct cggggacaaa gttgaaata aaa 333
 20
 <210> 20
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 25
 <400> 20

 Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Thr Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 30
 Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Thr Phe
 20 25 30
 35
 Gly Ile Ser Phe Met Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
 35 40 45
 40
 Lys Leu Leu Ile His Ala Ala Ser Asn Gln Gly Ser Gly Val Pro Ala
 50 55 60
 45
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Ser Leu Asn Ile His
 65 70 75 80
 50
 Pro Met Glu Glu Asp Asp Ser Ala Met Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Lys
 85 90 95
 55
 Glu Val Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110
 60
 <210> 21
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Mus musculus
 <400> 21

ES 2 383 710 T3

agctcttgga tgaac 15

5 <210> 22
<211> 5
<212> PRT
<213> Mus musculus

10 <400> 22
Ser Ser Trp Met Asn
1 5

15 <210> 23
<211> 51
<212> ADN
<213> Mus musculus

20 <400> 23
cggattatc ctggagatgg agatactaac tacaatggga agttcaaggg c 51

25 <210> 24
<211> 17
<212> PRT
<213> Mus musculus

30 <400> 24
Arg Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Gly Lys Phe Lys
1 5 10 15

35 gly

40 <210> 25
<211> 36
<212> ADN
<213> Mus musculus

45 <400> 25
tcaggattta ttactacggt ttagacttt gactac 36

50 <210> 26
<211> 12
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 26

55 Ser Gly Phe Ile Thr Thr Val Leu Asp Phe Asp Tyr
1 5 10

60 <210> 27
<211> 45
<212> ADN

ES 2 383 710 T3

<213> Mus musculus
 <400> 27
 5 agagccagcg aaagtgtga tactttggc attagttta tgaac 45
 <210> 28
 <211> 15
 <212> PRT
 10 <213> Mus musculus
 <400> 28
 15 Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Thr Phe Gly Ile Ser Phe Met Asn
 1 5 10 15
 <210> 29
 <211> 21
 20 <212> ADN
 <213> Mus musculus
 <400> 29
 25 gctgcatcca atcaaggatc c 21
 <210> 30
 <211> 7
 <212> PRT
 30 <213> Mus musculus
 <400> 30
 35 Ala Ala Ser Asn Gln Gly Ser
 1 5
 <210> 31
 <211> 27
 40 <212> ADN
 <213> Mus musculus
 <400> 31
 45 cagcaaagta aggaggtcc attcacg 27
 <210> 32
 <211> 9
 <212> PRT
 50 <213> Mus musculus
 <400> 32
 55 Gln Gln Ser Lys Glu Val Pro Phe Thr
 1 5
 <210> 33
 <211> 363
 60 <212> ADN
 <213> Artificial

ES 2 383 710 T3

<220>
 <223> polipéptido/polinucleótido recombinante

5 <400> 33
 gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttggtccagc ctggagggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt agctcttga tgaactgggt ccgccaggct 120
 10 ccaggaagg ggctggagtg ggtggccgg attatcctg gagatggaga tactaactac 180
 aatgggaagt tcaagggcag attcaccatc tcaagagatg attcaaagaa ctactgtat 240
 ctgcaaatga acagcctgaa aaccgaggac acggccgtgt attactgtgc tagatcagga 300
 15 ttattacta cggttttaga cttgactac tggggccaag gaaccctggt caccgtctcc 360
 tca 363

20
 <210> 34
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Artificial

25
 <220>
 <223> polipéptido/polinucleótido recombinante

30
 <400> 34
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

35 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Ser
 20 25 30

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

45 Gly Arg Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Gly Lys Phe
 50 55 60

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

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

55 Ala Arg Ser Gly Phe Ile Thr Thr Val Leu Asp Phe Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

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

5 <210> 35
 <211> 90
 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> polipéptido/polinucleótido recombinante

 10 <400> 35
 gaggtgcagc tggaggagtc tgggggaggc ttgtccagc ctggagggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt 90

 15 <210> 36
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Artificial

 20 <220>
 <223> polipéptido/polinucleótido recombinante

 25 <400> 36
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

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

 35 <210> 37
 <211> 42
 <212> ADN
 <213> Artificial

 40 <220>
 <223> polipéptido/polinucleótido recombinante

 <400> 37
 tgggtccgcc aggctccagg gaaggggctg gagggttg gc 42

 45 <210> 38
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Artificial

 50 <220>
 <223> polipéptido/polinucleótido recombinante

 55 <400> 38
 Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly
 1 5 10

 60 <210> 39
 <211> 96

ES 2 383 710 T3

<212> ADN
 <213> Artificial

5 <220>
 <223> polipéptido/polinucleótido recombinante

<400> 39
 agattcacca tctcaagaga tgattcaaag aactcactgt atctgcaaat gaacagcctg 60
 10 aaaaccgagg acacggccgt gtattactgt gctaga 96

15 <210> 40
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> polipéptido/polinucleótido recombinante

<400> 40
 Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln
 1 5 10 15
 25

Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
 20 25 30

30 <210> 41
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Artificial

35 <220>
 <223> polipéptido/polinucleótido recombinante

<400> 41
 40 tggggccaag gaaccctggt caccgtctcc tca 33

45 <210> 42
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial

50 <220>
 <223> polipéptido/polinucleótido recombinante

<400> 42
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10
 55

60 <210> 43
 <211> 363
 <212> ADN
 <213> Artificial

ES 2 383 710 T3

<220>
 <223> polipéptido/polinucleótido recombinante

<400> 43
 5 gaggtgcagc tggtaggagtc tgggggaggc ttgtccagc ctggagggtc cctgagaatc 60
 tcctgtgcag cctctggata cgccttcagt agctcttga tgaactgggt catccaggct 120
 ccaggggaagg ggctggagtg gattggccgg atttactctg gagatggaga tactaactac 180
 10 aatgggaagt tcaagggcag agccaccatc tcagcagatg attcaaagaa ctactgtat 240
 atgcaaatac acagcctgaa aaccgaggac acggccgtgt atatctgtgc tagatcagga 300
 15 ttattacta cggttttaga cttgactac tggggccaag gaaccctggt caccgtctcc 360
 tca 363

<210> 44
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Artificial

25 <220>
 <223> polipéptido/polinucleótido recombinante

<400> 44

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

35 Ser Leu Arg Ile Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Ser Ser
 20 25 30

40 Trp Met Asn Trp Val Ile Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

45 Gly Arg Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Gly Lys Phe
 50 55 60

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

55 Met Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr Ile Cys
 85 90 95

60 Ala Arg Ser Gly Phe Ile Thr Thr Val Leu Asp Phe Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 45
 <211> 90
 <212> ADN
 <213> Artificial
 5
 <220>
 <223> polipéptido/polinucleótido recombinante
 <400> 45
 10 gaggtgcagc tggaggagtc tgggggaggc ttgtccagc ctggagggtc cctgagaatc 60
 tcctgtgcag cctctggata cgccttcagt 90
 15 <210> 46
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Artificial
 20 <220>
 <223> polipéptido/polinucleótido recombinante
 <400> 46
 25 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 30 Ser Leu Arg Ile Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser
 20 25 30
 35 <210> 47
 <211> 42
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> polipéptido/polinucleótido recombinante
 40 <400> 47
 tgggtcatcc aggctccagg gaaggggctg gagtggattg gc 42
 45 <210> 48
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Artificial
 50 <220>
 <223> polipéptido/polinucleótido recombinante
 <400> 48
 55 Trp Val Ile Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly
 1 5 10
 60 <210> 49
 <211> 96
 <212> ADN

ES 2 383 710 T3

<213> Artificial
 <220>
 <223> polipéptido/polinucleótido recombinante
 5 <400> 49
 agagccacca tctcagcaga tgattcaaag aactcactgt atatgcaa at gaacagcctg 60
 10 aaaaccgagg acacggccgt gtatatctgt gctaga 96
 <210> 50
 <211> 32
 <212> PRT
 15 <213> Artificial
 <220>
 <223> polipéptido/polinucleótido recombinante
 20 <400> 50
 Arg Ala Thr Ile Ser Ala Asp Asp Ser Lys Asn Ser Leu Tyr Met Gln
 1 5 10 15
 25 Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr Ile Cys Ala Arg
 20 25 30
 30 <210> 51
 <211> 333
 <212> ADN
 <213> Artificial
 35 <220>
 <223> polipéptido/polinucleótido recombinante
 <400> 51
 40 gaaattgtgc tgactcagtc tccagacttt cagtctgtga ctcaaagga gaaagtcacc 60
 atcacctgca gagccagcga aagtgtgat acttttgga ttagtttat gaactggtac 120
 cagcagaaac cagatcagtc tcaaagctc ctcatcaagg ctgcatcaa tcaaggatcc 180
 45 ggggtcccct cgaggttcag tggcagtga tctgggacag attcaccct caccatcaat 240
 agcctggaag ctgaagatgc tgcaacgtat tactgtcagc aaagtaagga ggttcattc 300
 acgttcggcg gagggaccaa ggtggagatc aaa 333
 50 <210> 52
 <211> 111
 <212> PRT
 55 <213> Artificial
 <220>
 <223> polipéptido/polinucleótido recombinante
 60 <400> 52

ES 2 383 710 T3

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Phe Gln Ser Val Thr Pro Lys
 1 5 10 15

5 Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Thr Phe
 20 25 30

10 Gly Ile Ser Phe Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro
 35 40 45

15 Lys Leu Leu Ile Lys Ala Ala Ser Asn Gln Gly Ser Gly Val Pro Ser
 50 55 60

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

20 Ser Leu Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Lys
 85 90 95

25 Glu Val Pro Phe Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110

30 <210> 53
 <211> 69
 <212> ADN
 <213> Artificial

35 <220>
 <223> polipéptido/polinucleótido recombinante

<400> 53
 gaaattgtgc tgactcagtc tccagacttt cagtctgtga ctccaaagga gaaagtcacc 60

40 atcacctgc 69

45 <210> 54
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Artificial

50 <220>
 <223> polipéptido/polinucleótido recombinante

<400> 54

55 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Phe Gln Ser Val Thr Pro Lys
 1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys
 20

60 <210> 55

<211> 45
 <212> ADN
 <213> Artificial
 5 <220>
 <223> polipéptido/polinucleótido recombinante
 <400> 55
 10 tggtagcagc agaaccaga tcagtctcca aagctcctca tcaag 45
 <210> 56
 <211> 15
 <212> PRT
 15 <213> Artificial
 <220>
 <223> polipéptido/polinucleótido recombinante
 20 <400> 56
 Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Lys
 1 5 10 15
 25 <210> 57
 <211> 96
 <212> ADN
 <213> Artificial
 30 <220>
 <223> polipéptido/polinucleótido recombinante
 <400> 57
 35 ggggtcccct cgaggttcag tggcagtgga tctgggacag atttcaccct caccatcaat 60
 agcctggaag ctgaagatgc tgcaacgtat tactgt 96
 40 <210> 58
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Artificial
 45 <220>
 <223> polipéptido/polinucleótido recombinante
 <400> 58
 50 Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 1 5 10 15
 55 Leu Thr Ile Asn Ser Leu Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys
 20 25 30
 60 <210> 59
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> polipéptido/polinucleótido recombinante

5 <400> 59
 ttcggcggag ggaccaaggt ggagatcaaa 30

10 <210> 60
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial

15 <220>
 <223> polipéptido/polinucleótido recombinante
 <400> 60

20 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 1 5 10

25 <210> 61
 <211> 333
 <212> ADN
 <213> Artificial

30 <220>
 <223> polipéptido/polinucleótido recombinante
 <400> 61
 gaaattgtgc tgactcagtc tccagacttt cagtctgtga ctccaaagga gaaagtcacc 60
 atcacctgca gagccagcga aagtgtgat acttttgca ttagtttat gaactggtc 120
 35 cagcagaaaac cagatcagtc tccaaagctc ctcatccatg ctgcatcaa tcaaggatcc 180
 ggggtcccct cgaggttcag tggcagtga tctgggacag atttcaccct caccatcaat 240
 40 agcctggaag ctgaagatgc tgcaacgtat ttctgtcagc aaagtaagga ggttcattc 300
 acgttcggcg gagggaccaa ggtggagatc aaa 333

45 <210> 62
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> Artificial

50 <220>
 <223> polipéptido/polinucleótido recombinante
 <400> 62

55 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Phe Gln Ser Val Thr Pro Lys
 1 5 10 15

60 Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Thr Phe
 20 25 30

ES 2 383 710 T3

Gly Ile Ser Phe Met Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro
 35 40 45
 5
 Lys Leu Leu Ile His Ala Ala Ser Asn Gln Gly Ser Gly Val Pro Ser
 50 55 60
 10
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn
 65 70 75 80
 15
 Ser Leu Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Lys
 85 90 95
 20
 Glu Val Pro Phe Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110
 <210> 63
 <211> 45
 <212> ADN
 25 <213> Artificial
 <220>
 <223> polipéptido/polinucleótido recombinante
 30 <400> 63
 tgggtccagc agaaaccaga tcagtcctca aagctcctca tccat 45
 <210> 64
 35 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 40 <223> polipéptido/polinucleótido recombinante
 <400> 64
 45 Trp Phe Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile His
 1 5 10 15
 <210> 65
 <211> 96
 50 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> polipéptido/polinucleótido recombinante
 55 <400> 65
 ggggtcccct cgaggttcag tggcagtgga tctgggacag atttcaccct caccatcaat 60
 agcctggaag ctgaagatgc tgcaacgtat ttctgt 96
 60

<210> 66
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Artificial
 5
 <220>
 <223> polipéptido/polinucleótido recombinante
 <400> 66
 10 Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 1 5 10 15
 15 Leu Thr Ile Asn Ser Leu Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Phe Cys
 20 25 30
 20
 <210> 67
 <211> 333
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 25 <223> polipéptido/polinucleótido recombinante
 <400> 67
 gaaattgtgc tgactcagtc tccagacttt cagtctgtga ctcaaagga gaaagtcacc 60
 30 atcacctgca gagccagcga aagtgtgat acttttggca ttagttttat gaactgggtc 120
 cagcagaaac cagatcagtc tcaaagctc ctcatccatg ctgcatcaa tcaaggatcc 180
 ggggtcccct cgaggttcag tggcagtgga tctgggacag atttcaccct caccatcaat 240
 35 agcctggaag ctgaagatgc tgcaacgtat tactgtcagc aaagtaagga ggttcattc 300
 acgttcggcg gagggaccaa ggtggagatc aaa 333
 40
 <210> 68
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> Artificial
 45
 <220>
 <223> polipéptido/polinucleótido recombinante
 <400> 68
 50 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Phe Gln Ser Val Thr Pro Lys
 1 5 10 15
 55 Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Thr Phe
 20 25 30
 60 Gly Ile Ser Phe Met Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro
 35 40 45

ES 2 383 710 T3

Lys Leu Leu Ile His Ala Ala Ser Asn Gln Gly Ser Gly Val Pro Ser
 50 55 60

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

10 Ser Leu Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Lys
 85 90 95

15 Glu Val Pro Phe Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110

20 <210> 69
 <211> 333
 <212> ADN
 <213> Artificial

25 <220>
 <223> polipéptido/polinucleótido recombinante

30 <400> 69
 gaaattgtgc tgactcagtc tccagacttt cagtctgtga ctccaaagga gaaagtcacc 60
 atcacctgca gagccagcga aagtgtgat actttggca ttagtttat gaactggttc 120
 cagcagaaac cagatcagtc tccaaagctc ctcatcaagg ctgcatcaa tcaaggatcc 180
 ggggtcccct cgagggtcag tggcagtgga tctgggacag attcacct caccatcaat 240
 35 agcctggaag ctgaagatgc tgcaacgtat tactgtcagc aaagtaagga ggttcattc 300
 acgttcggcg gagggaccaa ggtggagatc aaa 333

40 <210> 70
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> Artificial

45 <220>
 <223> polipéptido/polinucleótido recombinante

50 <400> 70

55 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Phe Gln Ser Val Thr Pro Lys
 1 5 10 15

60 Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Thr Phe
 20 25 30

Gly Ile Ser Phe Met Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro
 35 40 45

ES 2 383 710 T3

Lys Leu Leu Ile Lys Ala Ala Ser Asn Gln Gly Ser Gly Val Pro Ser
50 55 60

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

10 Ser Leu Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Lys
85 90 95

15 Glu Val Pro Phe Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 71
<211> 45
<212> ADN
20 <213> Artificial

<220>
<223> polipéptido/polinucleótido recombinante

25 <400> 71
tggttcagc agaaaccaga tcagctcca aagctcctca tcaag 45

<210> 72
30 <211> 15
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
35 <223> polipéptido/polinucleótido recombinante

<400> 72

40 Trp Phe Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Lys
1 5 10 15

<210> 73
45 <211> 333
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
50 <223> polipéptido/polinucleótido recombinante

<400> 73
gaaattgtgc tgactcagtc tccagacttt cagtctgtga ctcaaagga gaaagtcacc 60

atcacctgca gagccagcga aagtgtgat actttggca ttagtttat gaactgggtc 120

55 cagcagaaac cagatcagtc tcaaagctc ctcatcaagg ctgcatcaa tcaaggatcc 180

ggggccccct cgagggtcag tggcagtgga tctgggacag atttcacct caccatcaat 240

60 agcctggaag ctgaagatgc tgcaacgtat ttctgtcagc aaagtaagga ggttcattc 300

ES 2 383 710 T3

acgttcggcg gagggaccaa ggtggagatc aaa 333

5 <210> 74
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> polipéptido/polinucleótido recombinante
 <400> 74

15 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Phe Gln Ser Val Thr Pro Lys
 1 5 10 15

20 Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Thr Phe
 20 25 30

25 Gly Ile Ser Phe Met Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro
 35 40 45

30 Lys Leu Leu Ile Lys Ala Ala Ser Asn Gln Gly Ser Gly Val Pro Ser
 50 55 60

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

40 Ser Leu Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Lys
 85 90 95

45 Glu Val Pro Phe Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110

50 <210> 75
 <211> 333
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> polipéptido/polinucleótido recombinante
 <400> 75

55 gaaattgtgc tgactcagtc tccagacttt cagtctgtga ctcaaagga gaaagtcacc 60
 atcacctgca gagccagcga aagtgtgat acttttgga ttagtttat gaactgttac 120

60 cagcagaaac cagatcagtc tcaaagctc ctcatcatg ctgcatcaa tcaaggatcc 180
 ggggtcccct cgaggttcag tggcagtga tctgggacag attcacct caccatcaat 240
 agcctggaag ctgaagatgc tgcaacgtat ttctgtcagc aaagtaagga ggttcattc 300
 acgttcggcg gagggaccaa ggtggagatc aaa 333

5 <210> 76
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> Artificial

 10 <220>
 <223> polipéptido/polinucleótido recombinante
 <400> 76

 15 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Phe Gln Ser Val Thr Pro Lys
 1 5 10 15

 Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Thr Phe
 20 25 30

 20 Gly Ile Ser Phe Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro
 35 40 45

 25 Lys Leu Leu Ile His Ala Ala Ser Asn Gln Gly Ser Gly Val Pro Ser
 50 55 60

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

 Ser Leu Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Lys
 85 90 95
 35

 Glu Val Pro Phe Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110
 40
 <210> 77
 <211> 333
 <212> ADN
 <213> Artificial
 45
 <220>
 <223> polipéptido/polinucleótido recombinante
 <400> 77
 50 gaaattgtgc tgactcagtc tccagacttt cagtctgtga ctccaaagga gaaagtcacc 60
 atcacctgca gagccagcga aagtgtgat acttttgga ttagtttat gaactgttac 120
 cagcagaaac cagatcagtc tcaaagctc ctcatcaagg ctgcatcaa tcaaggatcc 180
 55 ggggtccct cgaggttcag tggcagtga tctgggacag atttcaccct caccatcaat 240
 agcctggaag ctgaagatgc tgcaacgtat ttctgtcagc aaagtaagga ggttcattc 300
 60 acgttcggcg gagggaccaa ggtggagatc aaa 333

ES 2 383 710 T3

<210> 78
 <211> 111
 <212> PRT
 5 <213> Artificial

 <220>
 <223> polipéptido/polinucleótido recombinante
 10 <400> 78
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Phe Gln Ser Val Thr Pro Lys
 1 5 10 15
 15 Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Thr Phe
 20 25 30
 20 Gly Ile Ser Phe Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro
 35 40 45
 25 Lys Leu Leu Ile Lys Ala Ala Ser Asn Gln Gly Ser Gly Val Pro Ser
 50 55 60
 30 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn
 65 70 75 80
 35 Ser Leu Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Lys
 85 90 95
 40 Glu Val Pro Phe Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110
 40 <210> 79
 <211> 333
 <212> ADN
 <213> Artificial
 45 <220>
 <223> polipéptido/polinucleótido recombinante
 <400> 79
 50 gaaattgtgc tgactcagtc tccagacttt cagtctgtga ctcaaagga gaaagtcacc 60
 atcacctgca gagccagcga aagtgtgat acttttgga ttagtttat gaactggtac 120
 cagcagaaac cagatcagtc tcaaagctc ctcatccatg ctgcatcaa tcaaggatcc 180
 55 ggggtccctc cgaggttcag tggcagtga tctgggacag atttcacct caccatcaat 240
 agcctggaag ctgaagatgc tgcaacgtat tactgtcagc aaagtaagga ggtccattc 300
 acgttcggcg gagggaccaa ggtggagatc aaa 333
 60

<210> 80
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> Artificial
 5
 <220>
 <223> polipéptido/polinucleótido recombinante
 <400> 80
 10
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Phe Gln Ser Val Thr Pro Lys
 1 5 10 15
 15
 Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Thr Phe
 20 25 30
 20
 Gly Ile Ser Phe Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro
 35 40 45
 Lys Leu Leu Ile His Ala Ala Ser Asn Gln Gly Ser Gly Val Pro Ser
 50 55 60
 25
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn
 65 70 75 80
 30
 Ser Leu Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Lys
 85 90 95
 35
 Glu Val Pro Phe Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110
 40
 <210> 81
 <211> 45
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 45
 <223> polipéptido/polinucleótido recombinante
 <400> 81
 tggtagcagc agaaaccaga tcagtctcca aagctcctca tccat 45
 50
 <210> 82
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial
 55
 <220>
 <223> polipéptido/polinucleótido recombinante
 <400> 82
 60
 Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile His

	1	5	10	15	
5	<210> 83 <211> 17 <212> PRT <213> Artificial				
10	<220> <223> polipéptido/polinucleótido recombinante <400> 83				
15	Met Gly Asp Asn Asp Ile His Phe Ala Phe Leu Ser Thr Gly Val His 1 5 10 15				
20	 ser				
25	<210> 84 <211> 22 <212> PRT <213> Artificial				
30	<220> <223> polipéptido/polinucleótido recombinante <400> 84				
35	Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Trp 1 5 10 15				
40	 Leu Pro Gly Ala Lys Cys 20				
45	<210> 85 <211> 57 <212> ADN <213> Artificial				
50	<220> <223> polipéptido/polinucleótido recombinante <400> 85 tatatatatc tagacatata tatgggtgac aatgacatcc actttgcctt tctctcc 57				
55	<210> 86 <211> 89 <212> ADN <213> Artificial				
60	<220> <223> polipéptido/polinucleótido recombinante <400> 86 tccactttgc ctttctctcc acaggtgtcc actccgaggt gcagctggtg gagtctgggg 60				

gaggcttggt ccagcctgga gggccctg 89

5 <210> 87
<211> 67
<212> ADN
<213> Artificial

10 <220>
<223> polipéptido/polinucleótido recombinante

<400> 87
gttcaccaa gagctactga aggtgaatcc agaggctgca caggagagtc tcagggaccc 60

15 tccaggc 67

20 <210> 88
<211> 73
<212> ADN
<213> Artificial

25 <220>
<223> polipéptido/polinucleótido recombinante

<400> 88
agctcttga tgaactgggt ccgccaggct ccagggaagg ggctggagtg ggtggccgg 60

30 attatcctg gag 73

35 <210> 89
<211> 65
<212> ADN
<213> Artificial

40 <220>
<223> polipéptido/polinucleótido recombinante

<400> 89
gcccttgaac ttccattgt agttagtatt tccatctcca ggataaatcc ggccaaccca 60

45 ctcca 65

50 <210> 90
<211> 70
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> polipéptido/polinucleótido recombinante

55 <400> 90
ggaagtcaa gggcagattc accatctcaa gagatgattc aaagaactca ctgtatctgc 60

aatgaacag 70

60 <210> 91

<211> 68
 <212> ADN
 <213> Artificial

5 <220>
 <223> polipéptido/polinucleótido recombinante

<400> 91
 aatcctgac tagcacagta atacacggcc gtgtcctcgg tttcaggct gttcattg 60
 10 agatacag 68

<210> 92
 15 <211> 58
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 20 <223> polipéptido/polinucleótido recombinante

<400> 92
 gtgtattact gtgctagatc aggatttatt actacggttt tagactttga ctactggg 58

25 <210> 93
 <211> 74
 <212> ADN
 <213> Artificial

30 <220>
 <223> polipéptido/polinucleótido recombinante

<400> 93
 35 tatatatagg gcccttggtg gaggctgagg agacggtgac cagggttct tggccccagt 60
 agtcaaagtc taaa 74

40 <210> 94
 <211> 63
 <212> ADN
 <213> Artificial

45 <220>
 <223> polipéptido/polinucleótido recombinante

<400> 94
 50 tatatatacc ccggggccaa atgtgaaatt gtgctgactc agtctccaga ctttcagtct 60
 gtg 63

<210> 95
 55 <211> 67
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 60 <223> polipéptido/polinucleótido recombinante

ES 2 383 710 T3

<400> 95
 caacacttc gctggctctg caggatgatgg tgactttctc cttggagtc acagactgaa 60
 agtctgg 67
 5
 <210> 96
 <211> 68
 <212> ADN
 10 <213> Artificial
 <220>
 <223> polipéptido/polinucleótido recombinante
 15 <400> 96
 gccagcgaaa gtgttgatac tttggcatt agtttatga actggtcca gcagaaacca 60
 gatcagtc 68
 20
 <210> 97
 <211> 67
 <212> ADN
 <213> Artificial
 25
 <220>
 <223> polipéptido/polinucleótido recombinante
 30 <400> 97
 cgaggggacc ccggatcctt gattggatgc agcatggatg aggagcttg gagactgatc 60
 tggtttc 67
 35
 <210> 98
 <211> 68
 <212> ADN
 <213> Artificial
 40
 <220>
 <223> polipéptido/polinucleótido recombinante
 <400> 98
 gatccggggg cccctcgagg ttcagtggca gtggatctgg gacagatttc accctacca 60
 45 tcaatagc 68
 50
 <210> 99
 <211> 68
 <212> ADN
 <213> Artificial
 55
 <220>
 <223> polipéptido/polinucleótido recombinante
 <400> 99
 gaacctcctt actttgctga cagaaatagc ttgcagcatc ttcagcttcc aggctattga 60
 60 tggtgagg 68

5 <210> 100
 <211> 55
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> polipéptido/polinucleótido recombinante
 10 <400> 100
 gcaaagtaag gaggttccat tcacgttcgg cggaggacc aaggtggaga taaa 55
 15 <210> 101
 <211> 43
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 20 <223> polipéptido/polinucleótido recombinante
 <400> 101
 tatatatag tacgtttgat ctccaccttg gtcctccgc cga 43
 25 <210> 102
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Artificial
 30 <220>
 <223> polipéptido/polinucleótido recombinante
 <400> 102
 35 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 40 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Thr
 20 25 30
 45 Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 50 Gly Arg Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Gly Lys Phe
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80
 55 Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 60 Ala Arg Ser Gly Phe Ile Thr Thr Val Tyr Asp Phe Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

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

<210> 103
<211> 121
<212> PRT
10 <213> Artificial

<220>
<223> polipéptido/polinucleótido recombinante

15 <400> 103

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

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

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

30 Gly Arg Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Gly Lys Phe
50 55 60

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

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

40 Ala Arg Ser Gly Phe Ile Thr Thr Val Arg Asp Phe Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

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

50 <210> 104
<211> 121
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
55 <223> polipéptido/polinucleótido recombinante

<400> 104

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

ES 2 383 710 T3

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

5

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

10

Gly Arg Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Ala Lys Phe
 50 55 60

15

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

20

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

25

Ala Arg Ser Gly Phe Ile Thr Thr Val Arg Asp Phe Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

30

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 105
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Artificial

35

<220>
 <223> polipéptido/polinucleótido recombinante
 <400> 105

40

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

45

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

50

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

55

Gly Arg Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Gly Lys Phe
 50 55 60

60

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

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

5 Ala Arg Ser Gly Phe Ile Thr Thr Val His Asp Phe Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

10 <210> 106
<211> 121
<212> PRT
<213> Artificial

15 <220>
<223> polipéptido/polinucleótido recombinante

20 <400> 106

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

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

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

35 Gly Arg Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Val Lys Phe
50 55 60

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

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

45 Ala Arg Ser Gly Phe Ile Thr Thr Val Arg Asp Phe Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

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

55 <210> 107
<211> 121
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> polipéptido/polinucleótido recombinante

60 <400> 107

ES 2 383 710 T3

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 5
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Ser
 20 25 30
 10
 Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 15
 Gly Arg Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr Tyr Gly Lys Phe
 50 55 60
 20
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80
 25
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 30
 Ala Arg Ser Gly Phe Ile Thr Thr Val Arg Asp Phe Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110
 35
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120
 <210> 108
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> polipéptido/polinucleótido recombinante
 <400> 108
 45
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 50
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Ser
 20 25 30
 55
 Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 60
 Gly Arg Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr Asp Gly Lys Phe
 50 55 60
 65
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80

5 Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 10 Ala Arg Ser Gly Phe Ile Thr Thr Val Arg Asp Phe Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110
 15 <210> 109
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Artificial
 20 <220>
 <223> polipéptido/polinucleótido recombinante
 <400> 109
 25 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 30 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Ser
 20 25 30
 35 Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 40 Gly Arg Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr Leu Gly Lys Phe
 50 55 60
 45 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80
 50 Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 55 Ala Arg Ser Gly Phe Ile Thr Thr Val Arg Asp Phe Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110
 60 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120
 <210> 110
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>

<223> polipéptido/polinucleótido recombinante

<400> 110

5

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Phe Gln Ser Val Thr Pro Lys
1 5 10 15

10

Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Thr Phe
20 25 30

15

Gly Ile Ser Phe Ile Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro
35 40 45

20

Lys Leu Leu Ile His Glu Ala Ser Asn Gln Gly Ser Gly Val Pro Ser
50 55 60

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

25

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

30

Glu Val Pro Phe Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

35

<210> 111

<211> 111

<212> PRT

<213> Artificial

40

<220>

<223> polipéptido/polinucleótido recombinante

<400> 111

45

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Phe Gln Ser Val Thr Pro Lys
1 5 10 15

50

Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Thr Phe
20 25 30

Gly Ile Ser Phe Met Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro
35 40 45

55

Lys Leu Leu Ile His Glu Ala Ser Asn Gln Gly Ser Gly Val Pro Ser
50 55 60

60

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

5 Ser Leu Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Lys
 85 90 95
 10 Glu Val Pro Phe Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110
 15 <210> 112
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> Artificial
 20 <220>
 <223> polipéptido/polinucleótido recombinante
 <400> 112
 25 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Phe Gln Ser Val Thr Pro Lys
 1 5 10 15
 30 Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp His Phe
 20 25 30
 35 Gly Ile Ser Phe Met Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro
 35 40 45
 40 Lys Leu Leu Ile His Glu Ala Ser Asn Gln Gly Ser Gly Val Pro Ser
 50 55 60
 45 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn
 65 70 75 80
 50 Ser Leu Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Lys
 85 90 95
 55 Glu Val Pro Ile Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110
 60 <210> 113
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> polipéptido/polinucleótido recombinante
 <400> 113
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Phe Gln Ser Val Thr Pro Lys
 1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Thr Phe
 20 25 30

5

Gly Ile Ser Phe Met Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro
 35 40 45

10

Lys Leu Leu Ile His Ala Ala Ser Asn Gln Gly Ser Gly Val Pro Ser
 50 55 60

15

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

20

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

Glu Val Pro Ile Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110

25

<210> 114
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Artificial

30

<220>
 <223> polipéptido/polinucleótido recombinante

35

<400> 114
 Ser Thr Trp Met Asn
 1 5

40

<210> 115
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial

45

<220>
 <223> polipéptido/polinucleótido recombinante

50

<400> 115
 Arg Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Ala Lys Phe Lys
 1 5 10 15

55

gly

60

<210> 116
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> polipéptido/polinucleótido recombinante
 5 <400> 116
 Arg Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Val Lys Phe Lys
 1 5 10 15
 10 gly
 15 <210> 117
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial
 20 <220>
 <223> polipéptido/polinucleótido recombinante
 <400> 117
 25 Arg Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr Tyr Gly Lys Phe Lys
 1 5 10 15
 30 gly
 35 <210> 118
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial
 40 <220>
 <223> polipéptido/polinucleótido recombinante
 <400> 118
 Arg Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr Asp Gly Lys Phe Lys
 1 5 10 15
 45 gly
 50 <210> 119
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial
 55 <220>
 <223> polipéptido/polinucleótido recombinante
 <400> 119
 60 Arg Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr Leu Gly Lys Phe Lys

	1	5	10	15
5			gly	
10	<210> 120			
	<211> 12			
	<212> PRT			
	<213> Artificial			
15	<220>			
	<223> polipéptido/polinucleótido recombinante			
	<400> 120			
20	Ser Gly Phe Ile Thr Thr Val Tyr Asp Phe Asp Tyr			
	1 5 10			
25	<210> 121			
	<211> 12			
	<212> PRT			
	<213> Artificial			
30	<220>			
	<223> polipéptido/polinucleótido recombinante			
	<400> 121			
35	Ser Gly Phe Ile Thr Thr Val Arg Asp Phe Asp Tyr			
	1 5 10			
40	<210> 122			
	<211> 12			
	<212> PRT			
	<213> Artificial			
45	<220>			
	<223> polipéptido/polinucleótido recombinante			
	<400> 122			
50	Ser Gly Phe Ile Thr Thr Val His Asp Phe Asp Tyr			
	1 5 10			
55	<210> 123			
	<211> 15			
	<212> PRT			
	<213> Artificial			
60	<220>			
	<223> polipéptido/polinucleótido recombinante			
	<400> 123			
65	Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Thr Phe Gly Ile Ser Phe Ile Asn			
	1 5 10 15			

5 <210> 124
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> polipéptido/polinucleótido recombinante
 <400> 124

15 Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp His Phe Gly Ile Ser Phe Met Asn
 1 5 10 15

20 <210> 125
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial

25 <220>
 <223> polipéptido/polinucleótido recombinante
 <400> 125

30 Glu Ala Ser Asn Gln Gly Ser
 1 5

35 <210> 126
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial

40 <220>
 <223> polipéptido/polinucleótido recombinante
 <400> 126

45 Gln Gln Thr Lys Glu Val Pro Phe Thr
 1 5

50 <210> 127
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial

55 <220>
 <223> polipéptido/polinucleótido recombinante
 <400> 127

60 Gln Gln Ser Lys Glu Val Pro Ile Thr
 1 5

<210> 128
 <211> 51
 <212> ADN

<213> Artificial
 <220>
 <223> polipéptido/polinucleótido recombinante
 5
 <400> 128
 gctggtggtg ccgttctata gccatagcga ggtgcagctg gtggagtctg g 51
 10
 <210> 129
 <211> 55
 <212> ADN
 <213> Artificial
 15
 <220>
 <223> polipéptido/polinucleótido recombinante
 <400> 129
 ggaagaccga tgggcccttg gtggaggctg aggagacggt gaccaggggt ccttg 55
 20
 <210> 130
 <211> 58
 <212> ADN
 25 <213> Artificial
 <220>
 <223> polipéptido/polinucleótido recombinante
 30 <400> 130
 ggtcgttcca ttactccc actccgaaat tggctgact cagtctccag acttcag 58
 35
 <210> 131
 <211> 62
 <212> ADN
 <213> Artificial
 40
 <220>
 <223> polipéptido/polinucleótido recombinante
 <400> 131
 gatgaagaca gatggtgcag ccacagtacg ttgatctcc accttgggcc ctccgccgaa 60
 45 cg 62
 50
 <210> 132
 <211> 46
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> polipéptido/polinucleótido recombinante
 55
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (17)..(17)
 60 <223> n es a, c, g, o t

<400> 132
gcctggcgga cccassncat ccaagagcta ctgaaggtga atccag 46

5 <210> 133
<211> 46
<212> ADN
<213> Artificial

10 <220>
<223> polipéptido/polinucleótido recombinante

15 <220>
<221> misc_feature
<222> (20)..(20)
<223> n es a, c, g, o t

20 <400> 133
gcctggcgga cccagttssn ccaagagcta ctgaaggtga atccag 46

25 <210> 134
<211> 46
<212> ADN
<213> Artificial

30 <220>
<223> polipéptido/polinucleótido recombinante

35 <220>
<221> misc_feature
<222> (23)..(23)
<223> n es a, c, g, o t

40 <400> 134
gcctggcgga cccagttcat ssnagagcta ctgaaggtga atccag 46

45 <210> 135
<211> 46
<212> ADN
<213> Artificial

50 <220>
<221> misc_feature
<222> (26)..(26)
<223> n es a, c, g, o t

55 <400> 135
gcctggcgga cccagttcat ccassngcta ctgaaggtga atccag 46

60 <210> 136
<211> 46
<212> ADN

<213> Artificial
 <220>
 <223> polipéptido/polinucleótido recombinante
 5
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (29)..(29)
 10 <223> n es a, c, g, o t
 <400> 136
 gcctggcgga cccagttcat ccaagassna ctgaaggtga atccag 46
 15
 <210> 137
 <211> 46
 <212> ADN
 <213> Artificial
 20
 <220>
 <223> polipéptido/polinucleótido recombinante
 25
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (17)..(17)
 <223> n es a, c, g, o t
 30
 <400> 137
 gcctggcgga cccawsncat ccaagagcta ctgaaggtga atccag 46
 35
 <210> 138
 <211> 46
 <212> ADN
 <213> Artificial
 40
 <220>
 <223> polipéptido/polinucleótido recombinante
 45
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (20)..(20)
 <223> n es a, c, g, o t
 50
 <400> 138
 gcctggcgga cccagttwsn ccaagagcta ctgaaggtga atccag 46
 55
 <210> 139
 <211> 46
 <212> ADN
 <213> Artificial
 60
 <220>
 <223> polipéptido/polinucleótido recombinante
 <220>

<221> misc_feature
 <222> (23)..(23)
 <223> n es a, c, g, o t

5 <400> 139
 gcctggcgga cccagttcat wsnagagcta ctgaaggtga atccag 46

10 <210> 140
 <211> 46
 <212> ADN
 <213> Artificial

15 <220>
 <223> polipéptido/polinucleótido recombinante

20 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (26)..(26)
 <223> n es a, c, g, o t

25 <400> 140
 gcctggcgga cccagttcat ccaawsngcta ctgaaggtga atccag 46

30 <210> 141
 <211> 46
 <212> ADN
 <213> Artificial

35 <220>
 <223> polipéptido/polinucleótido recombinante

40 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (29)..(29)
 <223> n es a, c, g, o t

45 <400> 141
 gcctggcgga cccagttcat ccaagawsna ctgaaggtga atccag 46

50 <210> 142
 <211> 42
 <212> ADN
 <213> Artificial

55 <220>
 <223> polipéptido/polinucleótido recombinante

60 <400> 142
 ctggcgga cagthcatcm aagwgctact gaaggtgaat cc 42

<210> 143
 <211> 42
 <212> ADN
 <213> Artificial

	<220>		
	<223> polipéptido/polinucleótido recombinante		
	<400> 143		
5	ctggcggacc cagthcatct cagwgctact gaaggtgaat cc	42	
	<210> 144		
	<211> 42		
10	<212> ADN		
	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> polipéptido/polinucleótido recombinante		
15	<400> 144		
	ctggcggacc cagagcatcm aagwgctact gaaggtgaat cc	42	
	<210> 145		
20	<211> 42		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> polipéptido/polinucleótido recombinante		
	<400> 145		
30	ctggcggacc cagagcatct cagwgctact gaaggtgaat cc	42	
	<210> 146		
	<211> 43		
	<212> ADN		
35	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> polipéptido/polinucleótido recombinante		
40	<400> 146		
	ctgcccttga acttcscatw gtagttagda tctccatctc cag	43	
	<210> 147		
45	<211> 43		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> polipéptido/polinucleótido recombinante		
50	<400> 147		
	ctgcccttga acttcscatw gtagttatta tctccatctc cag	43	
55	<210> 148		
	<211> 43		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		
60	<220>		

	<223> polipéptido/polinucleótido recombinante	
	<400> 148	
5	ctgcccttga acttcscaag gtagttagda tctccatctc cag	43
	<210> 149	
	<211> 43	
10	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> polipéptido/polinucleótido recombinante	
15	<400> 149	
	ctgcccttga acttcscaag gtagttatta tctccatctc cag	43
	<210> 150	
20	<211> 46	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
25	<223> polipéptido/polinucleótido recombinante	
	<400> 150	
	cccagtagtc aaagtcgtra accgtagkaa taaatcctga tctagc	46
30	<210> 151	
	<211> 46	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
35	<220>	
	<223> polipéptido/polinucleótido recombinante	
	<400> 151	
40	cccagtagtc aaagtcsaaa accgtagkaa taaatcctga tctagc	46
	<210> 152	
	<211> 46	
45	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> polipéptido/polinucleótido recombinante	
50	<400> 152	
	cccagtagtc aaagtctcga accgtagkaa taaatcctga tctagc	46
	<210> 153	
55	<211> 54	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
60	<220>	
	<223> polipéptido/polinucleótido recombinante	

	<400> 153 ctgctggaac cagttvtaa aactaagcc aaaatgaata acacttcgc tggc	54
5	<210> 154 <211> 54 <212> ADN <213> Artificial	
10	<220> <223> polipéptido/polinucleótido recombinante	
15	<400> 154 ctgctggaac cagttvtaa aactaagcc aaaatgatca acacttcgc tggc	54
20	<210> 155 <211> 54 <212> ADN <213> Artificial	
25	<220> <223> polipéptido/polinucleótido recombinante	
	<400> 155 ctgctggaac cagttvtaa aactaagcc aaaagtaata acacttcgc tggc	54
30	<210> 156 <211> 54 <212> ADN <213> Artificial	
35	<220> <223> polipéptido/polinucleótido recombinante	
40	<400> 156 ctgctggaac cagttvtaa aactaagcc aaaagtatca acacttcgc tggc	54
45	<210> 157 <211> 48 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> polipéptido/polinucleótido recombinante	
50	<400> 157 ggggaccccg gatcctgat tggatgcata atggatgagg agctttgg	48
55	<210> 158 <211> 48 <212> ADN <213> Artificial	
60	<220> <223> polipéptido/polinucleótido recombinante	

	<400> 158 ggggaccccg gagtattgat tggatgcata atggatgagg agctttgg	48
5	<210> 159 <211> 48 <212> ADN <213> Artificial	
10	<220> <223> polipéptido/polinucleótido recombinante	
15	<400> 159 ggggaccccg gacctgkat tggatgcata atggatgagg agctttgg	48
20	<210> 160 <211> 48 <212> ADN <213> Artificial	
25	<220> <223> polipéptido/polinucleótido recombinante	
30	<400> 160 ggggaccccg gaccttgcckc atggatgagg agctttgg	48
35	<210> 161 <211> 48 <212> ADN <213> Artificial	
40	<220> <223> polipéptido/polinucleótido recombinante	
45	<400> 161 ggggaccccg gagtattgat tggatgcckc atggatgagg agctttgg	48
50	<210> 162 <211> 48 <212> ADN <213> Artificial	
55	<220> <223> polipéptido/polinucleótido recombinante	
60	<400> 162 ggggaccccg gacctgkat tggatgcckc atggatgagg agctttgg	48
	<210> 163 <211> 48 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> polipéptido/polinucleótido recombinante	
	<400> 163	

	ctccgccgaa cgtgawtgga acctccttag wttgctgaca gtaatacg	48
5	<210> 164 <211> 48 <212> ADN <213> Artificial	
10	<220> <223> polipéptido/polinucleótido recombinante	
	<400> 164 ctccgccgaa cgtgtttgga acctccttag wttgctgaca gtaatacg	48
15	<210> 165 <211> 38 <212> ADN <213> Artificial	
20	<220> <223> polipéptido/polinucleótido recombinante	
25	<400> 165 aactaatgcc aaaagtaata acactttcgc tggctctg	38
30	<210> 166 <211> 47 <212> ADN <213> Artificial	
35	<220> <223> polipéptido/polinucleótido recombinante	
	<400> 166 cataaaacta atgccaaaat gaataacact ttcgctggct ctgcagg	47
40	<210> 167 <211> 47 <212> ADN <213> Artificial	
45	<220> <223> polipéptido/polinucleótido recombinante	
50	<400> 167 ccagttcata aaactaatgc caaaatgatc aacactttcg ctggctc	47
55	<210> 168 <211> 39 <212> ADN <213> Artificial	
60	<220> <223> polipéptido/polinucleótido recombinante	
	<400> 168 ggatccttga ttggatgcct catggatgag gagctttgg	39

5	<210> 169 <211> 39 <212> ADN <213> Artificial	
10	<220> <223> polipéptido/polinucleótido recombinante <400> 169 gtccctccgc cgaacgtgwt tggaacctcc ttactttgc	39
15	<210> 170 <211> 43 <212> ADN <213> Artificial	
20	<220> <223> polipéptido/polinucleótido recombinante <400> 170 cctggcggac ccagttcatc tcagagctac tgaaggtgaa tcc	43
25		
30	<210> 171 <211> 43 <212> ADN <213> Artificial	
35	<220> <223> polipéptido/polinucleótido recombinante <400> 171 cctggcggac ccagttcatc tcagagctac tgaaggtgaa tcc	43
40	<210> 172 <211> 43 <212> ADN <213> Artificial	
45	<220> <223> polipéptido/polinucleótido recombinante <400> 172 cctggcggac ccagttcatc caagagctac tgaaggtgaa tcc	43
50		
55	<210> 173 <211> 42 <212> ADN <213> Artificial	
60	<220> <223> polipéptido/polinucleótido recombinante <400> 173 gaatctgcc ttgaacttcg cattgtagt agtatctcca tc	42

5	<210> 174		
	<211> 45		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> polipéptido/polinucleótido recombinante		
10	<400> 174		
	cttgcccca gtagtcaaag tctgaaccg tagtaataaa tcctg	45	
15	<210> 175		
	<211> 45		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		
	<220>		
20	<223> polipéptido/polinucleótido recombinante		
	<400> 175		
	cttgcccca gtagtcaaag tcygaaccg tagtaataaa tcctg	45	
25	<210> 176		
	<211> 32		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		
30	<220>		
	<223> polipéptido/polinucleótido recombinante		
	<400> 176		
35	ggaccccgga tcctstattg gatgcctcat gg	32	
40	<210> 177		
	<211> 43		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		
	<220>		
45	<223> polipéptido/polinucleótido recombinante		
	<400> 177		
	cctcgagggg accccggagt atstattgga tgcctcatgg atg	43	
50	<210> 178		
	<211> 32		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		
55	<220>		
	<223> polipéptido/polinucleótido recombinante		
	<400> 178		
60	ggaccccgga tcctgsattg gatgcctcat gg	32	

	<210> 179	
	<211> 43	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
5	<220>	
	<223> polipéptido/polinucleótido recombinante	
	<400> 179	
10	cctcgagggg accccggagt atgsattgga tgcctcatgg atg	43
	<210> 180	
	<211> 48	
15	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> polipéptido/polinucleótido recombinante	
20	<400> 180	
	ctccgccgaa cgtgwtgga acctccttag wttgctgaca gtaatacg	48
	<210> 181	
25	<211> 52	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
30	<223> polipéptido/polinucleótido recombinante	
	<400> 181	
35	cgccgaacgt gaatggaacc cgcttagwtt gcgcacagta atacgttgca gc	52
	<210> 182	
	<211> 48	
	<212> ADN	
40	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> polipéptido/polinucleótido recombinante	
45	<400> 182	
	cgccgaacgt gaatggaacc cgcttagwtt gctgacagta atacgttg	48
	<210> 183	
50	<211> 52	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
55	<223> polipéptido/polinucleótido recombinante	
	<400> 183	
	ctccgccgaa cgtgwtgga acctccttag wttgcgcaca gtaatacgtt gc	52
60	<210> 184	

	<211> 43		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		
5	<220>		
	<223> polipéptido/polinucleótido recombinante		
	<400> 184		
10	cctggcggac ccagttcatc caaacgtac tgaaggtaa tcc	43	
	<210> 185		
	<211> 43		
	<212> ADN		
15	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> polipéptido/polinucleótido recombinante		
20	<400> 185		
	gcctggcggg cccagtwcat cmaaacgcta ctgaaggta atc	43	
	<210> 186		
25	<211> 45		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		
	<220>		
30	<223> polipéptido/polinucleótido recombinante		
	<400> 186		
	gagcctggcg gaccagagc atcmaaacgc tactgaagggt gaac	45	
35	<210> 187		
	<211> 52		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		
40	<220>		
	<223> polipéptido/polinucleótido recombinante		
	<400> 187		
45	cttgaacttc acatwgtagt taktatctcc atctccarga taaatccggc ca	52	
	<210> 188		
	<211> 52		
50	<212> ADN		
	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> polipéptido/polinucleótido recombinante		
55	<400> 188		
	cttgaacttc acattgtagt taktatctcc atctccarga taaatccggc ca	52	
60	<210> 189		
	<211> 52		

<212> ADN
 <213> Artificial

5 <220>
 <223> polipéptido/polinucleótido recombinante

<400> 189
 cttgaacttc acatwgtagt tagtatctcc atctccarga taaatccggc ca 52

10 <210> 190
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Artificial

15 <220>
 <223> polipéptido/polinucleótido recombinante

20 <400> 190
 gtcaaagtcg cgaaccgtag kaataaatcc tgatctagc 39

25 <210> 191
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Artificial

30 <220>
 <223> polipéptido/polinucleótido recombinante

<400> 191

35 Glu Val Gln Leu Val 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 Val
 20 25 30

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

45 Gly Arg Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Val Lys Phe
 50 55 60

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

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

55 Ala Arg Ser Gly Phe Ile Thr Thr Val Arg Asp Phe Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

60 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

5 <210> 192
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> polipéptido/polinucleótido recombinante
 <400> 192

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

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

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

30 Gly Arg Ile Tyr Leu Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Val Lys Phe
 50 55 60

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

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

45 Ala Arg Ser Gly Phe Ile Thr Thr Val Arg Asp Phe Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

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

55 <210> 193
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> Artificial

60 <220>
 <223> polipéptido/polinucleótido recombinante
 <400> 193

65 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Phe Gln Ser Val Thr Pro Lys
 1 5 10 15

70 Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp His Phe
 20 25 30

5 Gly Ile Ser Phe Ile Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile His Glu Ala Ser Asn Pro Tyr Ser Gly Val Pro Ser
50 55 60

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

15 Ser Leu Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Gln Ser Lys
85 90 95

20 Glu Val Pro Ile Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

25 <210> 194
<211> 111
<212> PRT
<213> Artificial

30 <220>
<223> polipéptido/polinucleótido recombinante

<400> 194

35 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Phe Gln Ser Val Thr Pro Lys
1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Thr Phe
20 25 30

40 Gly Ile Ser Phe Met Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro
35 40 45

45 Lys Leu Leu Ile His Glu Ala Ser Asn Gln Gly Ser Gly Val Pro Ser
50 55 60

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

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

55 Glu Val Pro Phe Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

60 <210> 195

<211> 111
 <212> PRT
 <213> Artificial

5 <220>
 <223> polipéptido/polinucleótido recombinante
 <400> 195

10 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Phe Gln Ser Val Thr Pro Lys
 1 5 10 15

15 Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Thr Phe
 20 25 30

20 Gly Ile Ser Phe Met Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro
 35 40 45

Lys Leu Leu Ile His Glu Ala Ser Asn Gln Gly Ser Gly Val Pro Ser
 50 55 60

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

30 Ser Leu Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Gln Ser Lys
 85 90 95

35 Arg Val Pro Phe Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110

40 <210> 196
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> Artificial

45 <220>
 <223> polipéptido/polinucleótido recombinante
 <400> 196

50 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Phe Gln Ser Val Thr Pro Lys
 1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Ile Thr Phe
 20 25 30

55 Gly Ile Ser Phe Met Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro
 35 40 45

60 Lys Leu Leu Ile His Glu Ala Ser Asn Gln Gly Ser Gly Val Pro Ser
 50 55 60

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

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

10 Glu Val Pro Phe Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

15 <210> 197
<211> 111
<212> PRT
<213> Artificial

20 <220>
<223> polipéptido/polinucleótido recombinante

<400> 197

25 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Phe Gln Ser Val Thr Pro Lys
1 5 10 15

30 Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Thr Phe
20 25 30

35 Gly Ile Ser Phe Met Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile His Glu Ala Ser Asn Gln Gly Ser Gly Val Pro Ser
50 55 60

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

45 Ser Leu Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Gln Thr Lys
85 90 95

50 Arg Val Pro Phe Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

55 <210> 198
<211> 111
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> polipéptido/polinucleótido recombinante

60 <400> 198

ES 2 383 710 T3

1 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Phe Gln Ser Val Thr Pro Lys
 5
 10 Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Thr Phe
 15
 20 Gly Ile Ser Phe Met Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro
 25
 30 Lys Leu Leu Ile His Glu Ala Ser Asn Gln Gly Ser Gly Val Pro Ser
 35
 40 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn
 45
 50 Ser Leu Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Lys
 55
 60 Glu Val Pro Ile Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 65
 70
 75
 80
 85
 90
 95
 100
 105
 110
 115
 120
 125
 130
 135
 140
 145
 150
 155
 160
 165
 170
 175
 180
 185
 190
 195
 200
 205
 210
 215
 220
 225
 230
 235
 240
 245
 250
 255
 260
 265
 270
 275
 280
 285
 290
 295
 300
 305
 310
 315
 320
 325
 330
 335
 340
 345
 350
 355
 360
 365
 370
 375
 380
 385
 390
 395
 400
 405
 410
 415
 420
 425
 430
 435
 440
 445
 450
 455
 460
 465
 470
 475
 480
 485
 490
 495
 500
 505
 510
 515
 520
 525
 530
 535
 540
 545
 550
 555
 560
 565
 570
 575
 580
 585
 590
 595
 600
 605
 610
 615
 620
 625
 630
 635
 640
 645
 650
 655
 660
 665
 670
 675
 680
 685
 690
 695
 700
 705
 710
 715
 720
 725
 730
 735
 740
 745
 750
 755
 760
 765
 770
 775
 780
 785
 790
 795
 800
 805
 810
 815
 820
 825
 830
 835
 840
 845
 850
 855
 860
 865
 870
 875
 880
 885
 890
 895
 900
 905
 910
 915
 920
 925
 930
 935
 940
 945
 950
 955
 960
 965
 970
 975
 980
 985
 990
 995

5 Glu Val Pro Phe Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110

10 <210> 200
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> Artificial

15 <220>
 <223> polipéptido/polinucleótido recombinante

20 <400> 200

 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Phe Gln Ser Val Thr Pro Lys
 1 5 10 15

25 Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Thr Phe
 20 25 30

30 Gly Ile Ser Phe Met Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro
 35 40 45

35 Lys Leu Leu Ile His Glu Ala Ser Asn Gln Gly Ser Gly Val Pro Ser
 50 55 60

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

40 Ser Leu Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Gln Thr Lys
 85 90 95

45 Glu Val Pro Phe Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110

50 <210> 201
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> Artificial

55 <220>
 <223> polipéptido/polinucleótido recombinante

60 <400> 201

 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Phe Gln Ser Val Thr Pro Lys
 1 5 10 15

 Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Thr Phe
 20 25 30

Gly Ile Ser Phe Met Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro
 35 40 45
 5
 Lys Leu Leu Ile His Glu Ala Ser Asn Gln Gly Ser Gly Val Pro Ser
 50 55 60
 10
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn
 65 70 75 80
 15
 Ser Leu Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Gln Thr Lys
 85 90 95
 20
 Glu Val Pro Asn Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110
 <210> 202
 <211> 111
 <212> PRT
 25 <213> Artificial
 <220>
 <223> polipéptido/polinucleótido recombinante
 30 <400> 202
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Phe Gln Ser Val Thr Pro Lys
 1 5 10 15
 35
 Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Ile Thr Phe
 20 25 30
 40
 Gly Ile Ser Phe Met Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro
 35 40 45
 45
 Lys Leu Leu Ile His Glu Ala Ser Asn Thr Tyr Ser Gly Val Pro Ser
 50 55 60
 50
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn
 65 70 75 80
 55
 Ser Leu Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Gln Ser Lys
 85 90 95
 60
 Arg Val Pro Phe Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110
 <210> 203
 <211> 111

<212> PRT
 <213> Artificial

 <220>
 5 <223> polipéptido/polinucleótido recombinante

 <400> 203

 10 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Phe Gln Ser Val Thr Pro Lys
 1 5 10 15

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

 <210> 204
 <211> 111
 <212> PRT
 40 <213> Artificial

 <220>
 <223> polipéptido/polinucleótido recombinante

 45 <400> 204

 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Phe Gln Ser Val Thr Pro Lys
 1 5 10 15
 50 Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Thr Phe
 20 25 30
 55 Gly Ile Ser Phe Met Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro
 35 40 45
 60 Lys Leu Leu Ile His Glu Ala Ser Asn Pro Gly Ser Gly Val Pro Ser
 50 55 60

ES 2 383 710 T3

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

5

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

10

Arg Val Pro Phe Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110

15

<210> 205
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> Artificial

20

<220>
 <223> polipéptido/polinucleótido recombinante
 <400> 205

25

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Phe Gln Ser Val Thr Pro Lys
 1 5 10 15

30

Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Ile His Phe
 20 25 30

35

Gly Ile Ser Phe Met Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro
 35 40 45

40

Lys Leu Leu Ile His Glu Ala Ser Asn Arg Gly Ser Gly Val Pro Ser
 50 55 60

45

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

50

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

55

Glu Val Pro Ile Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110

60

<210> 206
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> polipéptido/polinucleótido recombinante
 <400> 206

ES 2 383 710 T3

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Phe Gln Ser Val Thr Pro Lys
 1 5 10 15

5 Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Thr Phe
 20 25 30

10 Gly Leu Ser Phe Met Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro
 35 40 45

15 Lys Leu Leu Ile His Glu Ala Ser Asn Pro Tyr Ser Gly Val Pro Ser
 50 55 60

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

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

25 Glu Val Pro Phe Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110

30 <210> 207
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> Artificial

35 <220>
 <223> polipéptido/polinucleótido recombinante
 <400> 207

40 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Phe Gln Ser Val Thr Pro Lys
 1 5 10 15

45 Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Ile Thr Phe
 20 25 30

Gly Ile Ser Phe Ile Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro
 35 40 45

50 Lys Leu Leu Ile His Glu Ala Ser Asn Pro Tyr Ser Gly Val Pro Ser
 50 55 60

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

60 Ser Leu Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Gln Thr Lys
 85 90 95

	Arg Val Pro Phe Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
	100 105 110
5	<210> 208 <211> 5 <212> PRT <213> Artificial
10	<220> <223> polipéptido/polinucleótido recombinante <400> 208
15	Ser Val Trp Met Asn 1 5
20	<210> 209 <211> 5 <212> PRT <213> Artificial
25	<220> <223> polipéptido/polinucleótido recombinante <400> 209
30	Ser Thr Trp Met Asn 1 5
35	<210> 210 <211> 17 <212> PRT <213> Artificial
40	<220> <223> polipéptido/polinucleótido recombinante <400> 210
45	Arg Ile Tyr Leu Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Val Lys Phe Lys 1 5 10 15
	gly
50	<210> 211 <211> 15 <212> PRT <213> Artificial
55	<220> <223> polipéptido/polinucleótido recombinante
60	<400> 211

Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp His Phe Gly Ile Ser Phe Ile Asn
1 5 10 15

5 <210> 212
<211> 15
<212> PRT
<213> Artificial

10 <220>
<223> polipéptido/polinucleótido recombinante

<400> 212

15 Arg Ala Ser Glu Ser Val Ile Thr Phe Gly Ile Ser Phe Met Asn
1 5 10 15

20 <210> 213
<211> 15
<212> PRT
<213> Artificial

25 <220>
<223> polipéptido/polinucleótido recombinante

<400> 213

30 Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Thr Phe Gly Ile Ser Phe Ile Asn
1 5 10 15

35 <210> 214
<211> 15
<212> PRT
<213> Artificial

40 <220>
<223> polipéptido/polinucleótido recombinante

<400> 214

45 Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Thr Phe Gly Ile Ser Phe Arg Asn
1 5 10 15

50 <210> 215
<211> 15
<212> PRT
<213> Artificial

55 <220>
<223> polipéptido/polinucleótido recombinante

<400> 215

60 Arg Ala Ser Glu Ser Val Ile His Phe Gly Ile Ser Phe Met Asn
1 5 10 15

<210> 216

<211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> polipéptido/polinucleótido recombinante
 <400> 216

10

Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Thr Phe Gly Leu Ser Phe Met Asn
 1 5 10 15

15

<210> 217
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial

20

<220>
 <223> polipéptido/polinucleótido recombinante
 <400> 217

25

Arg Ala Ser Glu Ser Val Ile Thr Phe Gly Ile Ser Phe Ile Asn
 1 5 10 15

30

<210> 218
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial

35

<220>
 <223> polipéptido/polinucleótido recombinante
 <400> 218

40

Glu Ala Ser Asn Pro Tyr Ser
 1 5

45

<210> 219
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial

50

<220>
 <223> polipéptido/polinucleótido recombinante
 <400> 219

55

Glu Ala Ser Asn Thr Tyr Ser
 1 5

60

<210> 220
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>

<223> polipéptido/polinucleótido recombinante
 <400> 220

5 Glu Ala Ser Asn Pro Gly Ser
 1 5

10 <210> 221
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial

15 <220>
 <223> polipéptido/polinucleótido recombinante
 <400> 221

20 Glu Ala Ser Asn Arg Gly Ser
 1 5

25 <210> 222
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial

30 <220>
 <223> polipéptido/polinucleótido recombinante
 <400> 222

35 Ala Gln Ser Lys Glu Val Pro Ile Thr
 1 5

40 <210> 223
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial

45 <220>
 <223> polipéptido/polinucleótido recombinante
 <400> 223

50 Ala Gln Ser Lys Glu Val Pro Phe Thr
 1 5

55 <210> 224
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial

60 <220>
 <223> polipéptido/polinucleótido recombinante
 <400> 224

Ala Gln Ser Lys Arg Val Pro Phe Thr

1 5

5 <210> 225
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> polipéptido/polinucleótido recombinante
 <400> 225

15 Ala Gln Thr Lys Arg Val Pro Phe Thr
 1 5

20 <210> 226
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial

25 <220>
 <223> polipéptido/polinucleótido recombinante
 <400> 226

30 Gln Gln Ser Lys Glu Val Pro Ile Thr
 1 5

35 <210> 227
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial

40 <220>
 <223> polipéptido/polinucleótido recombinante
 <400> 227

45 Ala Gln Thr Lys Glu Val Pro Phe Thr
 1 5

50 <210> 228
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial

55 <220>
 <223> polipéptido/polinucleótido recombinante
 <400> 228

60 Ala Gln Thr Lys Glu Val Pro Asn Thr
 1 5

60 <210> 229
 <211> 9

<212> PRT
 <213> Artificial

 5 <220>
 <223> polipéptido/polinucleótido recombinante

 <400> 229

 10 Gln Gln Thr Lys Arg Val Pro Phe Thr
 1 5

 15 <210> 230
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Artificial

 20 <220>
 <223> polipéptido/polinucleótido recombinante

 25 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa=Ser, Thr, Val

 <400> 230

 30 Ser Xaa Trp Met Asn
 1 5

 35 <210> 231
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial

 40 <220>
 <223> polipéptido/polinucleótido recombinante

 45 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (4)..(4)
 <223> Xaa=Pro, Leu

 50 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (12)..(12)
 <223> Xaa=Asn, Tyr, Asp, Leu

 55 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> ()..(
 <223> Xaa=Gly, Ala, Val

 <400> 231

 60 Arg Ile Tyr Xaa Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr Xaa Xaa Lys Phe Lys
 1 5 10 15

gly

5
 <210> 232
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial

10
 <220>
 <223> polipéptido/polinucleótido recombinante

15
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (8)..(8)
 <223> Xaa=Leu, Arg, Tyr, His

20
 <400> 232
 Ser Gly Phe Ile Thr Thr Val Xaa Asp Phe Asp Tyr
 1 5 10

25
 <210> 233
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial

30
 <220>
 <223> polipéptido/polinucleótido recombinante

35
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (7)..(7)
 <223> Xaa=Asp, Ile

40
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (8)..(8)
 <223> Xaa=Thr, His

45
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (11)..(11)
 <223> Xaa=Ile, Leu

50
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (14)..(14)
 <223> Xaa=Met, Ile, Arg

55
 <400> 233
 Arg Ala Ser Glu Ser Val Xaa Xaa Phe Gly Xaa Ser Phe Xaa Asn
 1 5 10 15

60
 <210> 234

<211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial

5 <220>
 <223> polipéptido/polinucleótido recombinante

10 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa=Ala, Glu

15 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (5)..(5)
 <223> Xaa=Gln, Pro, Thr

20 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (6)..(6)
 <223> Xaa=Gly, Tyr

25 <400> 234
 Xaa Ala Ser Asn Xaa Xaa Ser
 1 5

30 <210> 235
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial

35 <220>
 <223> polipéptido/polinucleótido recombinante

40 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa=Gln, Ala

45 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (3)..(3)
 <223> Xaa=Ser, Thr

50 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (5)..(5)
 <223> Xaa=Glu, Arg

55 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (8)..(8)
 <223> Xaa=Phe, Ile, Asn

60 <400> 235
 Xaa Gln Xaa Lys Xaa Val Pro Xaa Thr

1 5

5 <210> 236
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> polipéptido/polinucleótido recombinante

 <400> 236

15 Glu Val Gln Leu Val 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 Thr
 20 25 30

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

25 Gly Arg Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Val Lys Phe
 50 55 60

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

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

40 Ala Arg Ser Gly Phe Ile Thr Thr Val Arg Asp Phe Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

45 <210> 237
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Artificial

50 <220>
 <223> polipéptido/polinucleótido recombinante

55 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (20)..(20)
 <223> Xaa=Leu, Ile

60 <220>
 <221> MISC_FEATURE

<222> (27)..(27)
 <223> Xaa=Phe, Tyr

5 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (28)..(28)
 <223> Xaa=Thr, Ala

10 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (32)..(32)
 <223> Xaa=Ser, Thr, Val

15 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (38)..(38)
 <223> Xaa=Arg, Ile

20 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (48)..(48)
 <223> Xaa=Val, Ile

25 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (53)..(53)
 <223> Xaa=Leu, Pro

30 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (61)..(61)
 <223> Xaa=Asn, Tyr, Asp, Leu

35 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (62)..(62)
 <223> Xaa=Gly, Ala, Val

40 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (68)..(68)
 <223> Xaa=Phe, Ala

45 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (72)..(72)
 <223> Xaa=Arg, Ala

50 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (81)..(81)
 <223> Xaa=Leu, Met

55 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (95)..(95)
 <223> Xaa=Tyr, Ile

60 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (106)..(106)

<223> Xaa=Leu, Arg, Tyr, His

<400> 237

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

10 Ser Leu Arg Xaa Ser Cys Ala Ala Ser Gly Xaa Xaa Phe Ser Ser Xaa
20 25 30

15 Trp Met Asn Trp Val Xaa Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Xaa
35 40 45

Gly Arg Ile Tyr Xaa Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr Xaa Xaa Lys Phe
50 55 60

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

25 Xaa Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr Xaa Cys
85 90 95

30 Ala Arg Ser Gly Phe Ile Thr Thr Val Xaa Asp Phe Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

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

<210> 238
<211> 111
<212> PRT
40 <213> Artificial

<220>
<223> polipéptido/polinucleótido recombinante

45 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (30)..(30)
<223> Xaa=Asp, Ile

50 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (31)..(31)
<223> Xaa=Thr, His

55 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (34)..(34)
<223> Xaa=Ile, Leu

60 <220>

```

<221> MISC_FEATURE
<222> (37)..(37)
<223> Xaa=Met, Ile, Arg

5  <220>
    <221> MISC_FEATURE
    <222> (40)..(40)
    <223> Xaa=Phe, Tyr

10 <220>
    <221> MISC_FEATURE
    <222> (53)..(53)
    <223> Xaa=Lys, His

15 <220>
    <221> MISC_FEATURE
    <222> (54)..(54)
    <223> Xaa=Ala, Glu

20 <220>
    <221> MISC_FEATURE
    <222> (58)..(58)
    <223> Xaa=Gln, Pro, Thr

25 <220>
    <221> MISC_FEATURE
    <222> (59)..(59)
    <223> Xaa=Gly, Tyr

30 <220>
    <221> MISC_FEATURE
    <222> (91)..(91)
    <223> Xaa=Tyr, Phe

35 <220>
    <221> MISC_FEATURE
    <222> (93)..(93)
    <223> Xaa=Gln, Ala

40 <220>
    <221> MISC_FEATURE
    <222> (95)..(95)
    <223> Xaa=Ser, Thr

45 <220>
    <221> MISC_FEATURE
    <222> (97)..(97)
    <223> Xaa=Glu, Arg

50 <220>
    <221> MISC_FEATURE
    <222> (100)..(100)
    <223> Xaa=Phe, Ile, Asn

55 <400> 238

    Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Phe Gln Ser Val Thr Pro Lys
    1         5         10        15

60
    Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Xaa Xaa Phe

```

ES 2 383 710 T3

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

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un anticuerpo monoclonal humanizado purificado aislado o el fragmento de éste que comprende una VH que comprende una secuencia de aminoácidos de sec. con núm. de ident.: 106 y un dominio VL que comprende una secuencia de aminoácidos de sec. con núm. de ident.: 111, donde dicho anticuerpo se une un antígeno CD19 humano.
- 10 2. El anticuerpo de la reivindicación 1, donde dicho anticuerpo tiene el complejo de cadenas de azúcar enlazadas a N-glucósido unido a la región Fc en la que la fucosa no se une a N-acetilglucosamina en el extremo reductor de la cadena de azúcar.
- 15 3. El anticuerpo de la reivindicación 2, donde dicho anticuerpo media eficazmente la actividad ADCC *in vitro* frente a las líneas celulares Karpas-422, Karpas-1106P, y DB pero no frente a la línea celular Granta-519.
- 20 4. El anticuerpo de la reivindicación 2, donde dicho anticuerpo es capaz de depletar las células B en un modelo animal, donde dichas células B se seleccionan de un grupo que consiste de: células B circulantes, células B de la sangre, células B esplénicas, células B de la zona marginal, células B foliculares, células B peritoneales, y/o células B de médula ósea, donde dicha depleción reduce los niveles de células B al menos 50% siete días después de la administración de 2.5 mg/kg de dosis de dicho anticuerpo.
- 25 5. El anticuerpo de la reivindicación 1, donde dicho anticuerpo es una variante de Fc, donde dicha variante de Fc tiene una afinidad alterada para uno o más ligando Fc seleccionado del grupo que consiste de: C1q, FcγRI, FcγRIIA, FcγRIIB, FcγRIIIA y FcγRIV.
- 30 6. El anticuerpo de la reivindicación 5, donde dicha variante de Fc tiene una afinidad por el receptor de Fc FcγRIIIA que es al menos aproximadamente 5 veces menor que la de una molécula comparable, y donde dicha variante de Fc tiene una afinidad por el receptor de Fc FcγRIIB que está dentro de aproximadamente 2 veces la de una molécula comparable.
- 35 7. El anticuerpo de la reivindicación 6, donde dicha variante de Fc comprende las mutaciones que resultan en una mayor actividad ADCC.
8. Un ácido nucleico aislado que codifica un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de sec. con núm. de ident.: 106 o sec. con núm. de ident.: 111.
9. Una célula aislada que expresa el anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.
- 40 10. Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 en un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 45 11. Una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 para su uso en el tratamiento una enfermedad o trastorno de células B en un humano, donde dicha enfermedad o trastorno se selecciona de un grupo que consiste de: tumor maligno de células B, enfermedad autoinmune, trastorno autoinmune, rechazo humoral en un paciente humano trasplantado, enfermedad de injerto contra huésped (GVHD) y trastorno linfoproliferativo posterior al trasplante en el receptor humano trasplantado.
- 50 12. La cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 11, donde dicho tratamiento comprende la depleción de las células B seleccionadas del grupo que consiste de: células B circulantes, células B de la sangre, células B esplénicas, células B de la zona marginal, células B foliculares, células B peritoneales, células B de la médula ósea, células B progenitoras, células pro-B tempranas, células pro-B tardías, células pre-B grandes, células pre-B pequeñas, células B inmaduras, células B maduras, células B estimuladas por el antígeno, y/o células plasmáticas.
13. La cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 12, donde dicha depleción reduce los niveles de células B al menos aproximadamente 20%, y donde dicha depleción persiste durante un período de tiempo de al menos 1 semana.

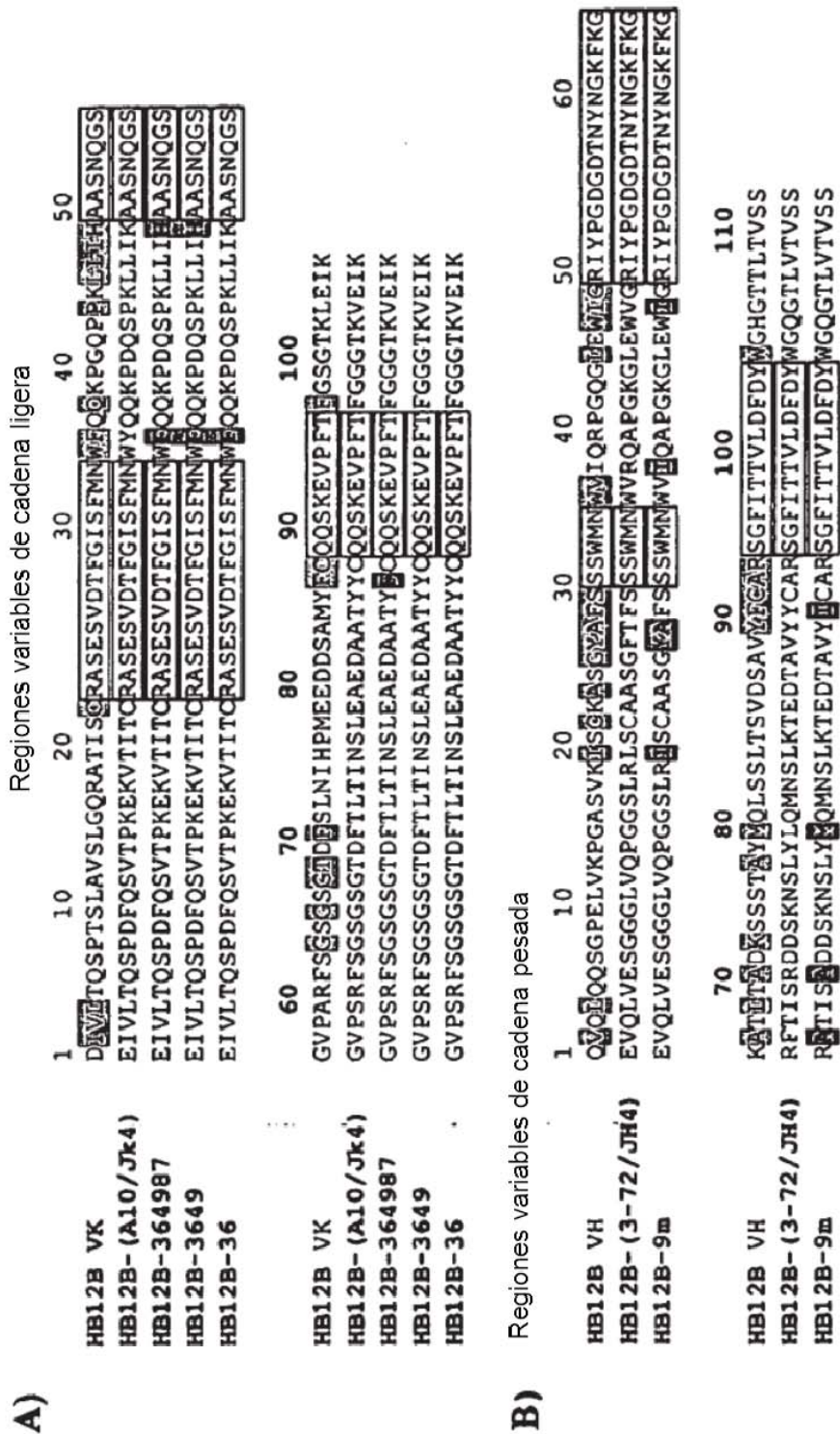


Figura 1

Unión del HB12B humanizado a las células 300B4

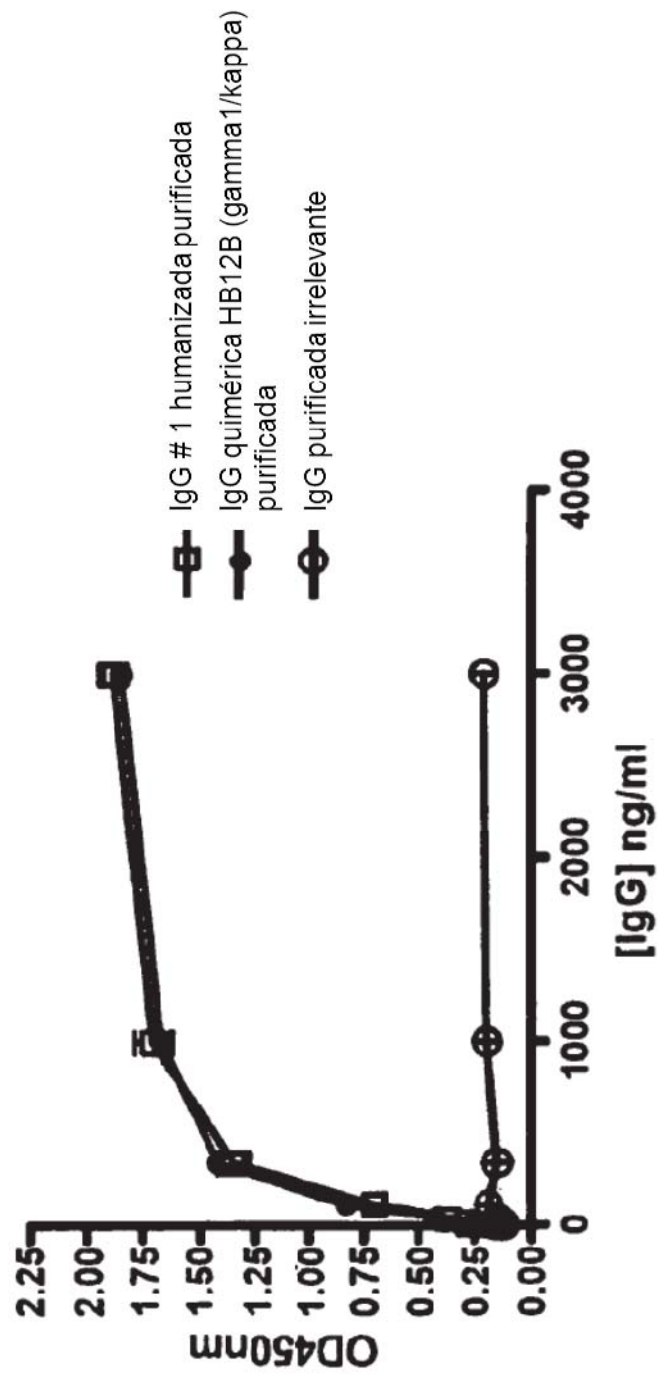


Figura 2

Unión del HB12B humanizado a las células 300B4

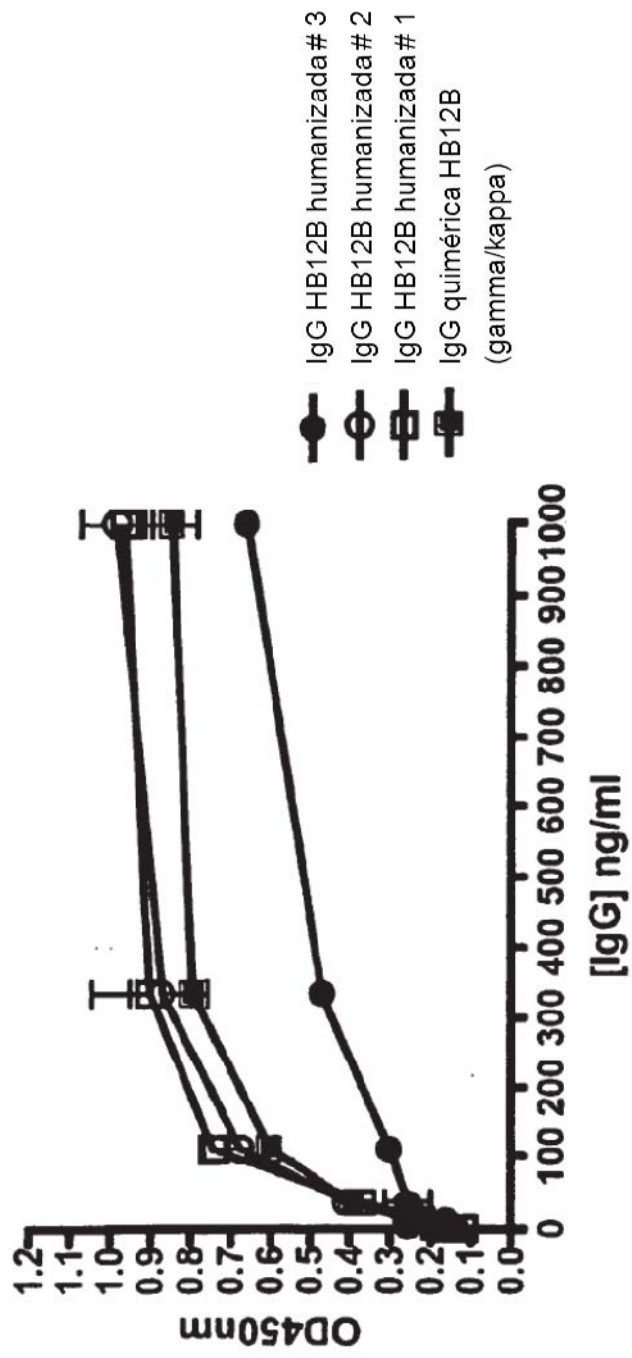


Figura 3

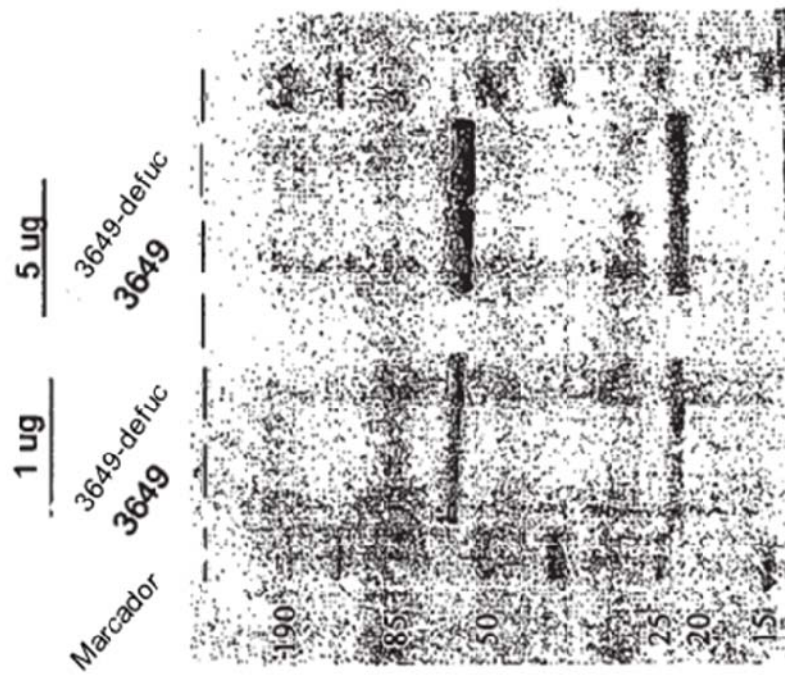


Figura 4

A)

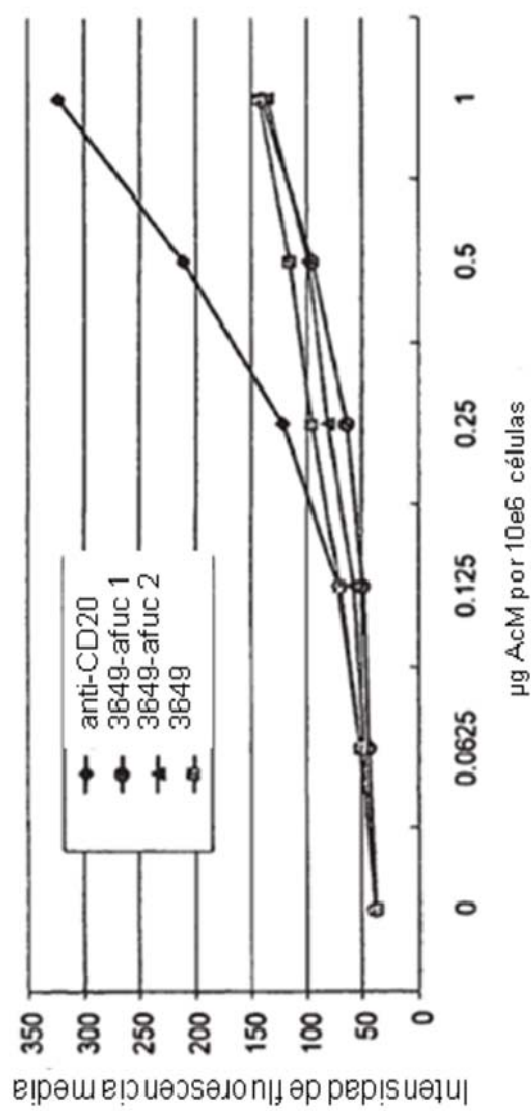


Figura 5

B)

Diana: Células Daudi

Relación efectora a diana: 2 a 1

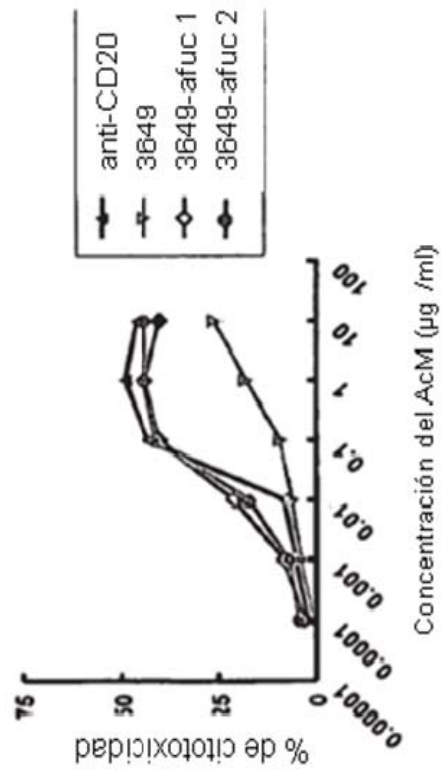


Figura 5

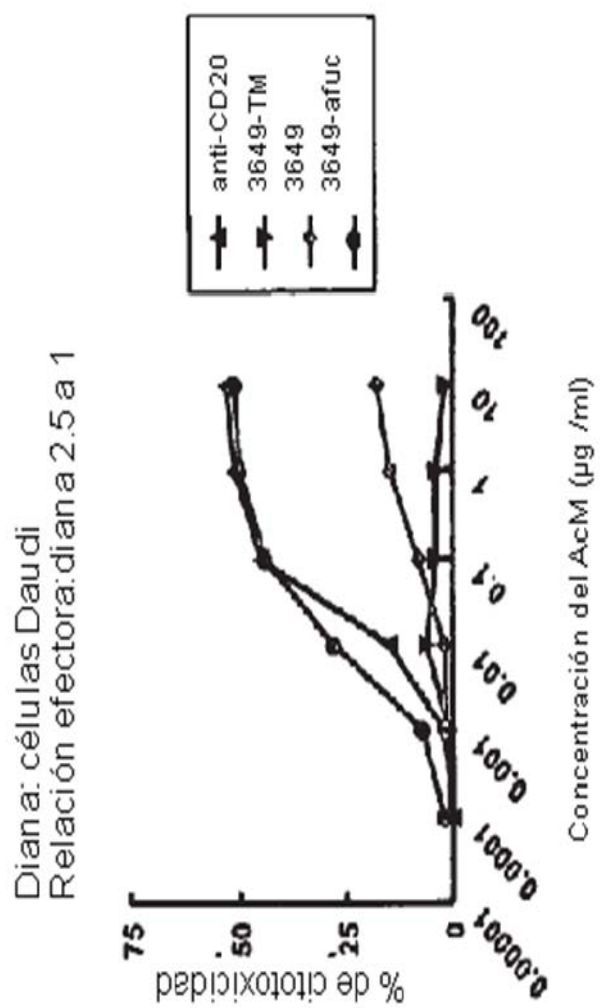


Figura 6

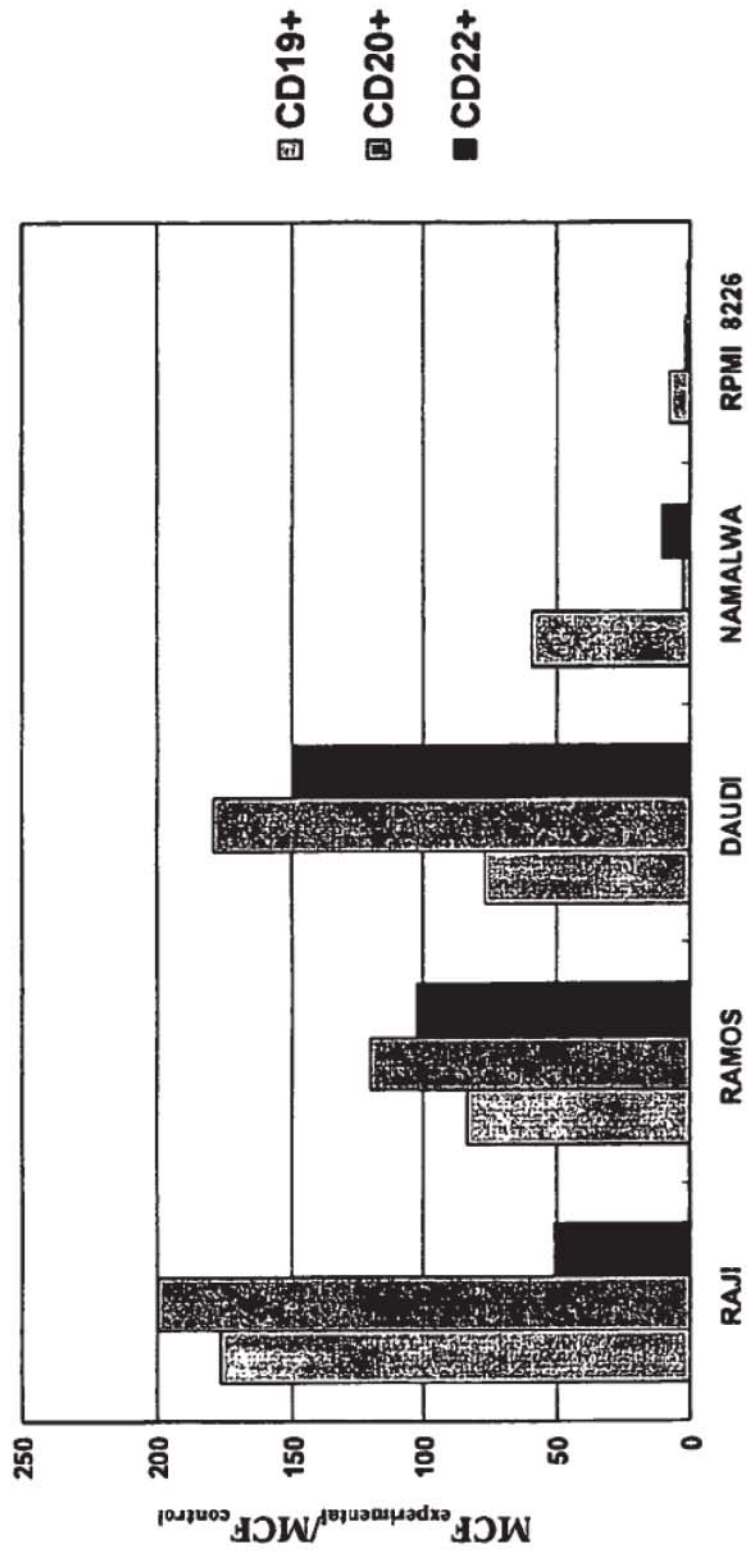


Figura 7

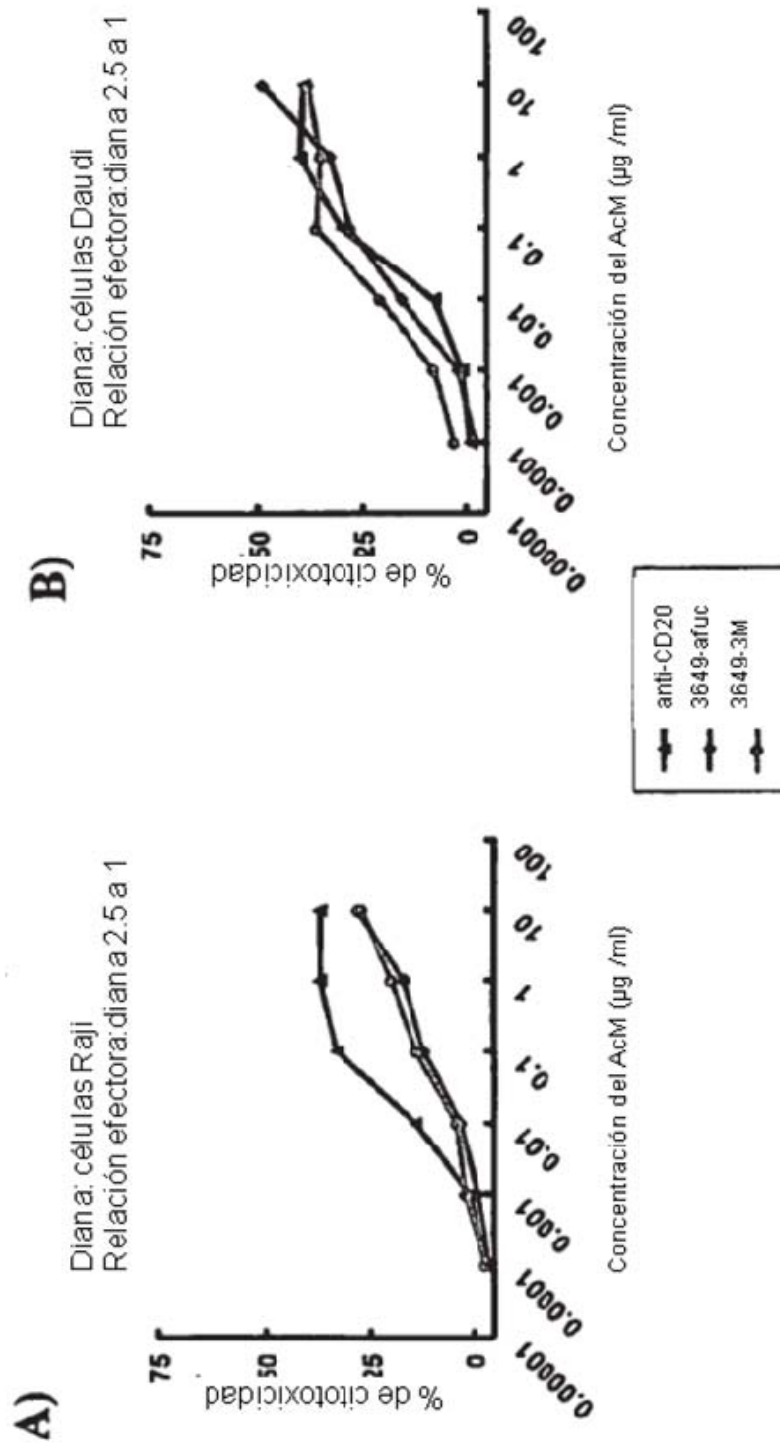


Figura 8A/B

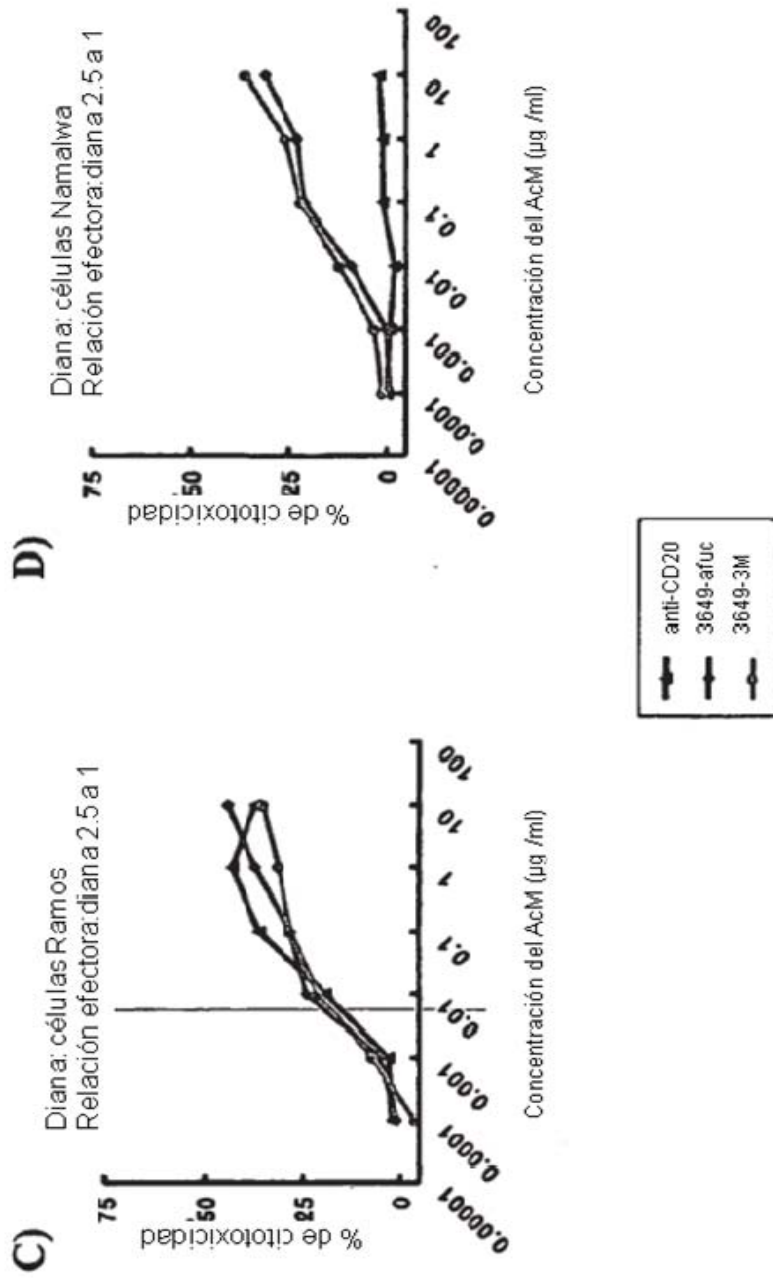


Figura 8C/D

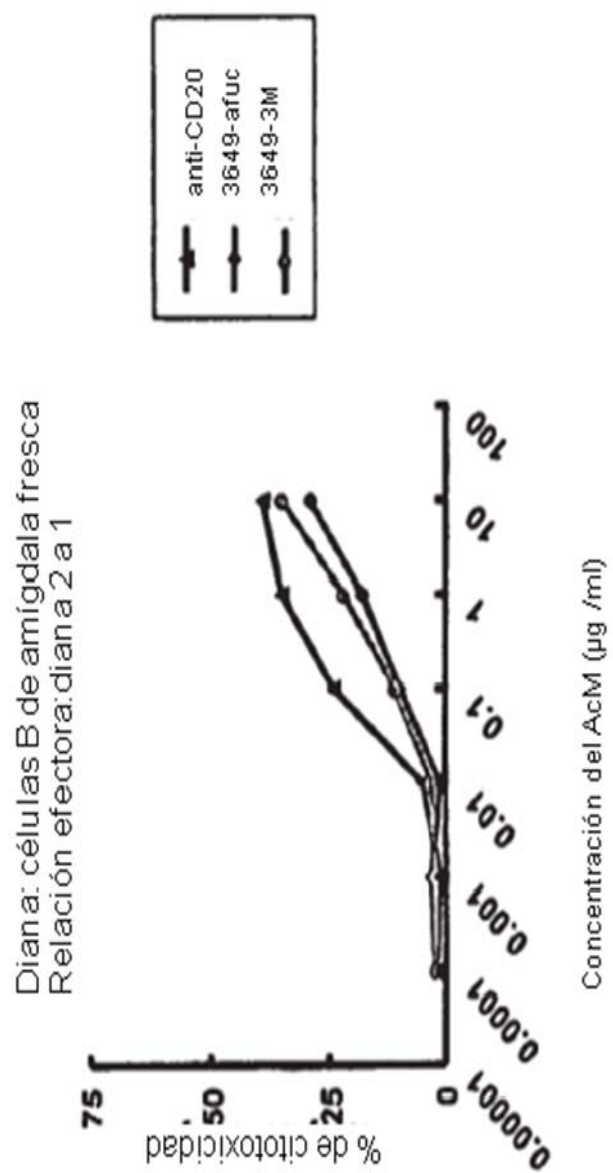


Figura 9

Intensidad de la tinción de los linfocitos B en la circulación sanguínea

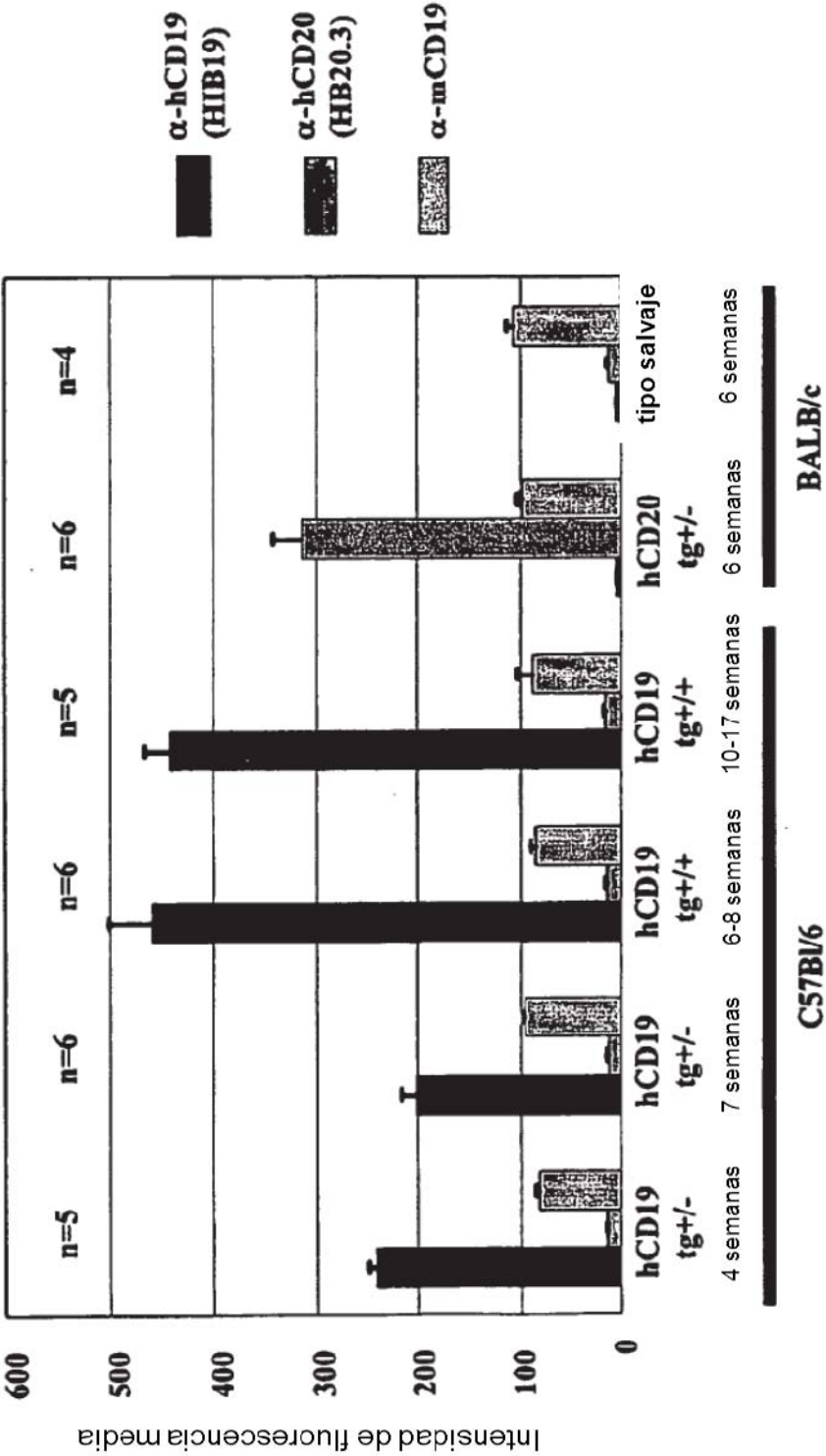


Figura 10A

Porcentaje de los linfocitos B entre los linfocitos circulantes

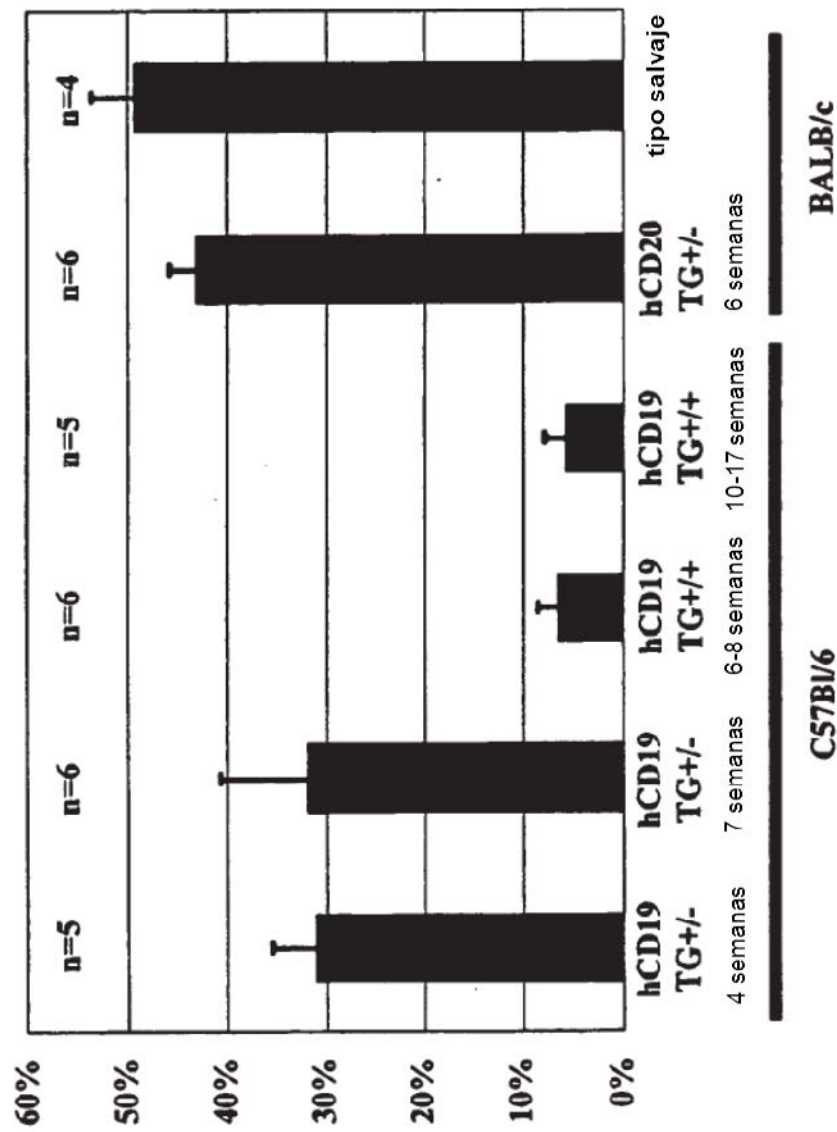


Figura 10B

Porcentaje de las células B entre los linfocitos circulantes de un ratón
hCD19 Tg+/+ 7 días después del tratamiento

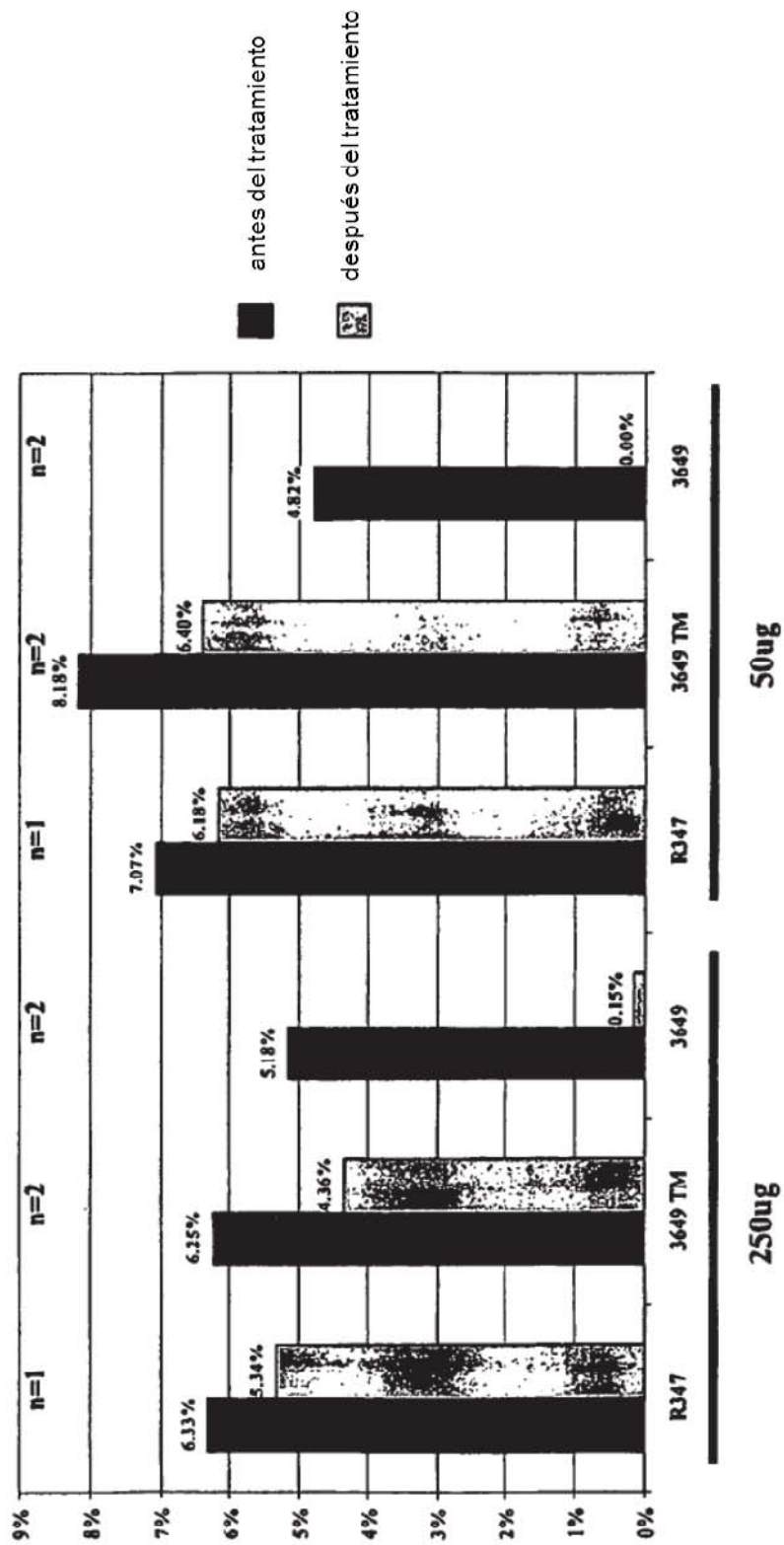


Figura 11A

Porcentaje de las células B entre los linfocitos circulantes de un ratón
hCD19 Tg+/- 7 días después del tratamiento

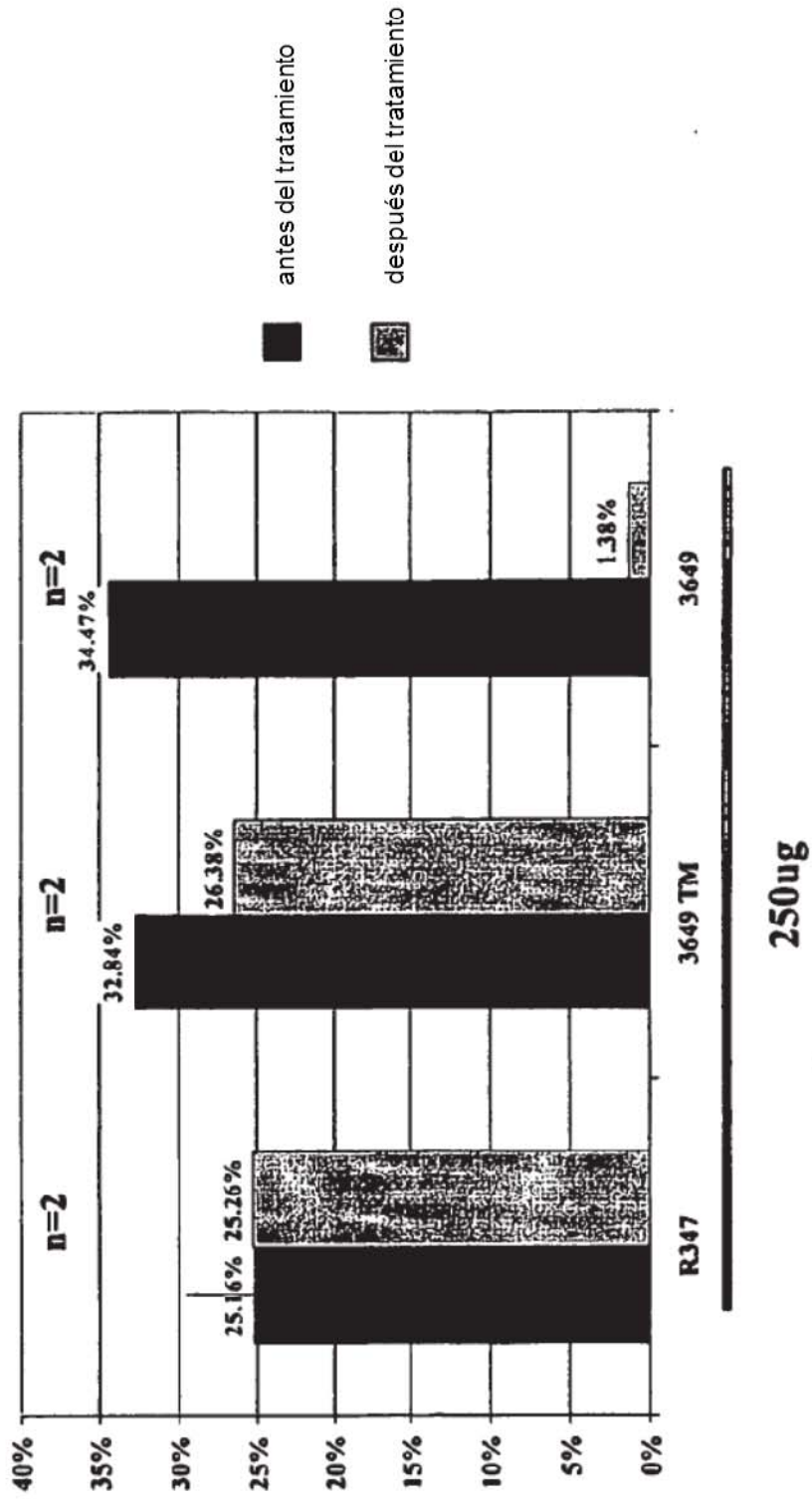


Figura 11B

Porcentaje de las células B entre los linfocitos esplénicos 7 días después del tratamiento

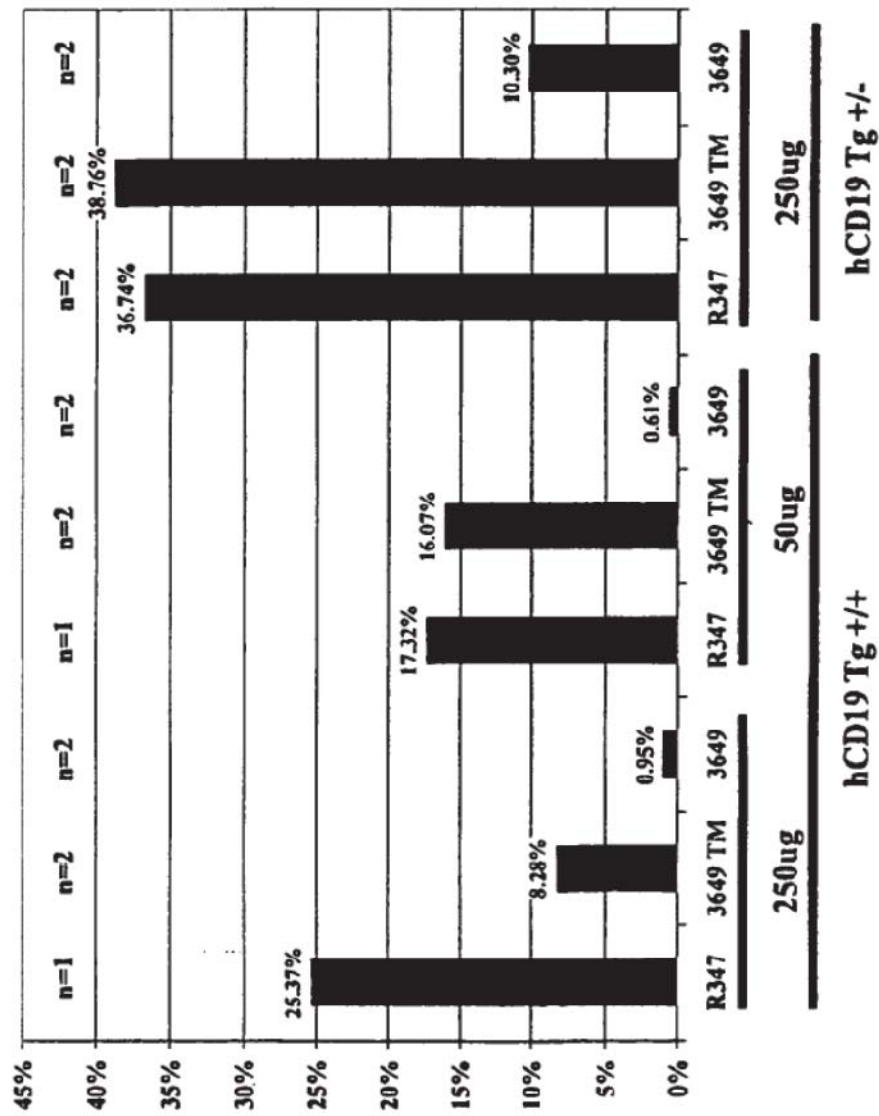


Figura 12A

Número de células B entre los linfocitos esplénicos 7 días después del tratamiento

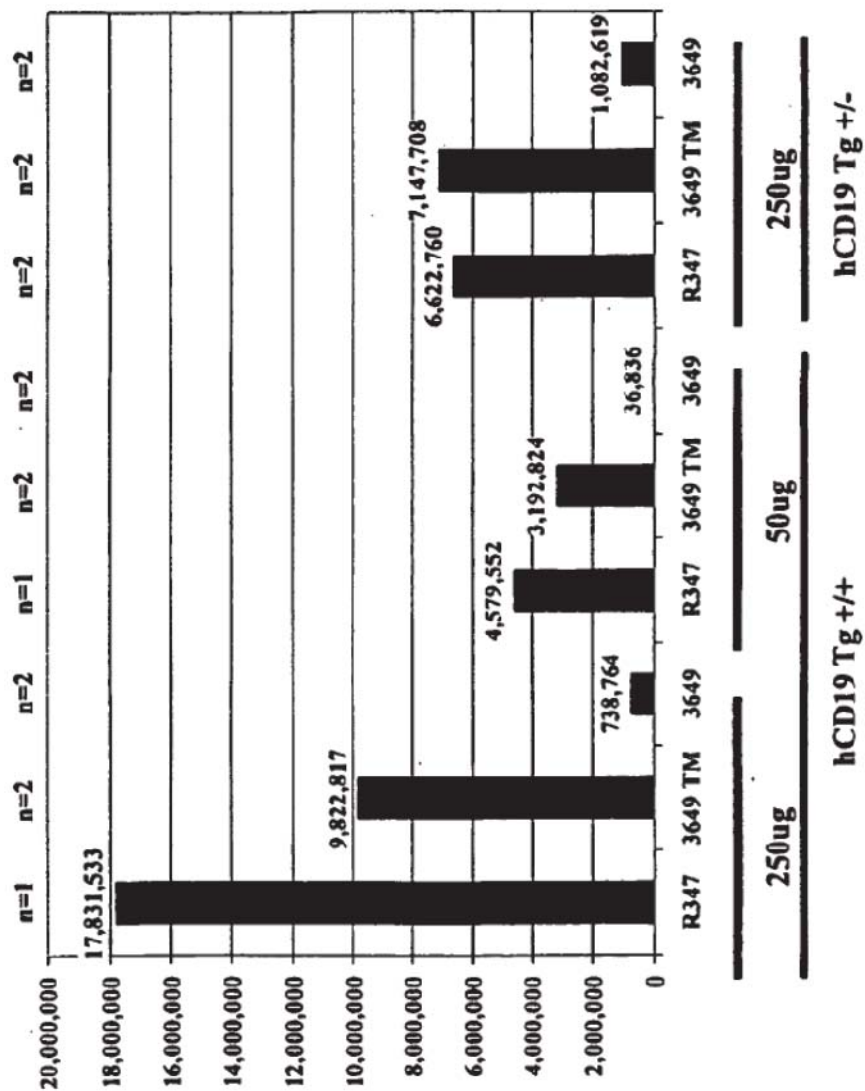
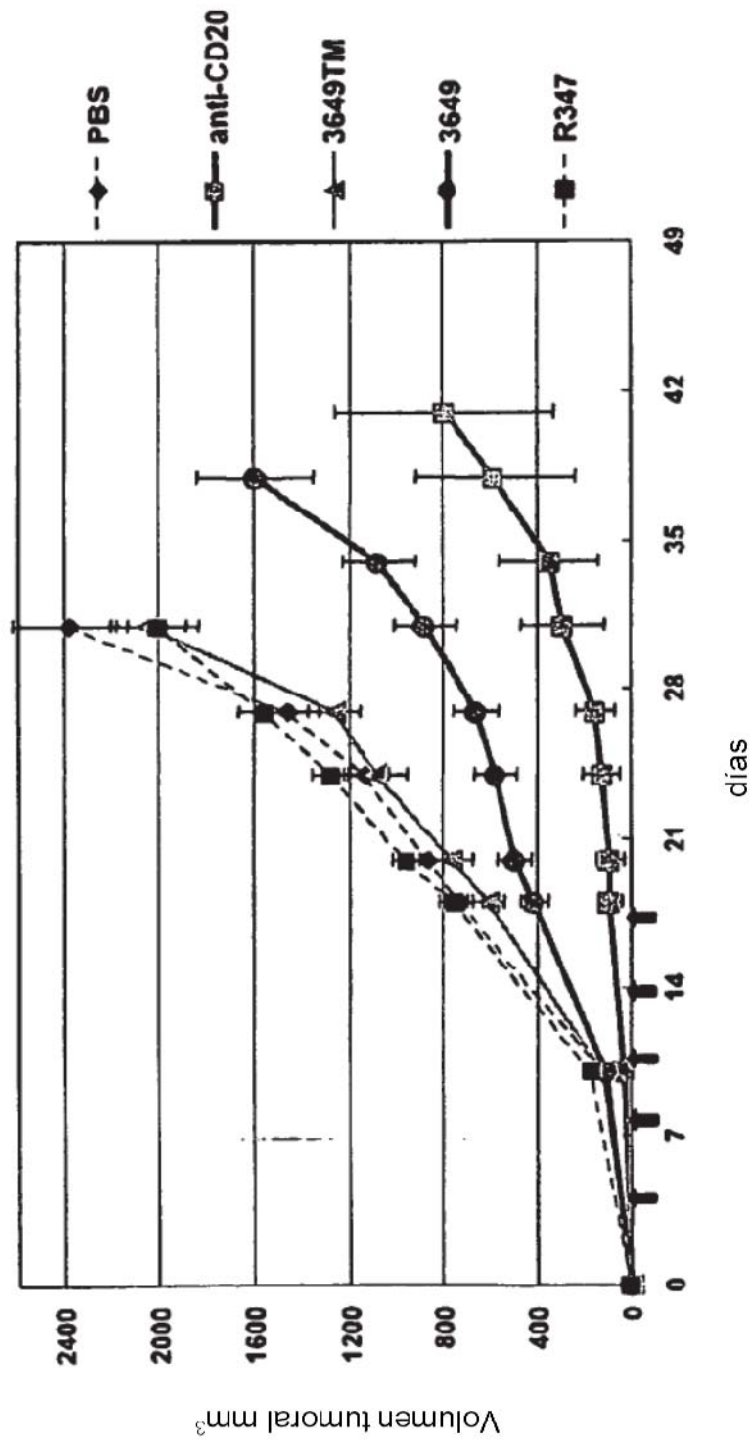


Figura 12B

El anticuerpo anti-CD19 3649 reduce significativamente el crecimiento del tumor



↑ tratamiento = 10 mg/Kg, x5 n=10

Figura 13

El anticuerpo anti-CD19 3649 reduce significativamente el crecimiento del tumor

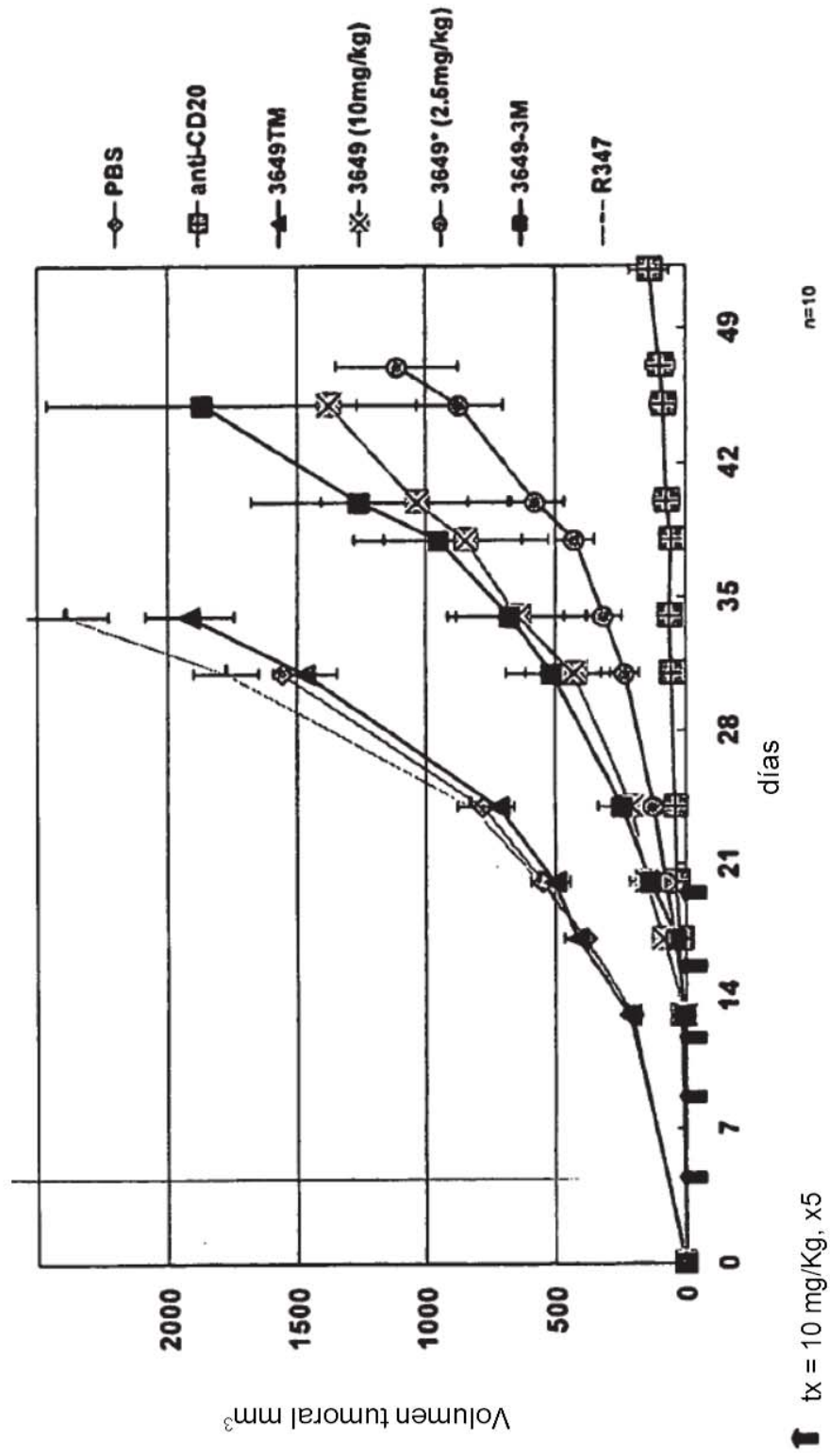


Figura 14

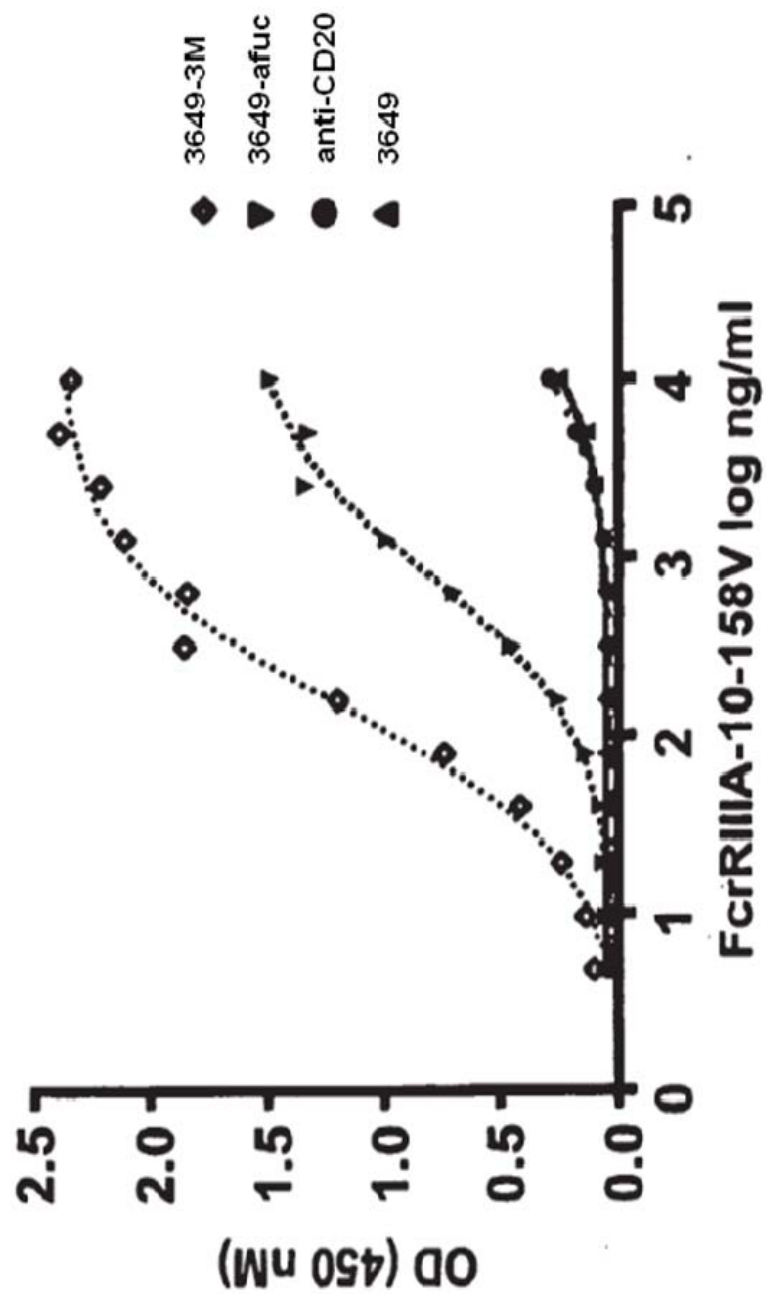


Figura 15

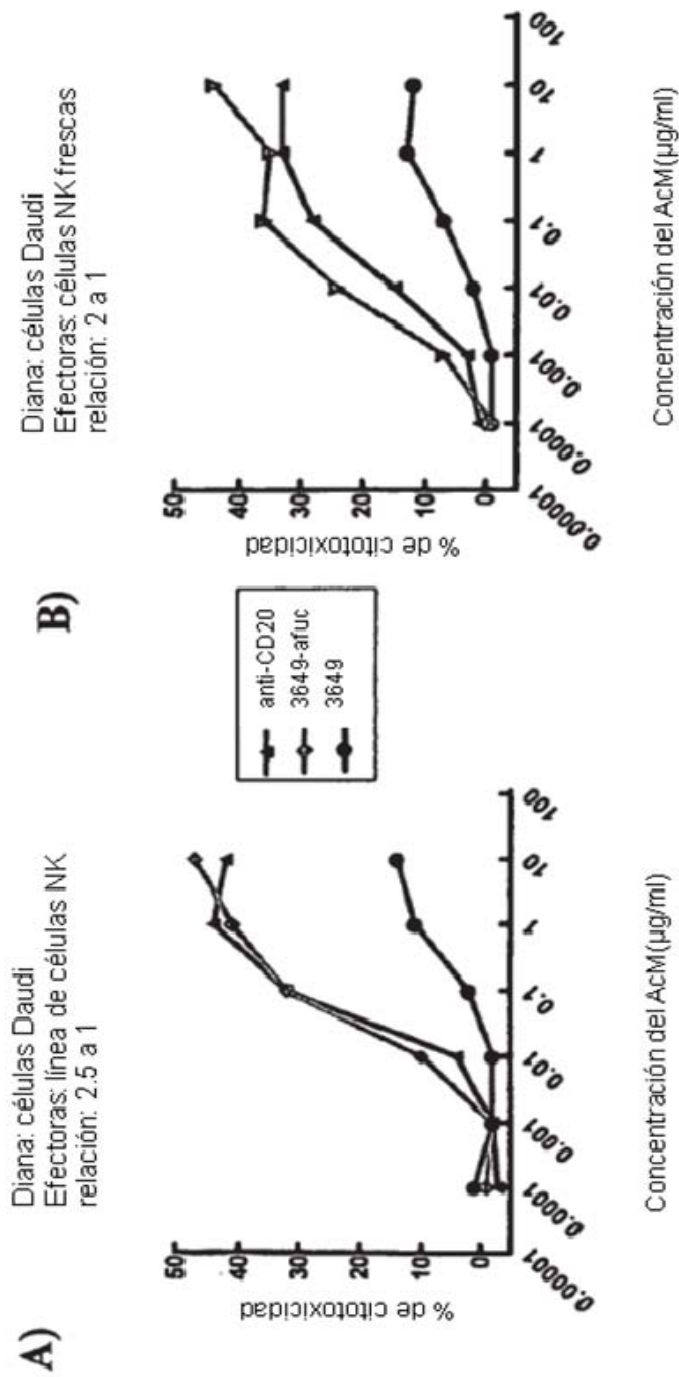


Figura 16 A/B

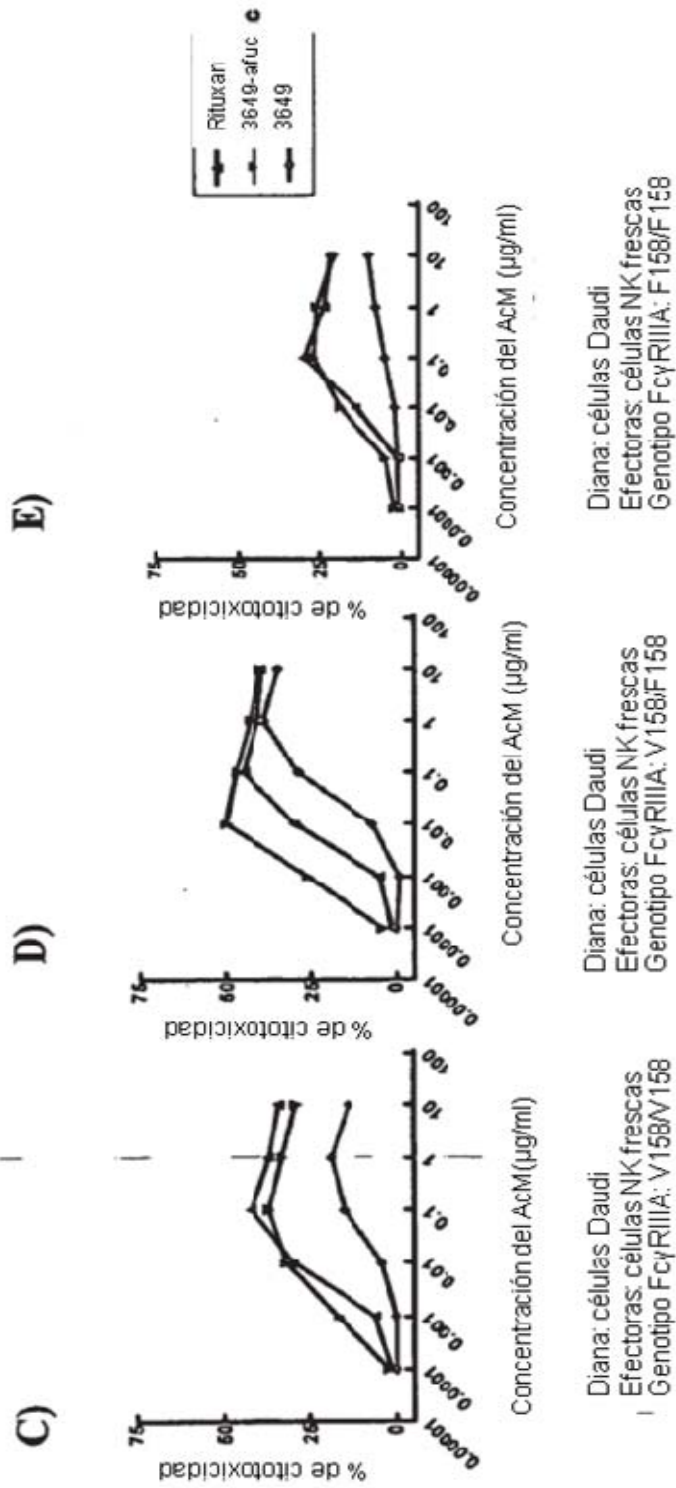


Figura 16 C/D/E

Análisis por citometría de flujo de las células B circulantes

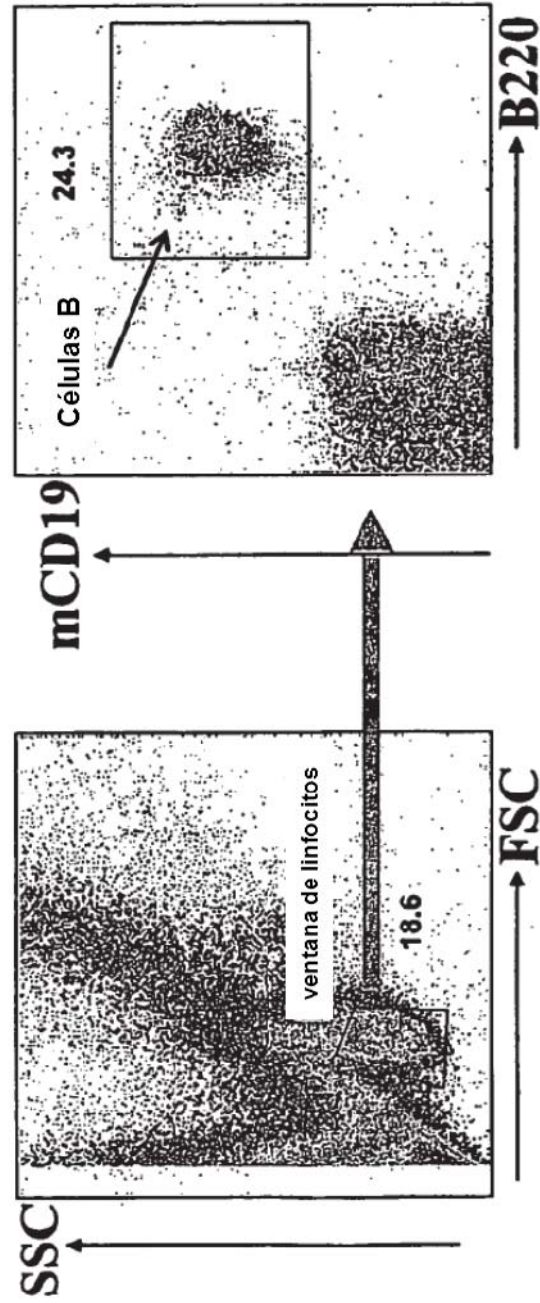


Figura 17 A

Análisis por citometría de flujo de las células B esplénicas

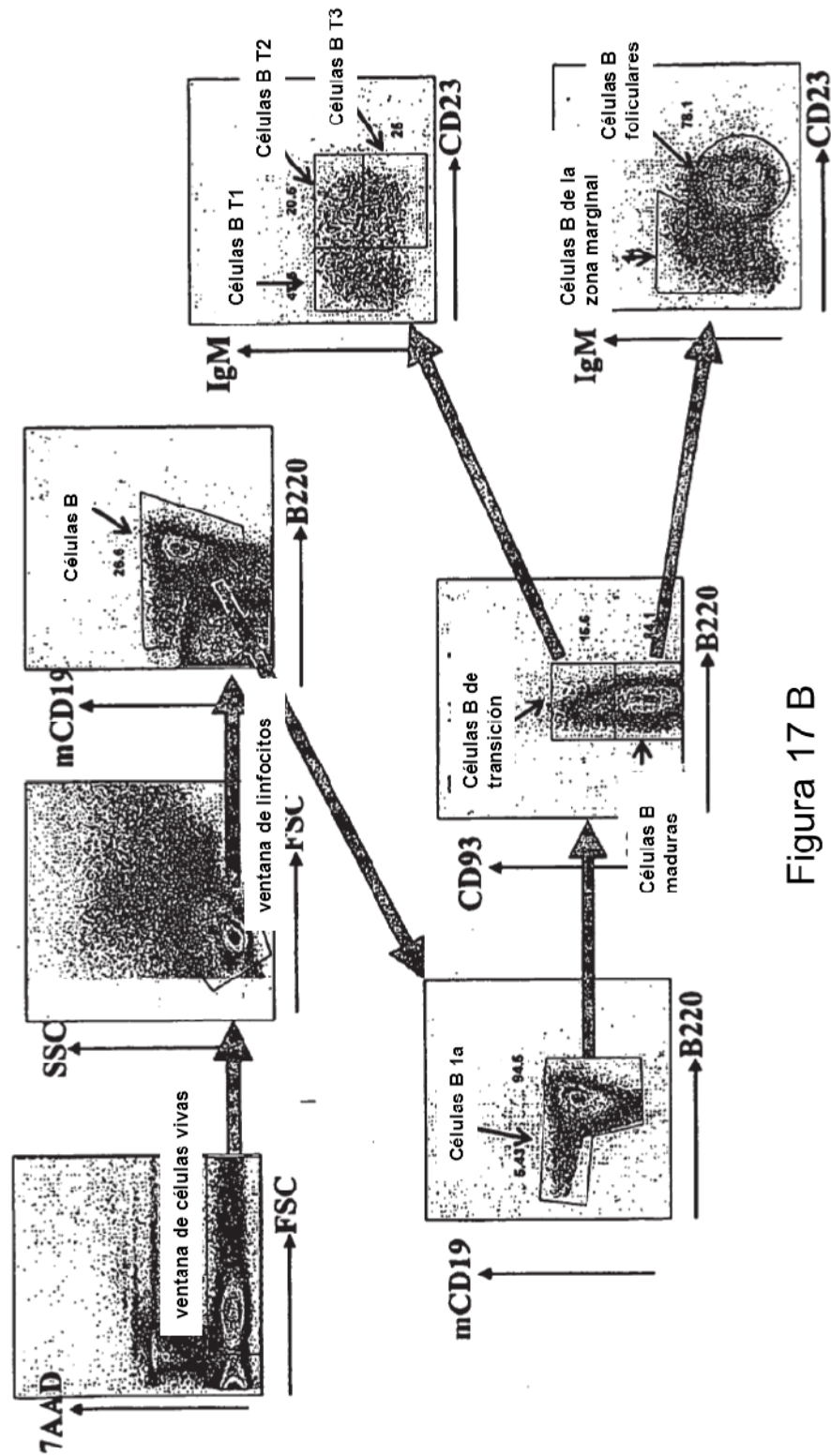


Figura 17 B

Análisis por citometría de flujo de las células B de médula ósea

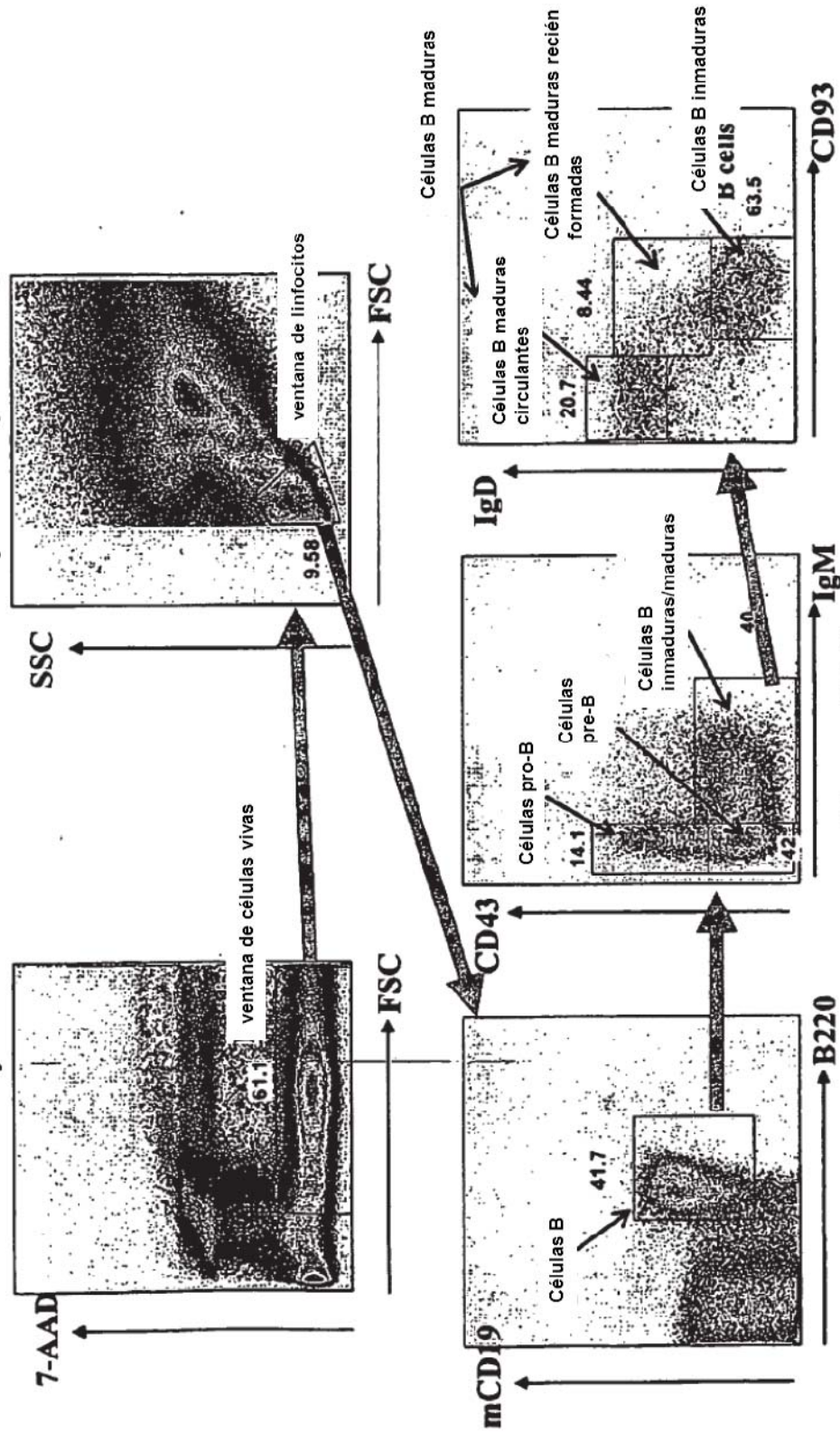


Figura 17 C

Análisis por citometría de flujo de las células B peritoneales

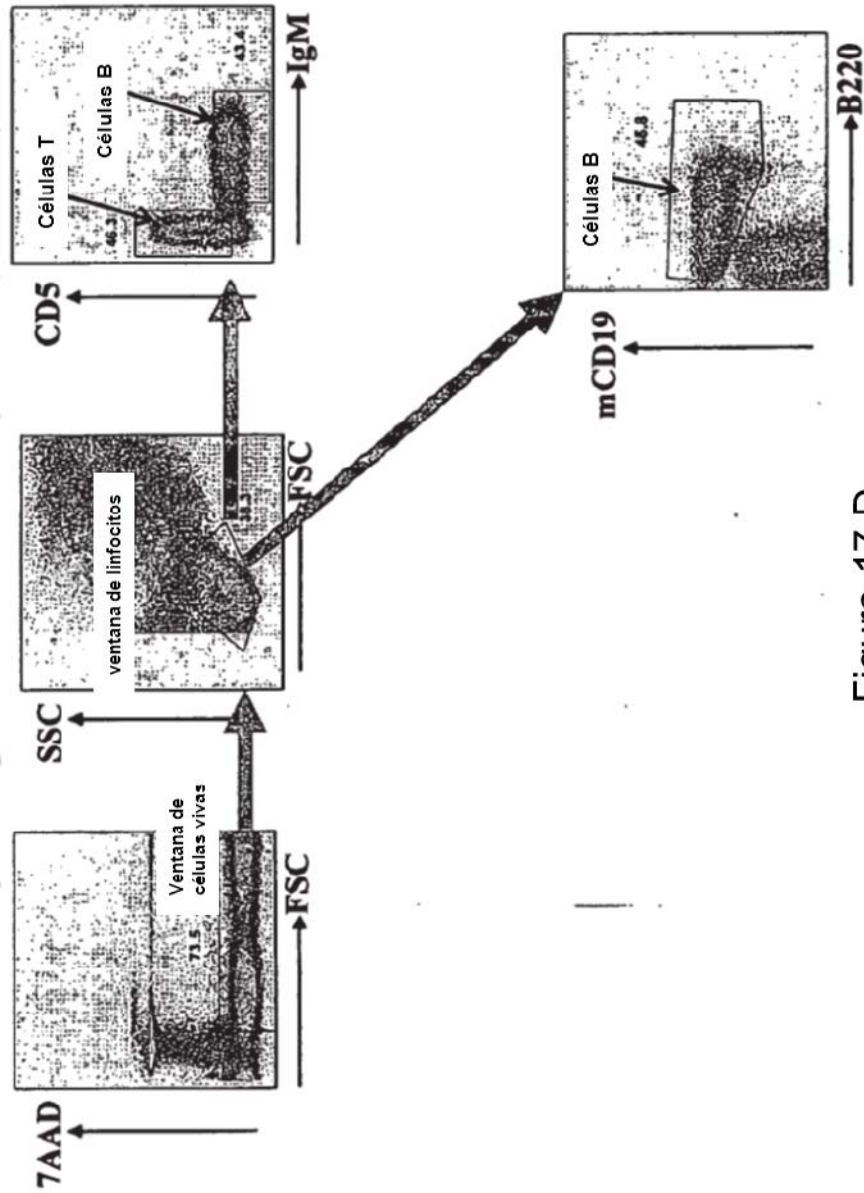


Figura 17 D

Actividad de unión de las variantes de CDR3H del Fab 3649 de afinidad optimizada sobre las células 300.B4

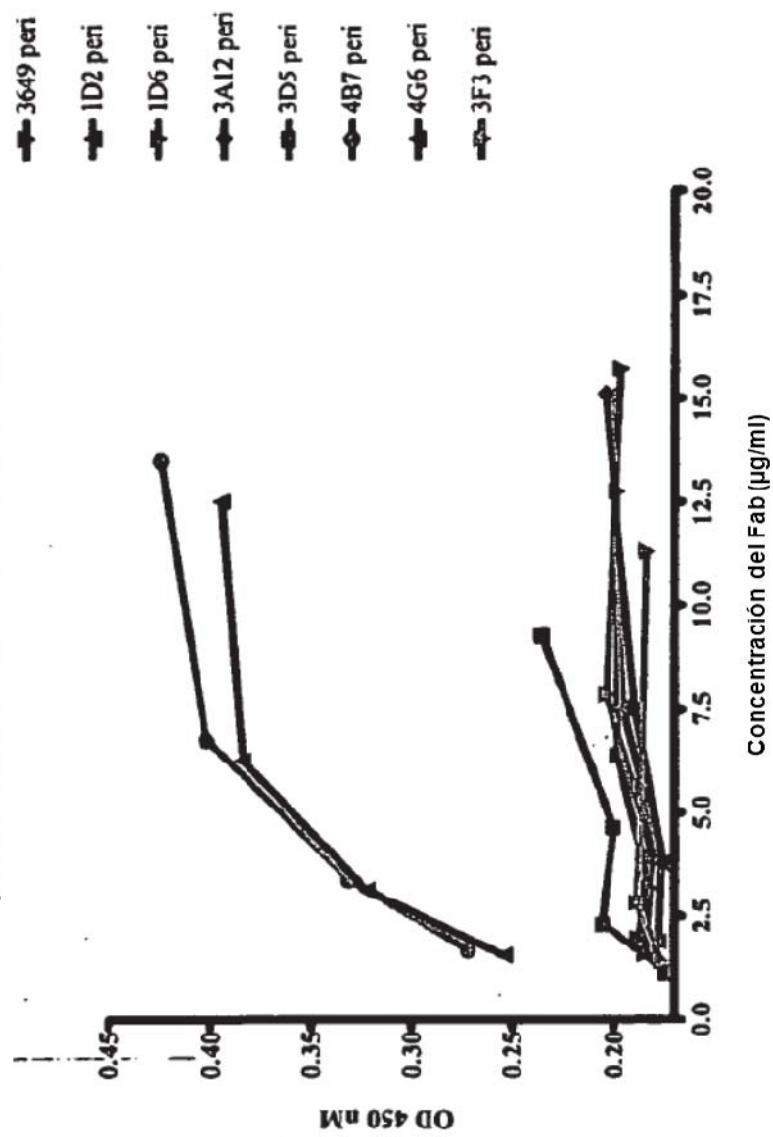


Figura 18

Actividad de unión de las variantes de Fab combinatorios 3649 de afinidad optimizada sobre las células 300.B4

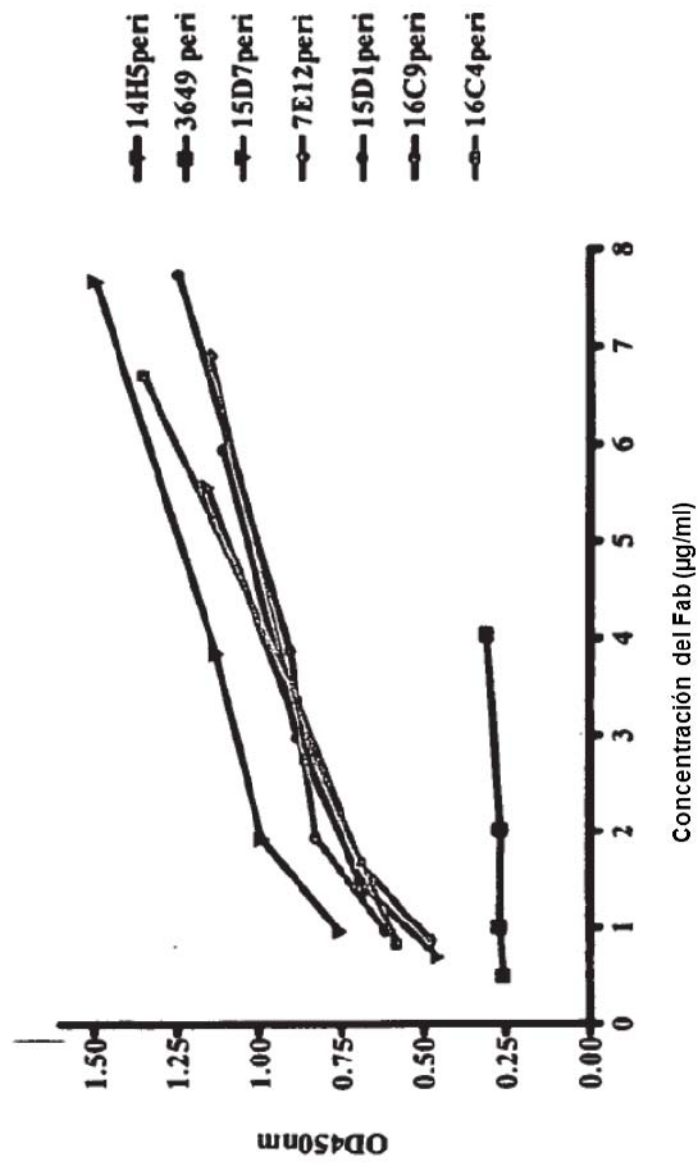


Figura 19

Actividad de unión de las variantes de IgG 3649 de afinidad optimizada sobre las células 300.B4

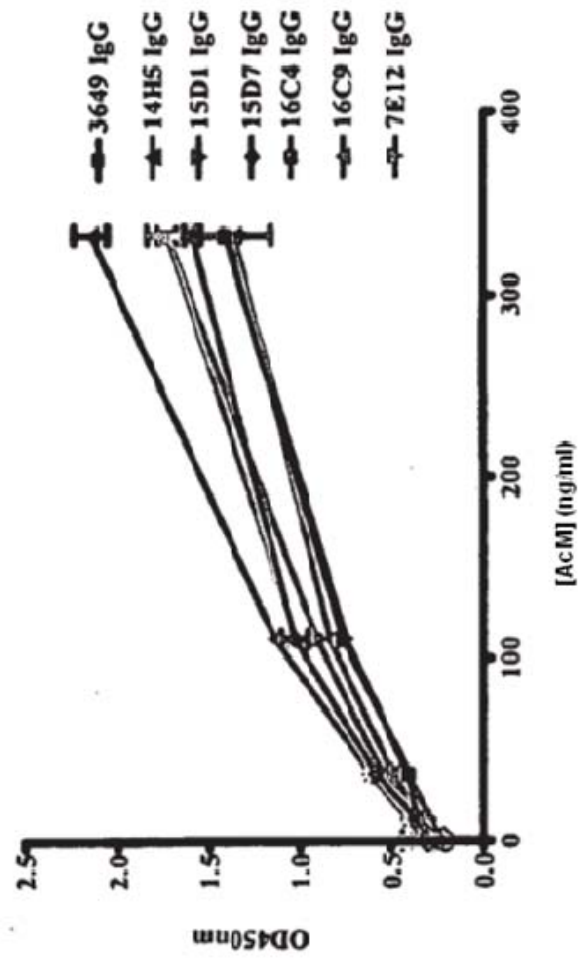


Figura 20

Actividad de unión de las variantes de IgG 3649 de afinidad optimizada sobre las células Raji

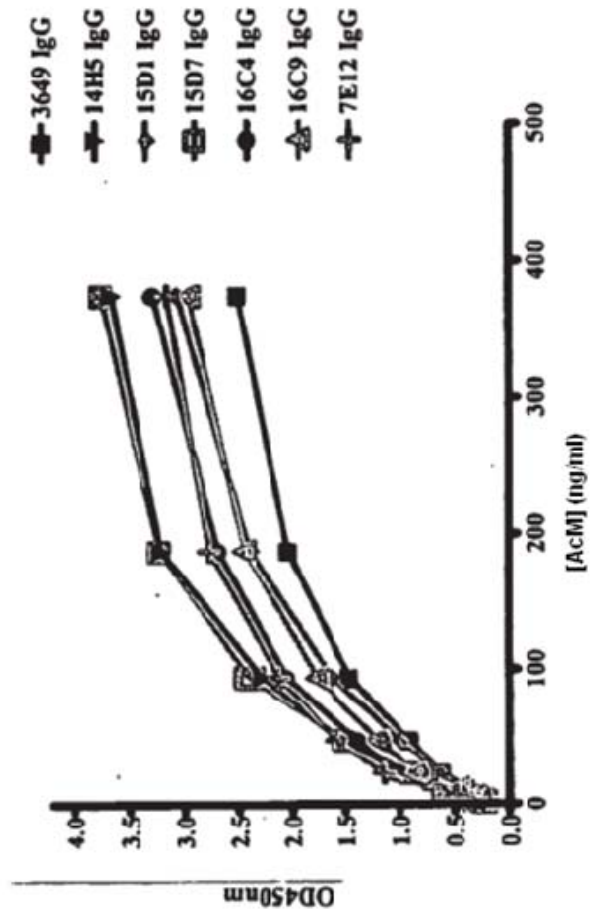


Figura 21

Actividad de unión de las variantes de IgG 3649 de afinidad optimizada sobre las células Daudi

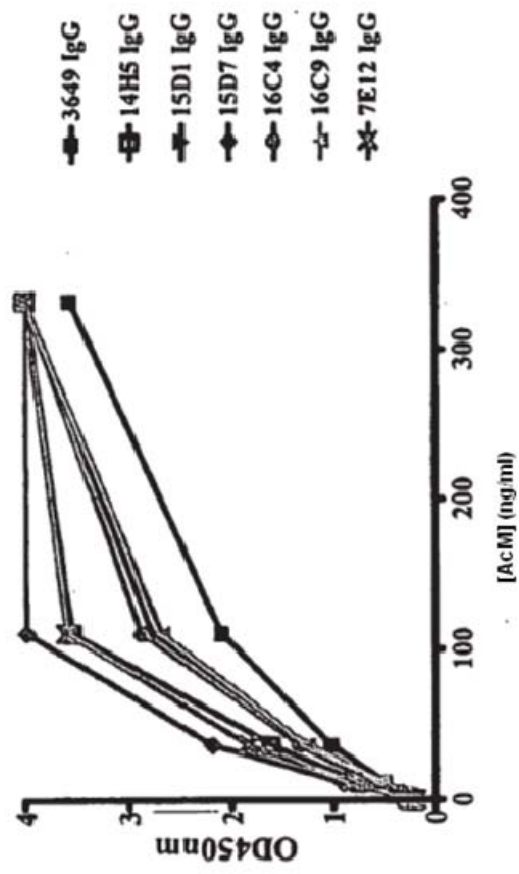


Figura 22

Actividad de las variantes noqueadas de
desamidación 14H5 sobre las células 300.B4

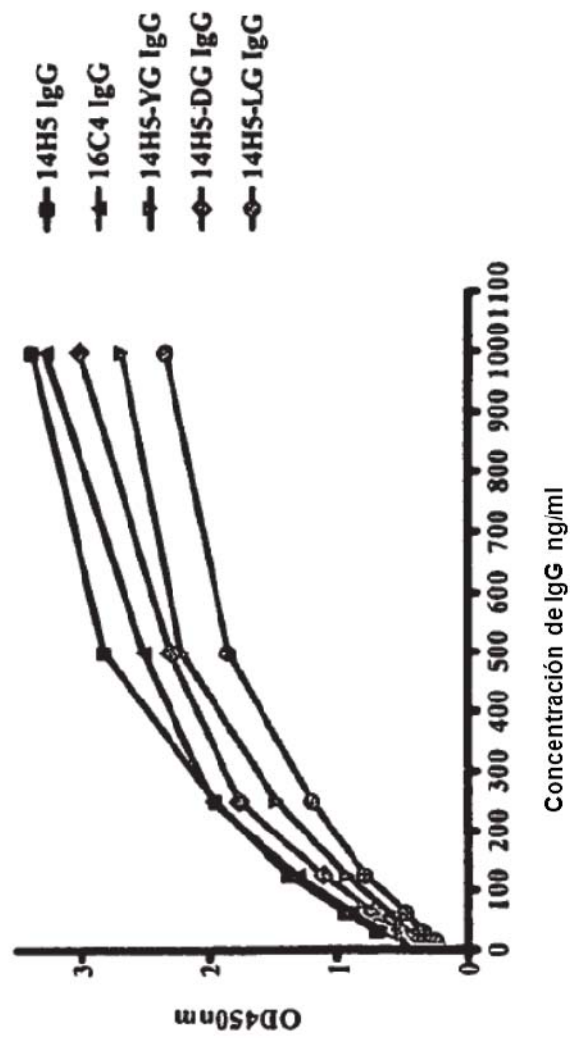


Figura 23

Estudios cinéticos de la velocidad de disociación de los anticuerpos anti-CD19 de afinidad madurada

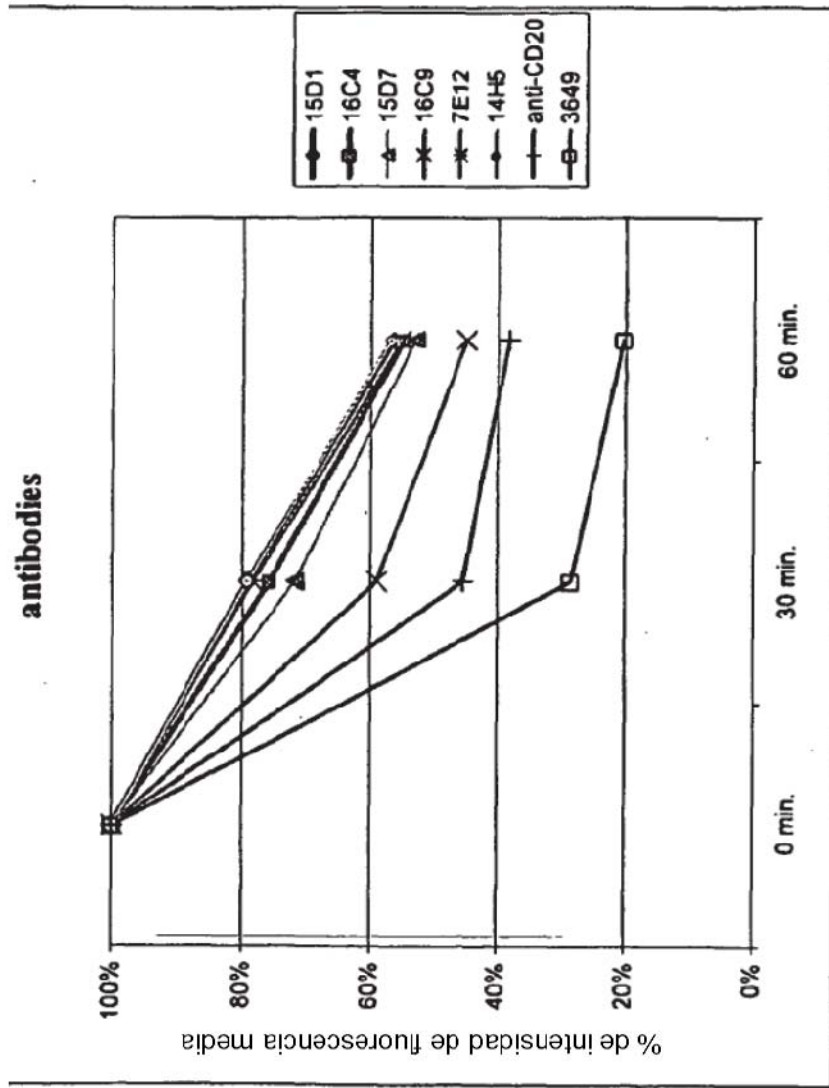


Figura 24A

Velocidad de la cinética de disociación de los anticuerpos
directamente conjugados

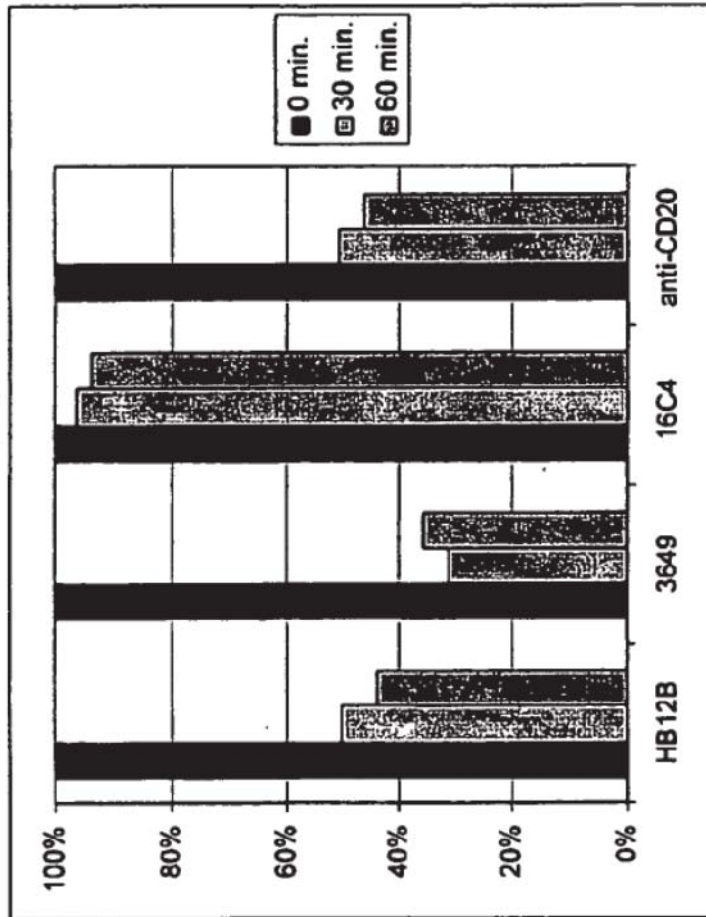


Figura 24B

Comparaciones de la unión de las variantes de afinidad optimizada sobre células Daudi; Guava #141

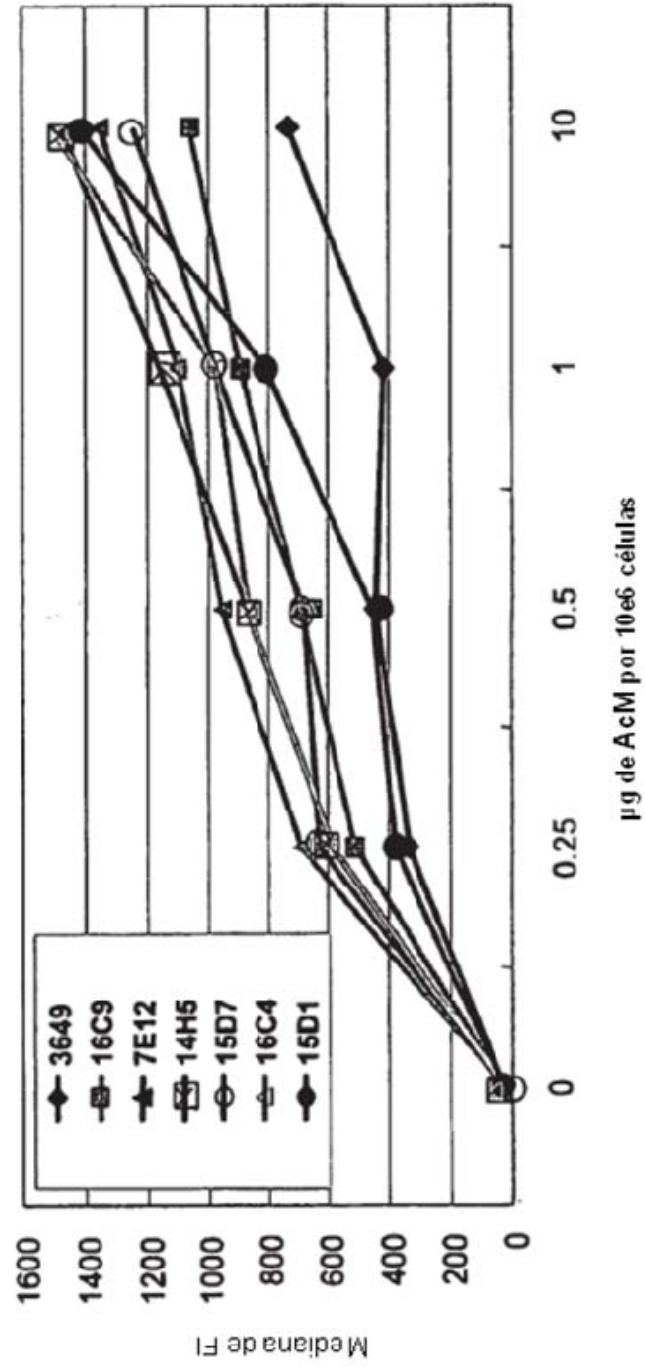


Figura 25

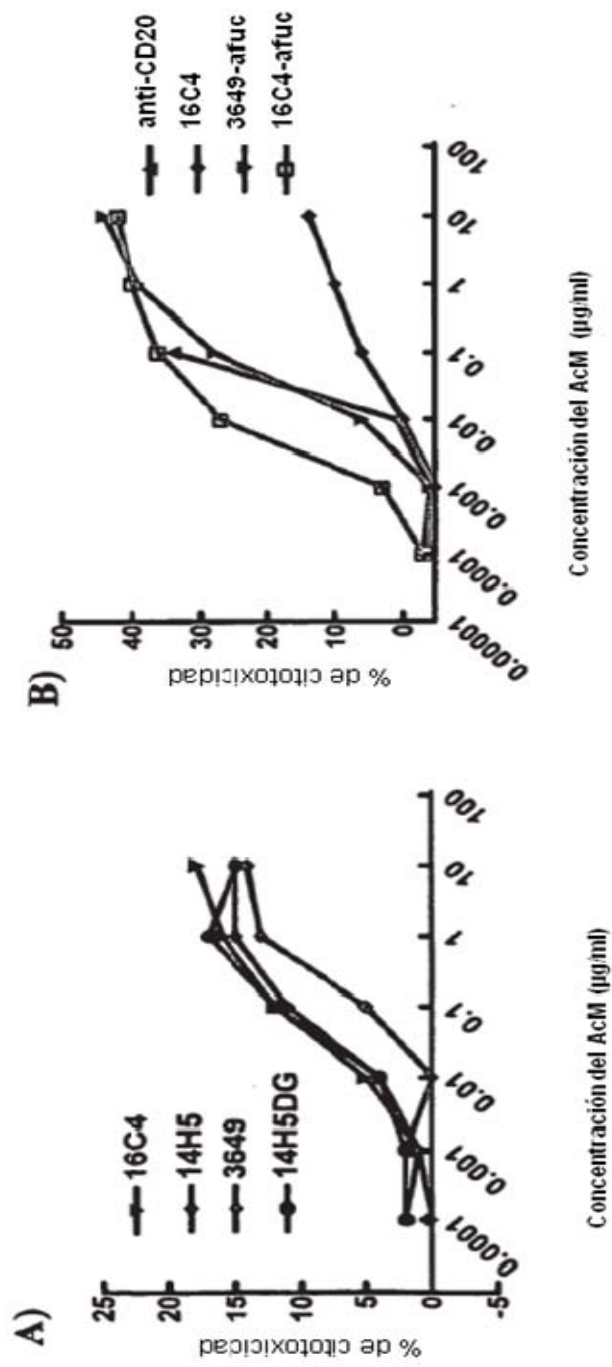


Figura 26A/B

Análisis del PI de los anticuerpos anti-CD19 de afinidad
madurada

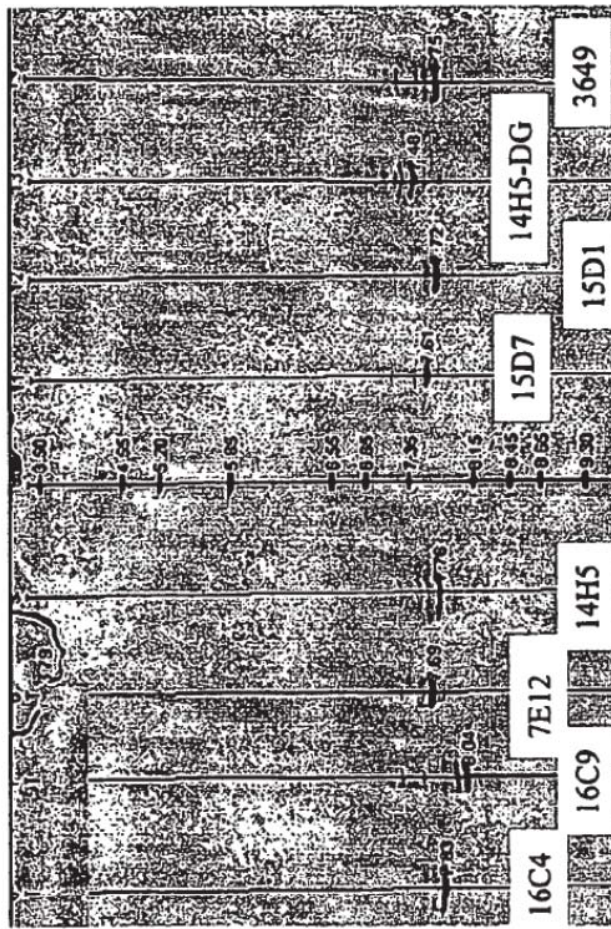


Figura 27

Porcentaje de células B entre los linfocitos circulantes de un ratón hCD19tg +/- 7 días después del tratamiento con el anticuerpo

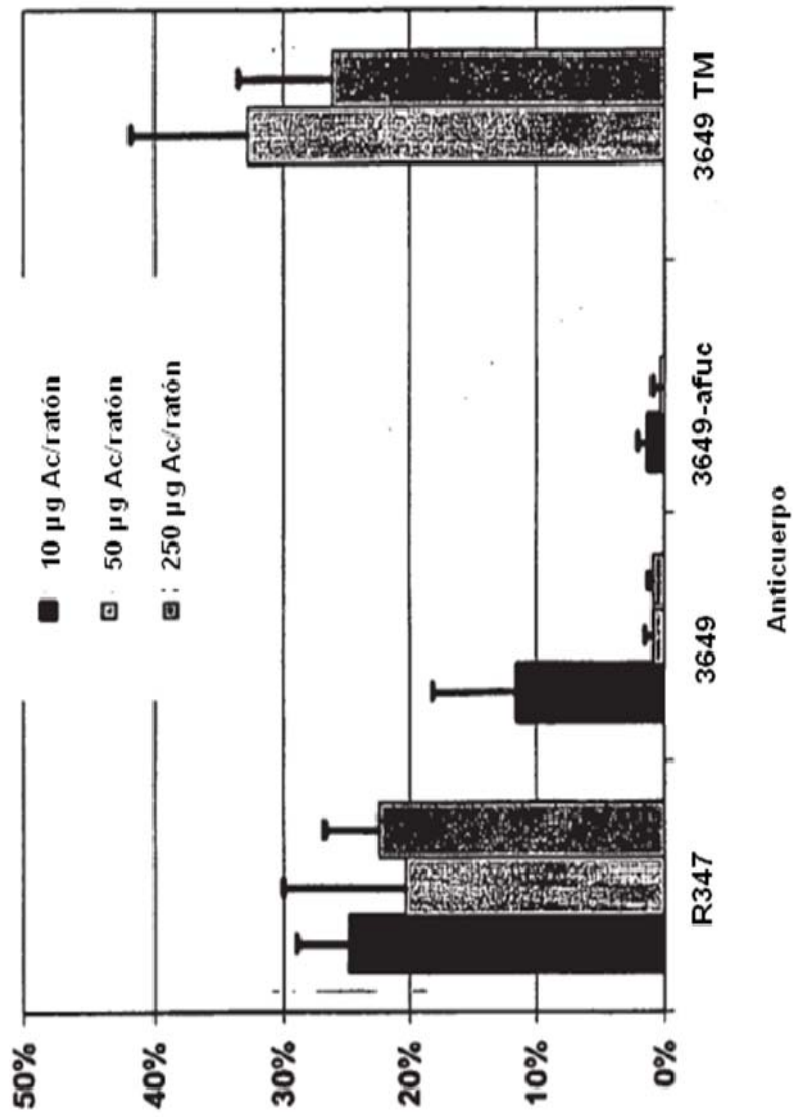


Figura 28A

Porcentaje de células B entre los linfocitos esplénicos de un ratón hCD19tg +/- 7 días después del tratamiento con el anticuerpo

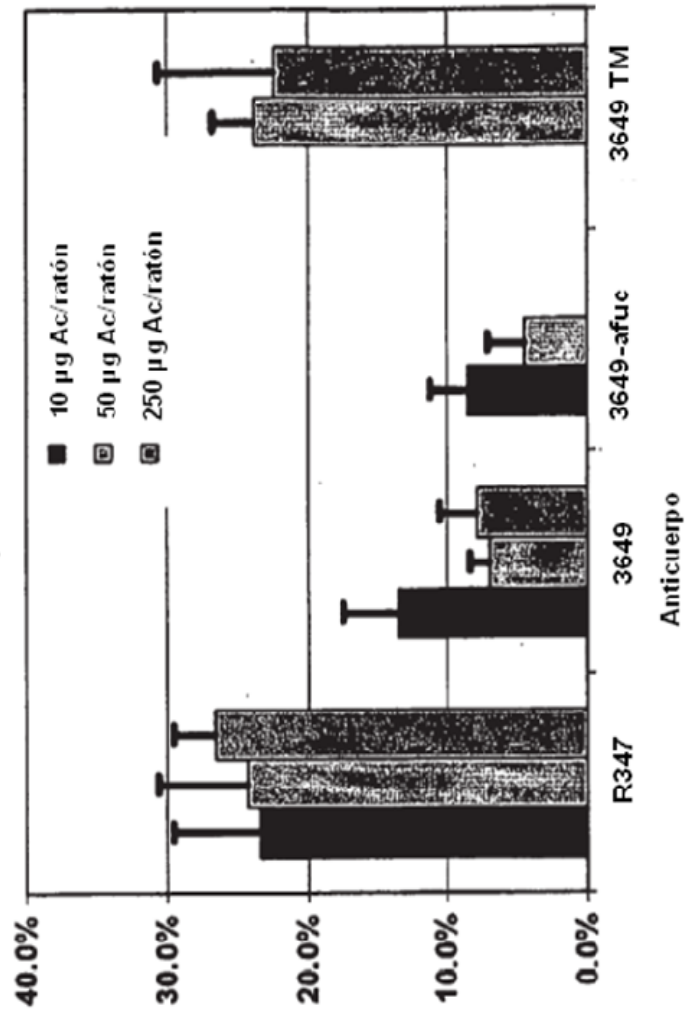
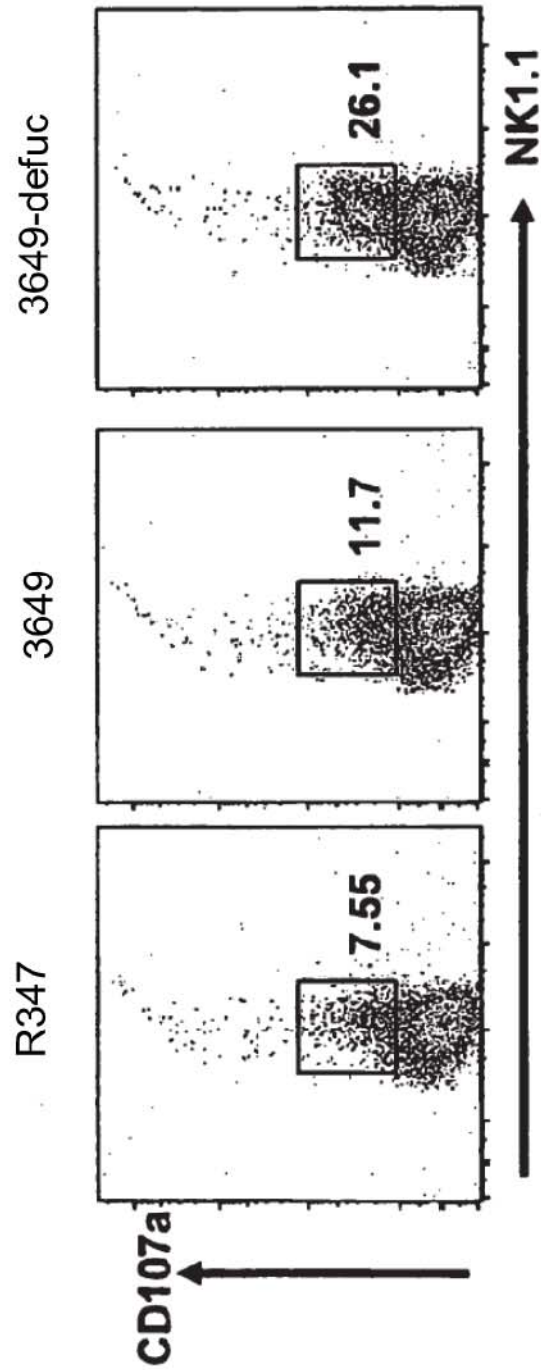


Figura 28B



10 µg de anticuerpo/ratón
ventana de los linfocitos vivos NK1.1+DX+

Figura 29

El anticuerpo anti-CD19 3649-defuc reduce significativamente el crecimiento del tumor

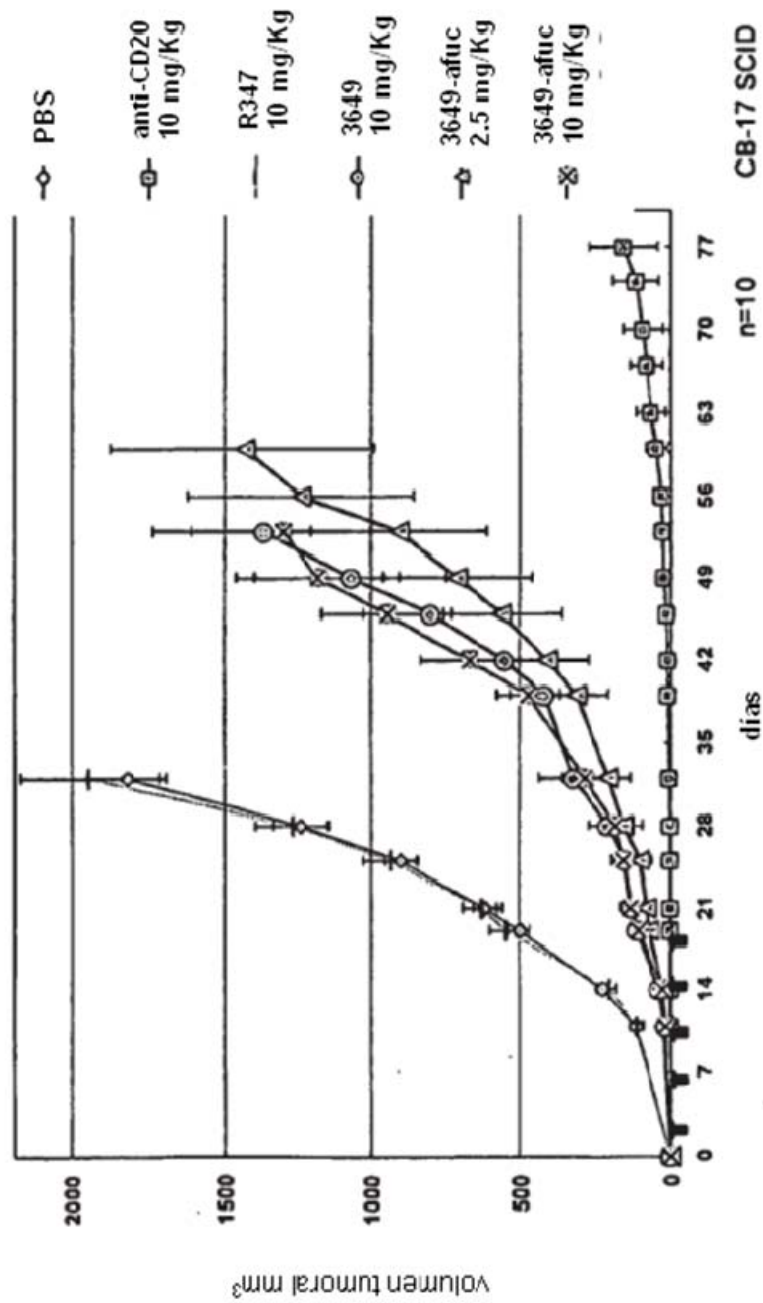


Figura 30

Porcentaje de las células B entre los linfocitos circulantes de un ratón
hCD19tg+/- 7 días después del tratamiento con el anticuerpo

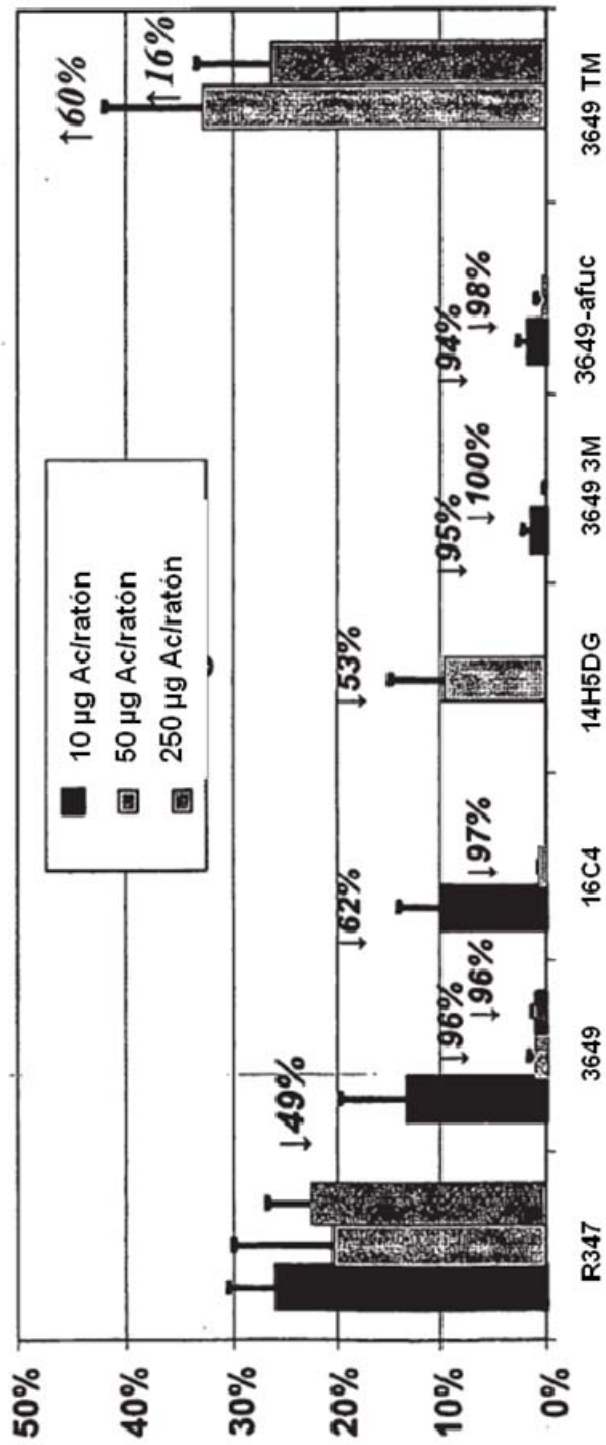


Figura 31A

Porcentaje de las células B entre los linfocitos esplénicos de un ratón hCD19tg+/- 7 días después del tratamiento con el anticuerpo

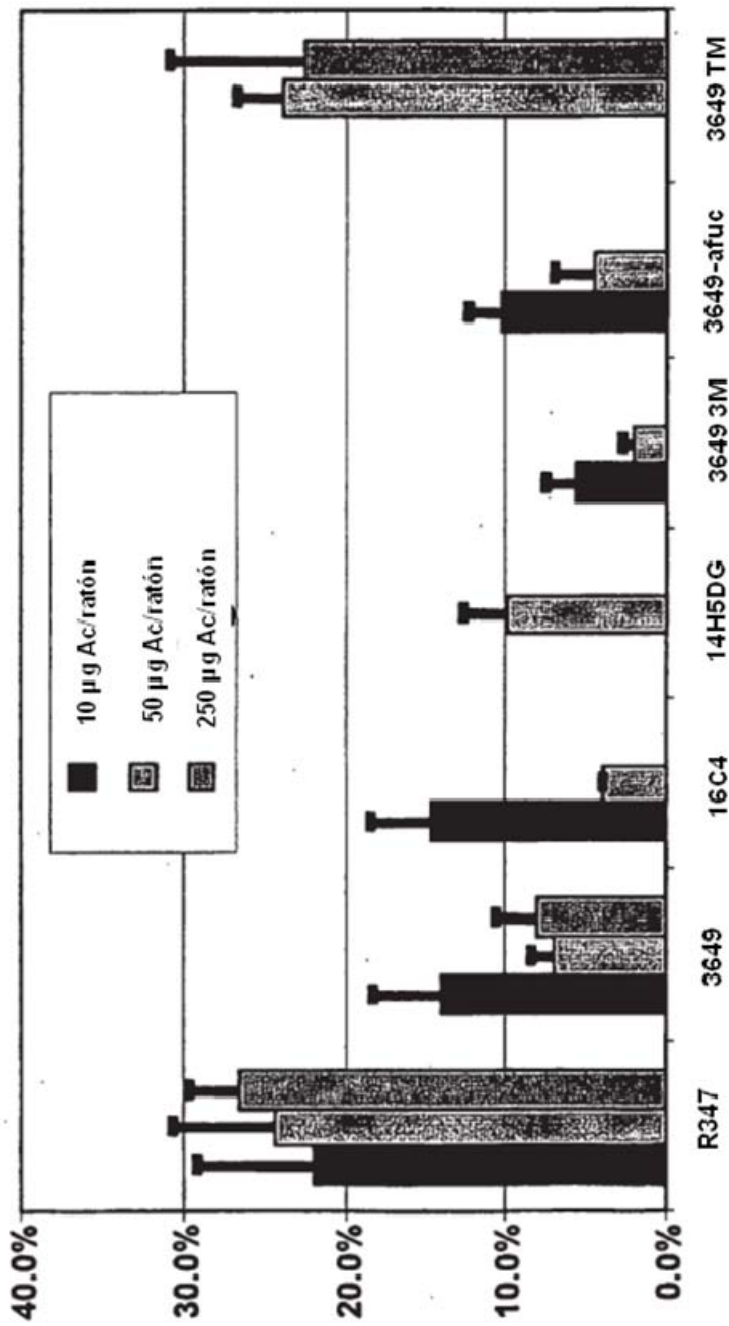


Figura 31B

Unión a las células 300B4 por el Fab 64D4, un positivo aislado de la genoteca específica de CDR2H

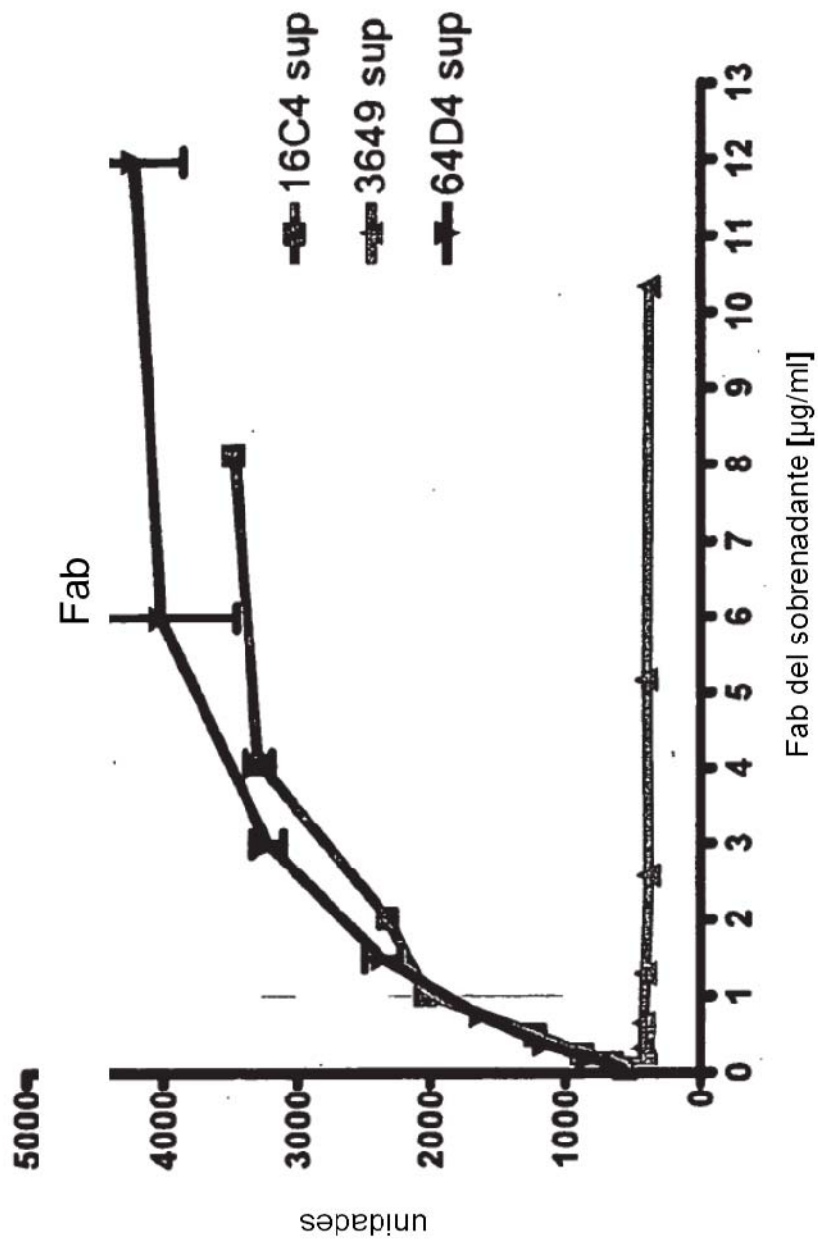


Figura 32

Unión a las células Raji por los clones positivos del Fab seleccionados de la genoteca combinatoria de CDR

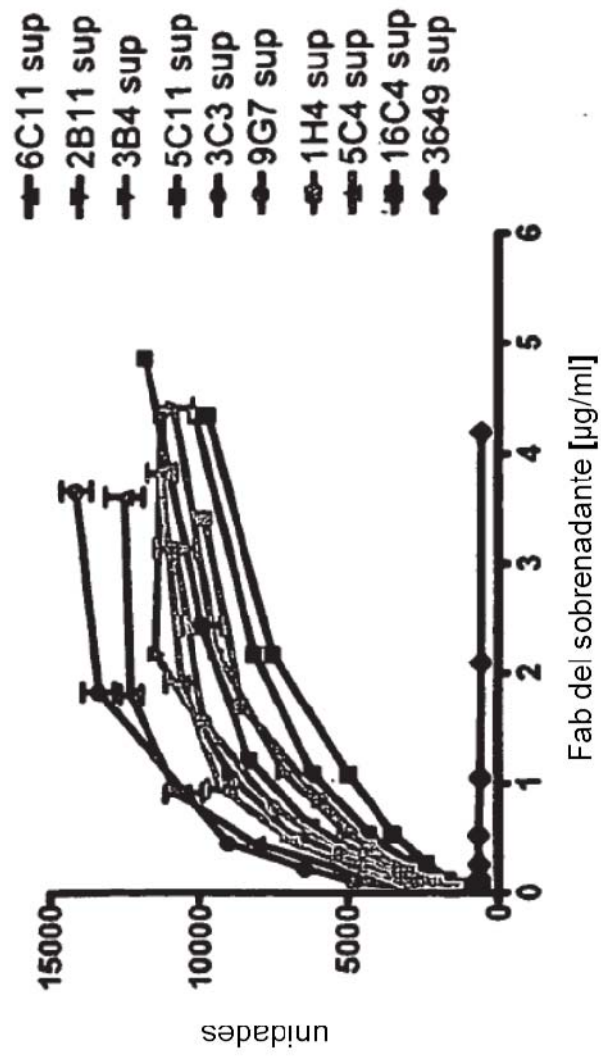


Figura 33A

Unión a las células 300B4 por los clones positivos del Fab seleccionados de la
genoteca combinatoria de CDR

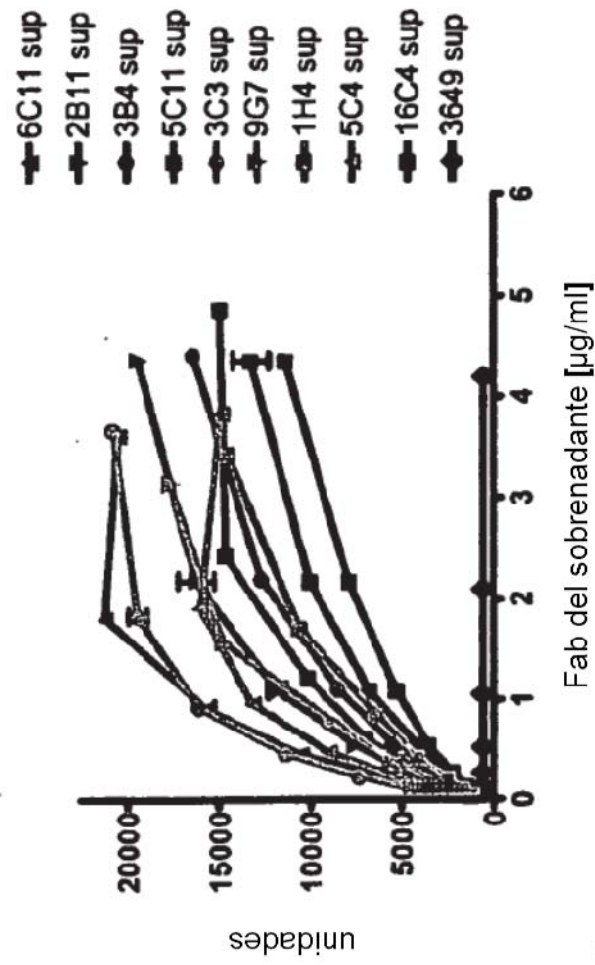


Figura 33B

	CDR1H	CDR2H	CDR3H	CDR1L	CDR2L	CDR3L
16C4	SSWMN	RIYPGDDGTNYNVKEKG	SGFITTVRDFDY	RASESVDTFGISFWN	EASNQGS	QQSKEVPFT
1A7	-V----	-----	-----	-----	-----	-----
3C3	-V----	-----	-----	-----H-----I-	-----PY-	A-----I-
3E5	-V----	-----	-----	-----	-----	A-----
3D4	-V----	-----	-----	-----	-----	A---R----
3F11	-V----	---L----	-----	-----I-----	-----	-----
5B5	-V----	-----	-----	-----	-----	A-T-R----
6F7	-V----	-----	-----	-----	-----	-----I-
1C11	-----	-----	-----	-----I-	-----PY-	-----
2B11	-----	-----	-----	-----	-----	A-T-----
2D10	-V----	-----	-----	-----	-----	A-T---N-
3B4	-T-+----	-----	-----	-----	-----	-----
5C11	-V----	-----	-----	-----I-----	-----TY-	A---R----
5D4	-----	-----	-----	-----R-	-----	-----
6C2	-----	-----	-----	-----	-----	-----I-
6C11	-V----	---L----	-----	-----	-----P---	---T-R----
9G7	-V----	-----	-----	-----IH-----	-----R---	A-----I-
1H4	-V----	-----	-----	-----I---L----	-----PY-	-----
5C4	-V----	-----	-----	-----I-----I-	-----PY-	A-T-R----

Figura 33C

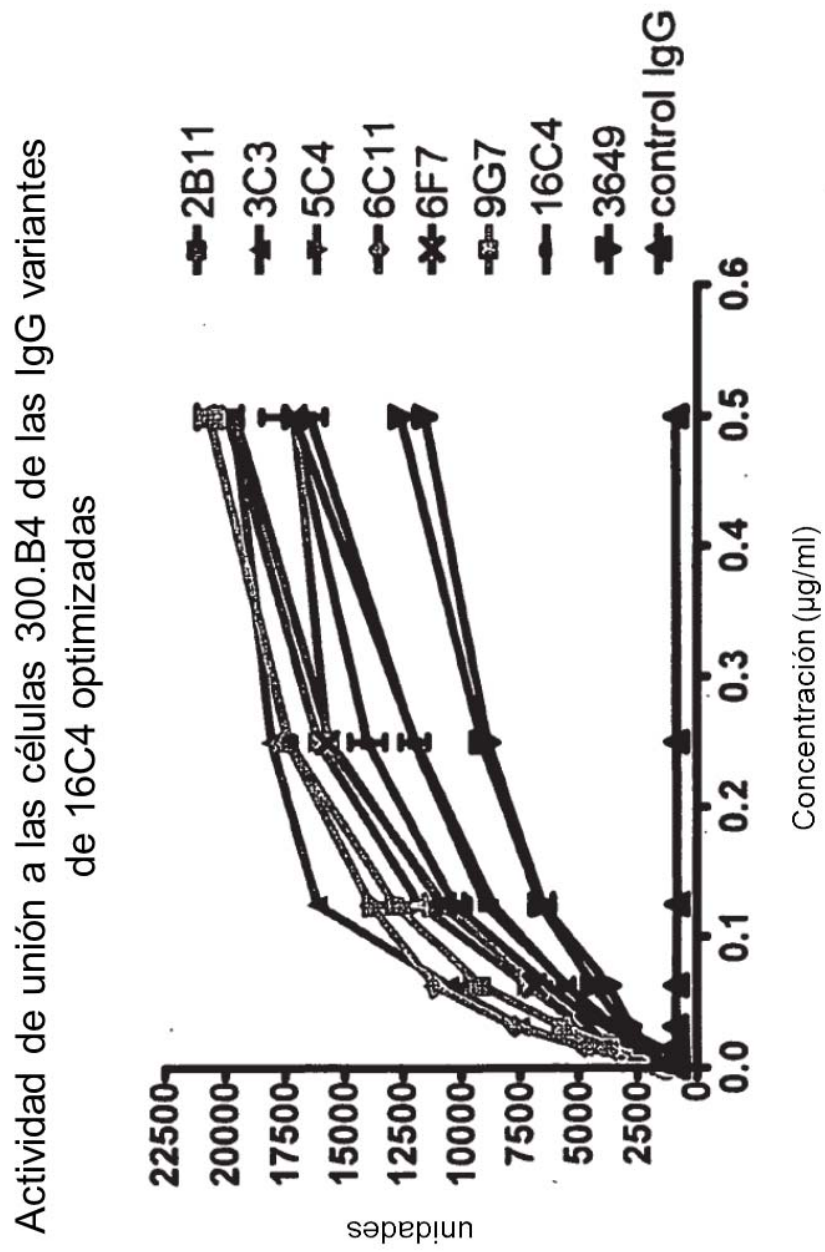


Figura 34

Actividad de unión a las células Raji de las variantes de los AcMs 16C4 de afinidad optimizada y el AcM parental

Secundario: anti- F(ab)'2 de IgG humana de cabra RPE@ dilución 1:1000

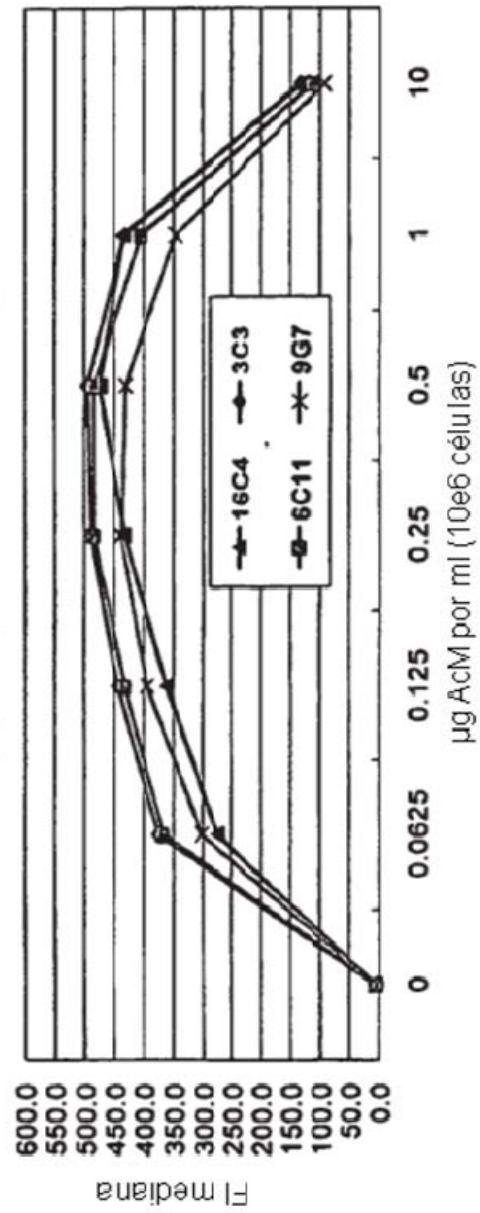


Figura 35A

Actividad de unión a las células Daudi de la variante del AcM 16C4 de afinidad optimizada y el AcM parental

Secundario: anti- F(ab)'2 de IgG humana de cabra RPE@ dilución 1:1000

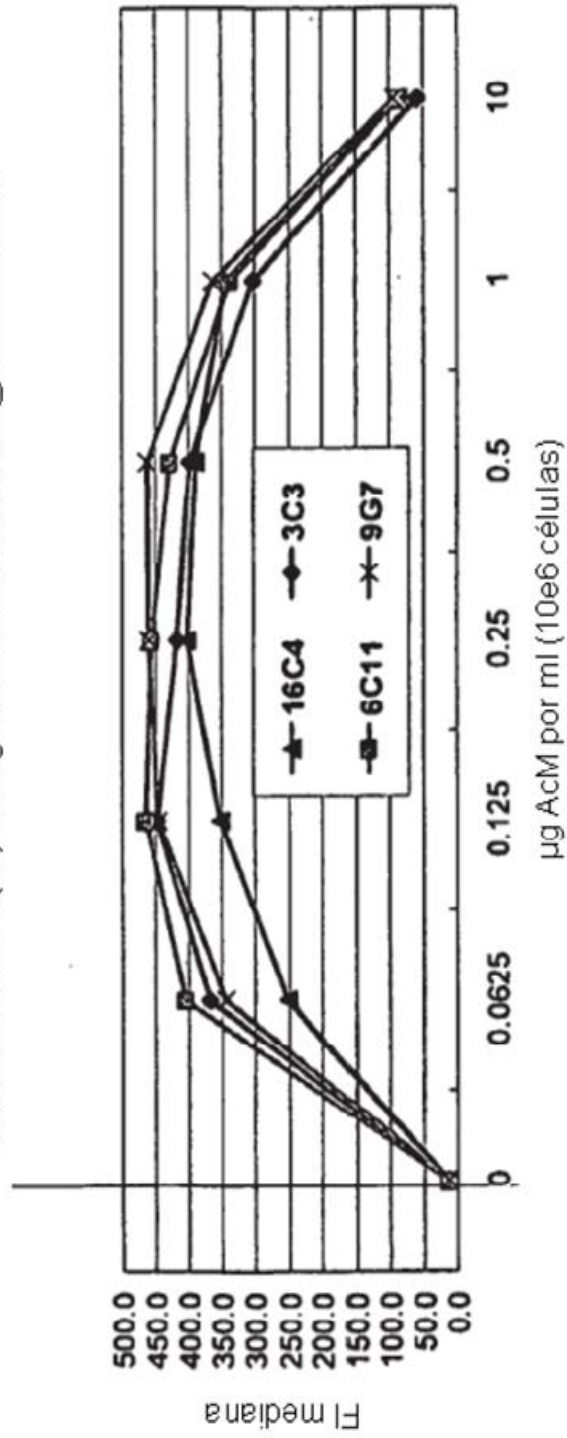


Figura 35B

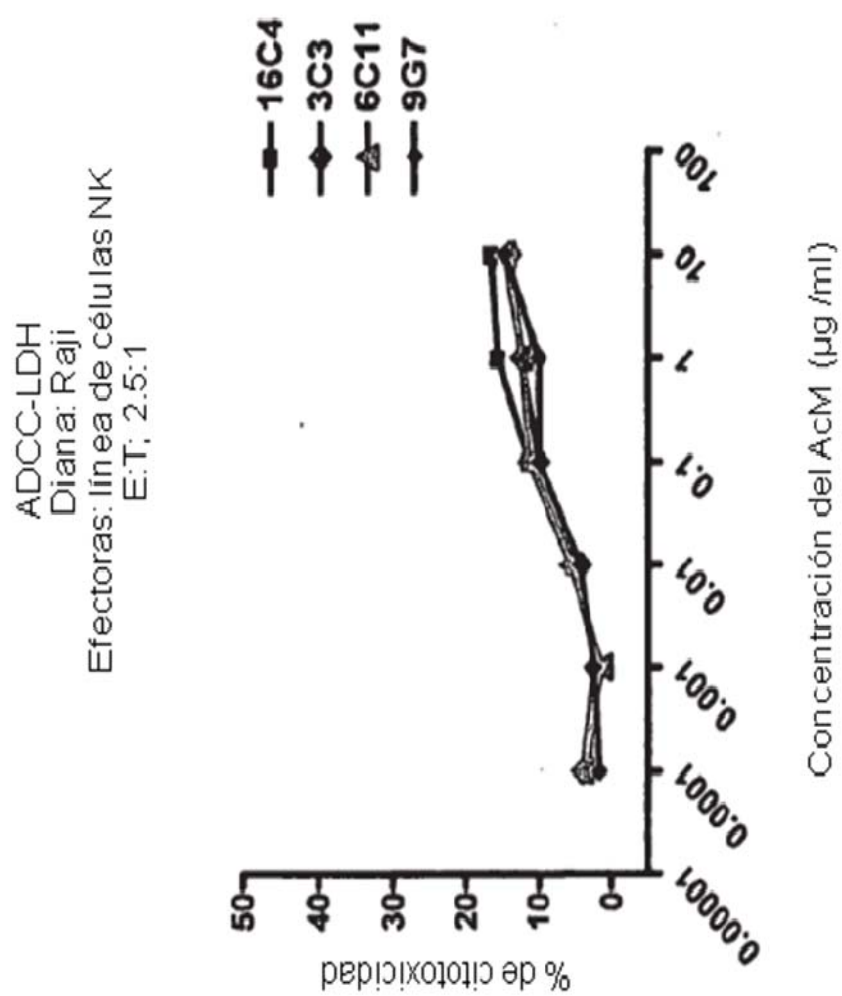


Figura 36

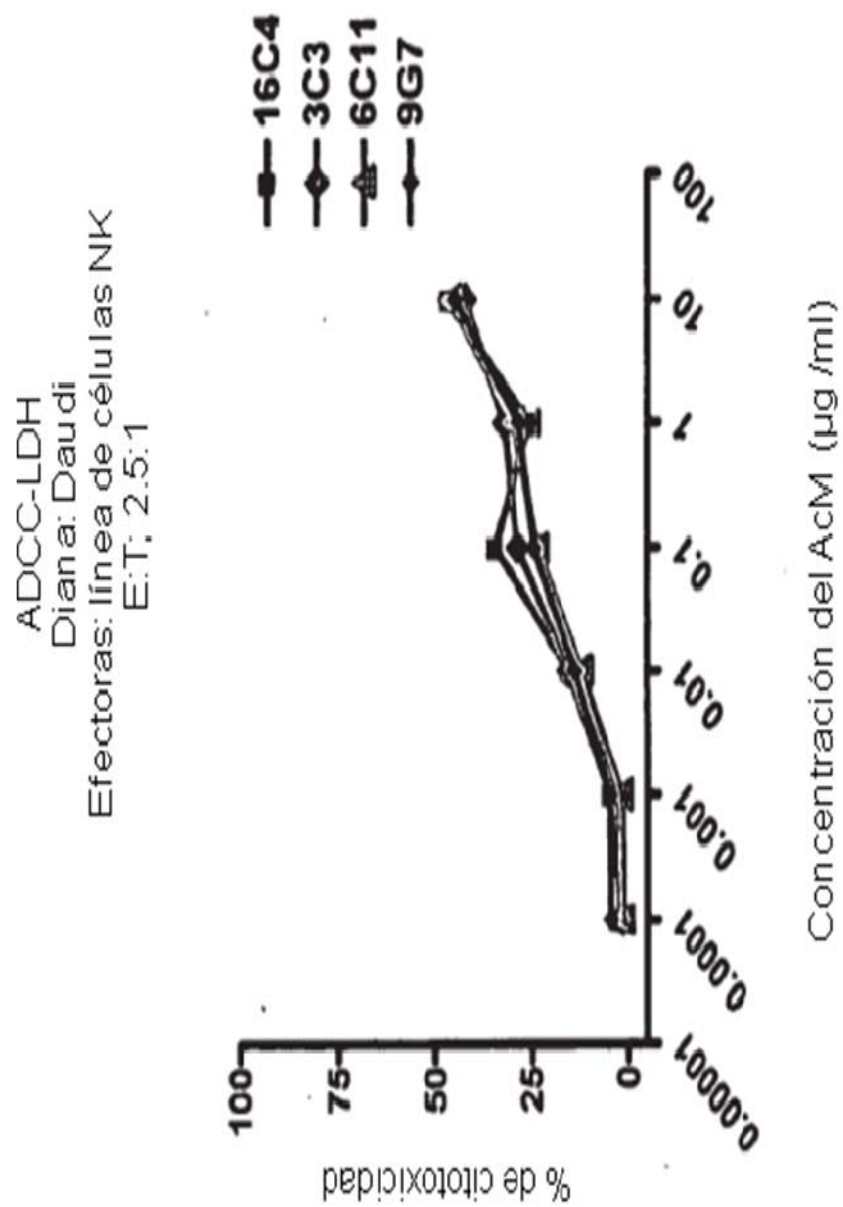


Figura 37

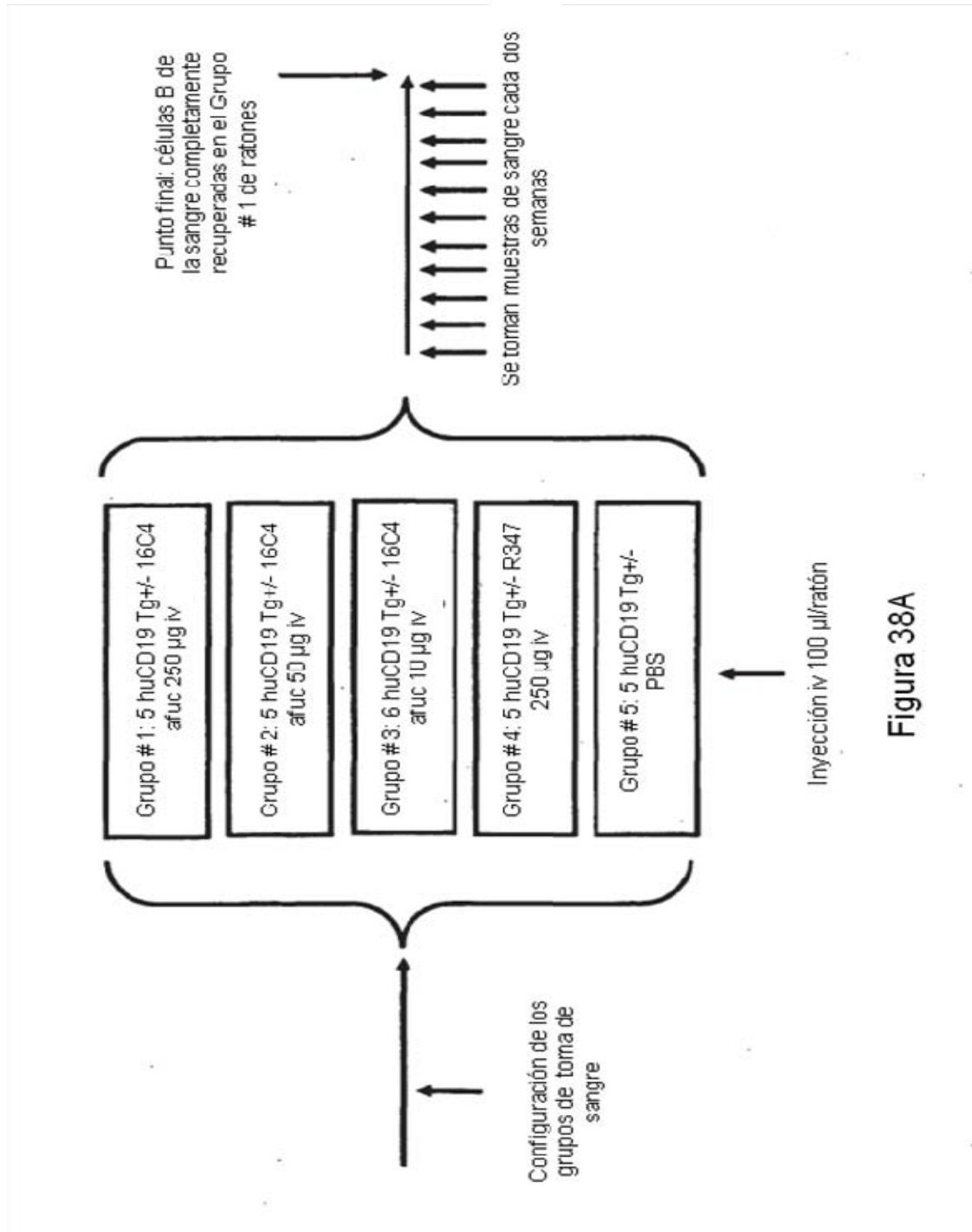


Figura 38A

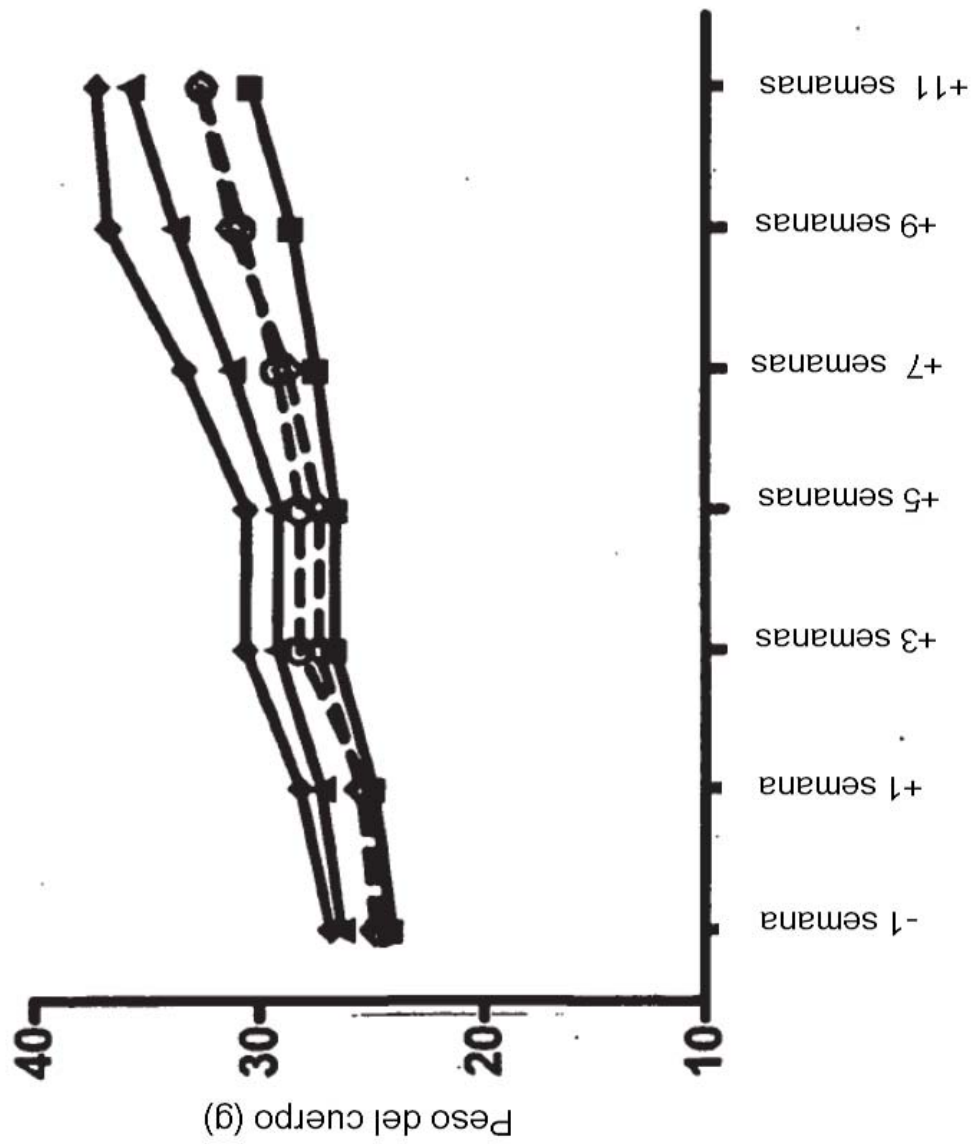


Figura 38B

El tratamiento con el 16C4-afuc indujo agotamiento de las células B

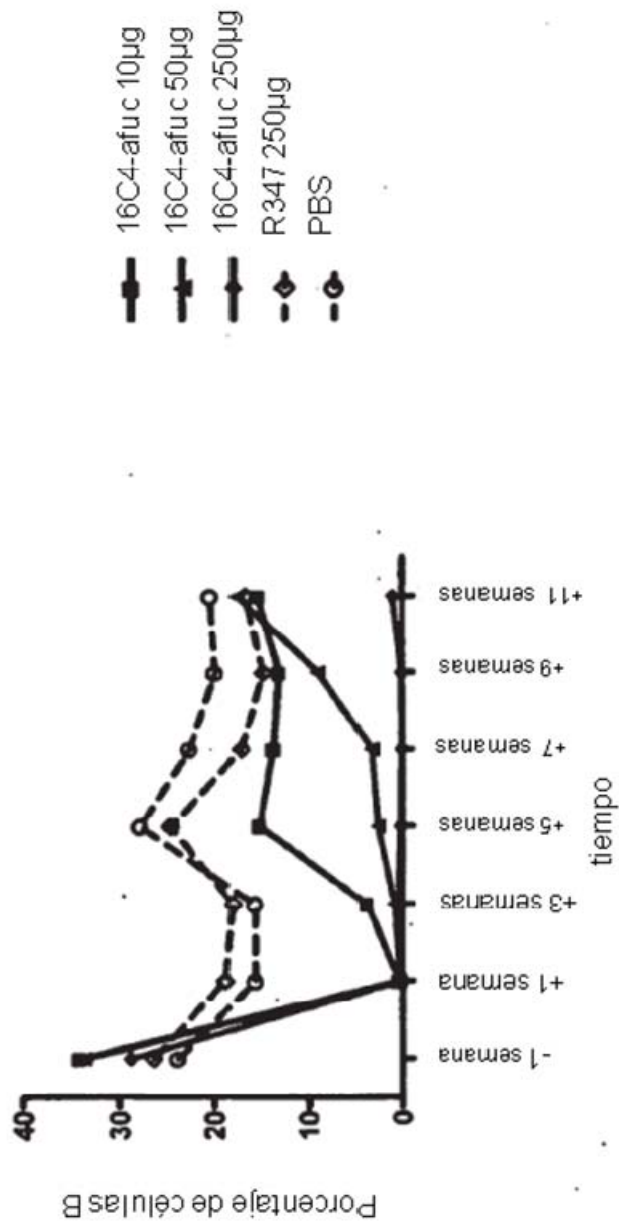


Figura 38C

La concentración de las células B después
del tratamiento

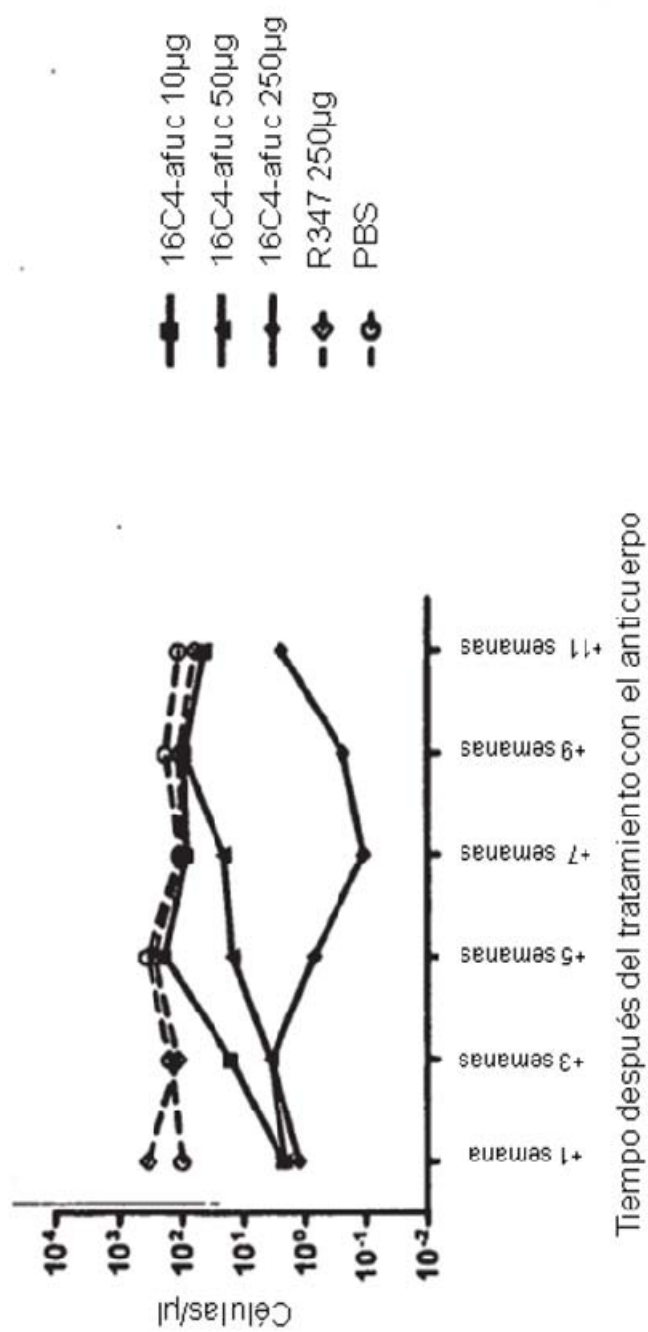


Figura 38D

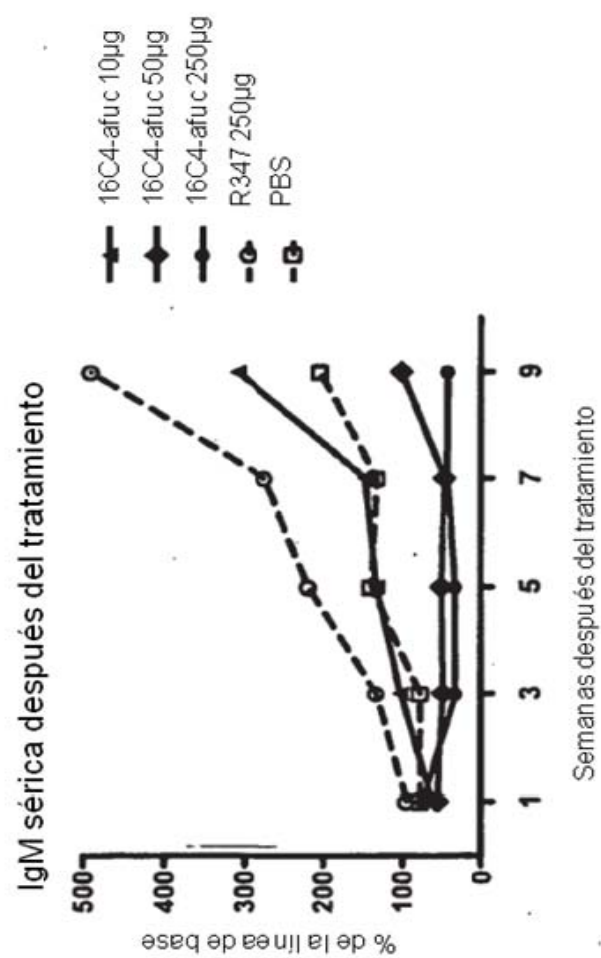


Figura 38E

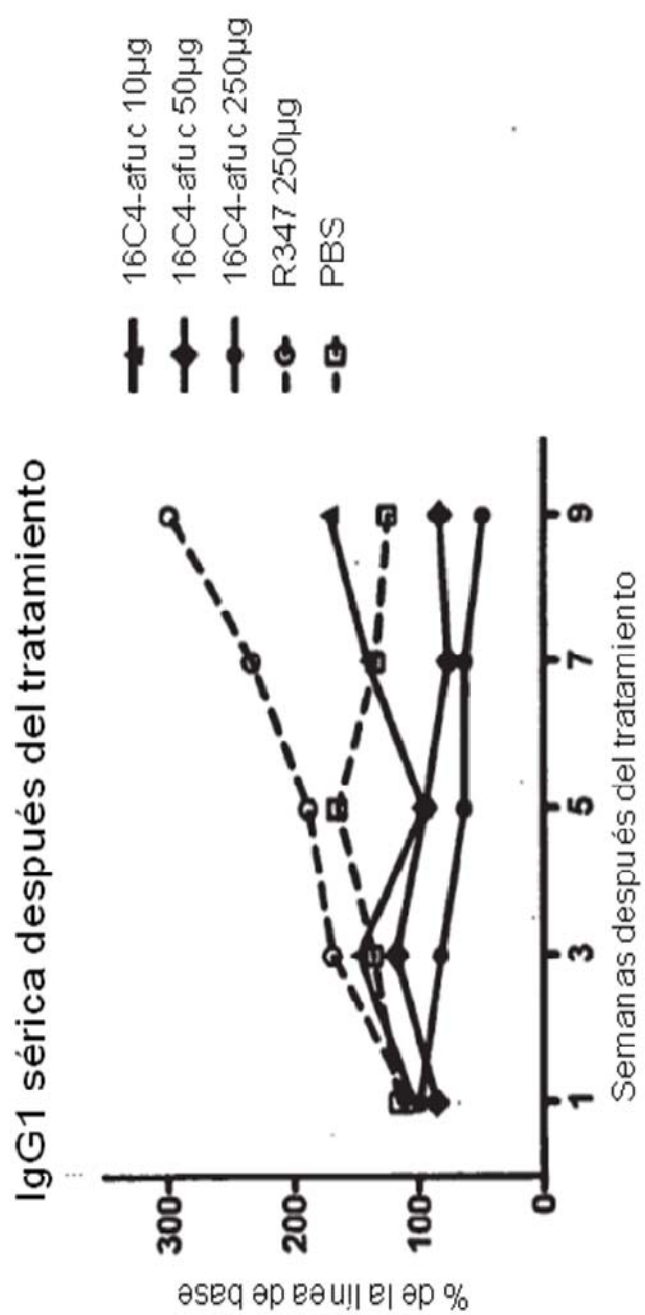


Figura 38F

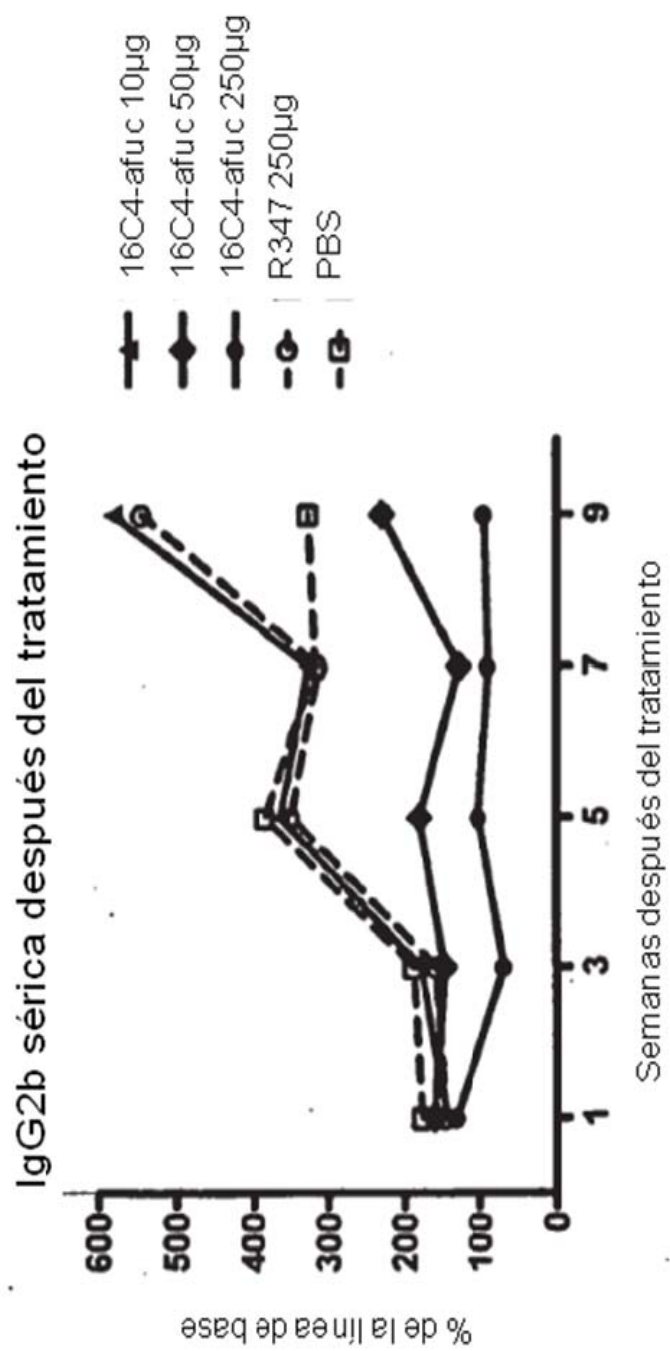


Figura 38G

Los anticuerpos α -CD19 inducen la fosforilación del CD19

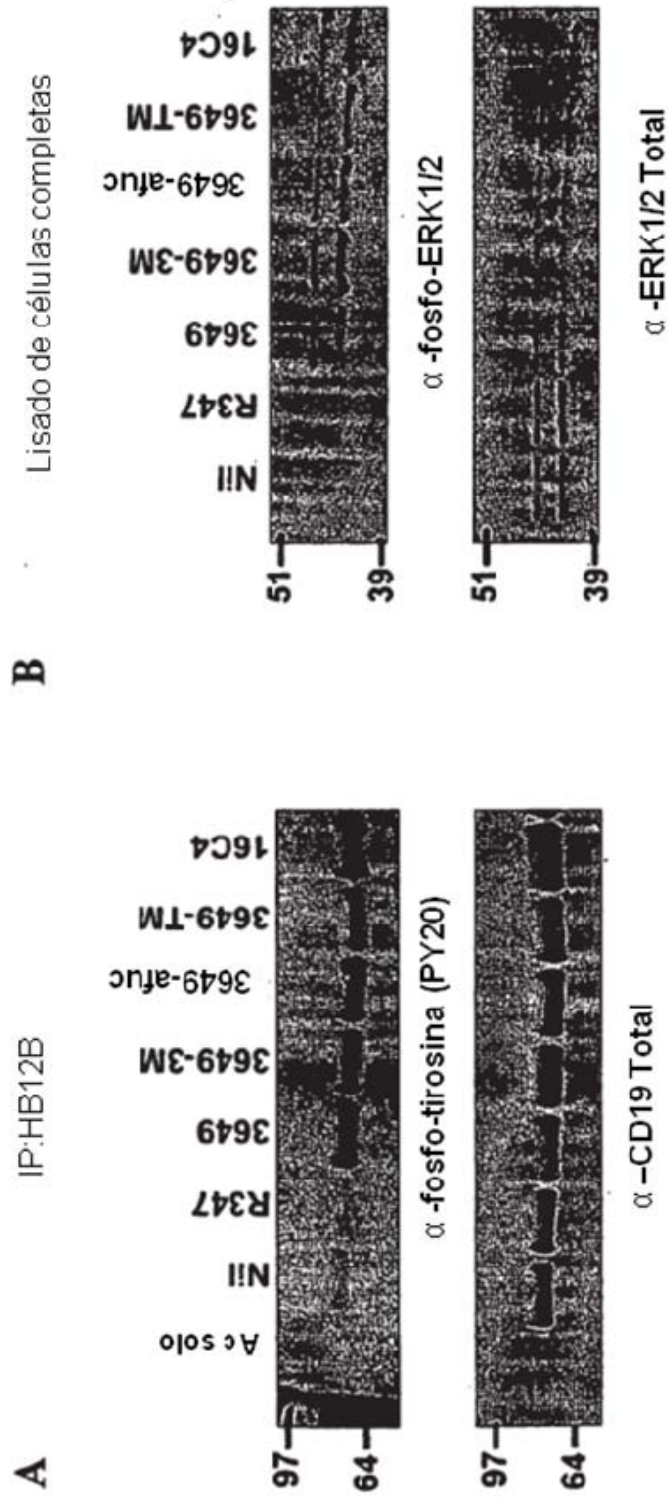


Figura 39A-B

Los anticuerpos α -CD19 no inhiben la activaci3n de ERK1/2 mediada por IgM

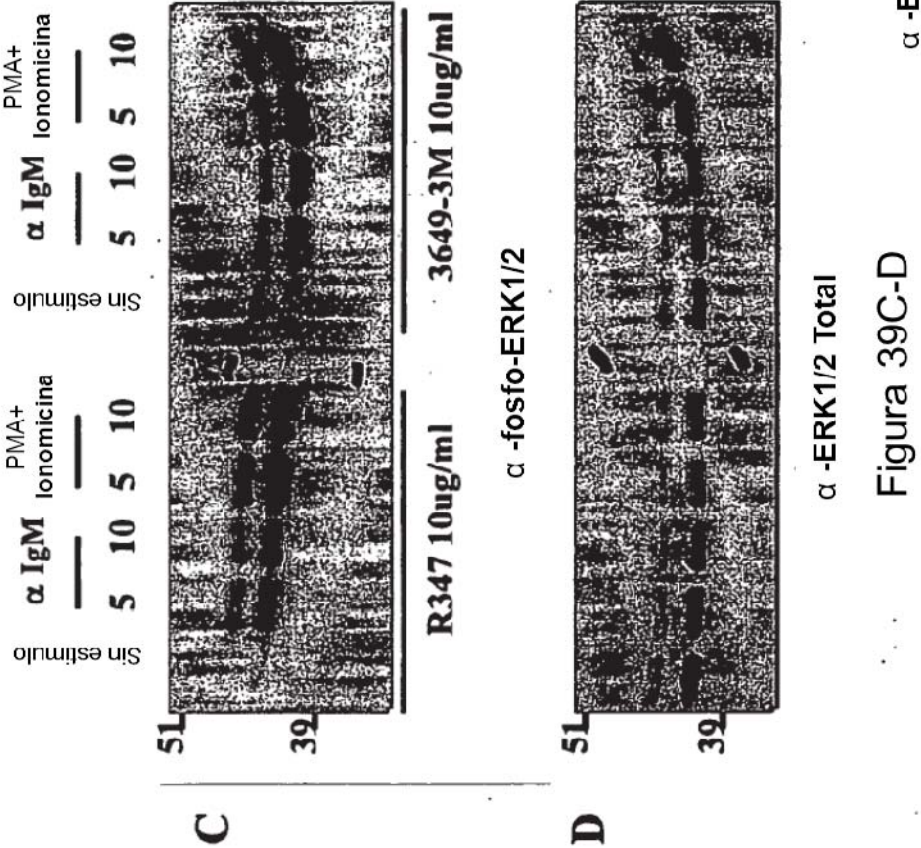


Figura 39C-D

Los anticuerpos α -CD19 inhiben la proliferación de las células B mediada por α -IgM/CD40

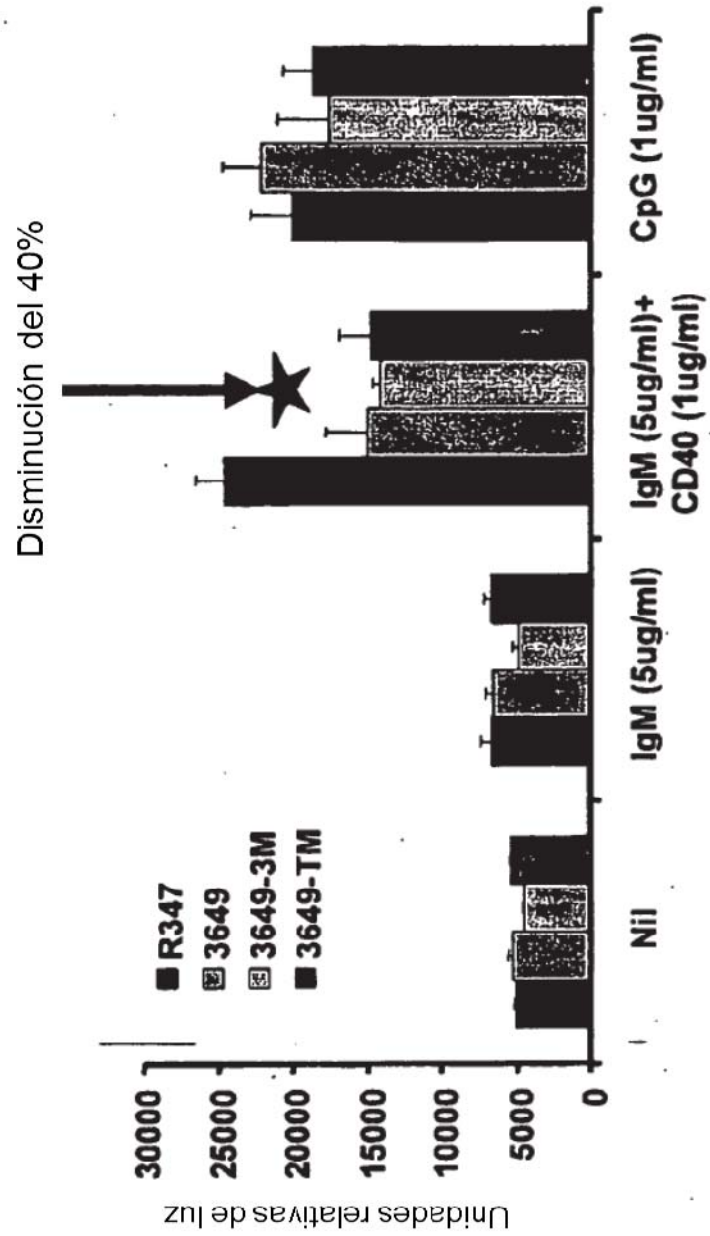


Figura 40

Los anticuerpos α -CD19 inhiben la proliferación de las células B mediada por α -IgM/CpG

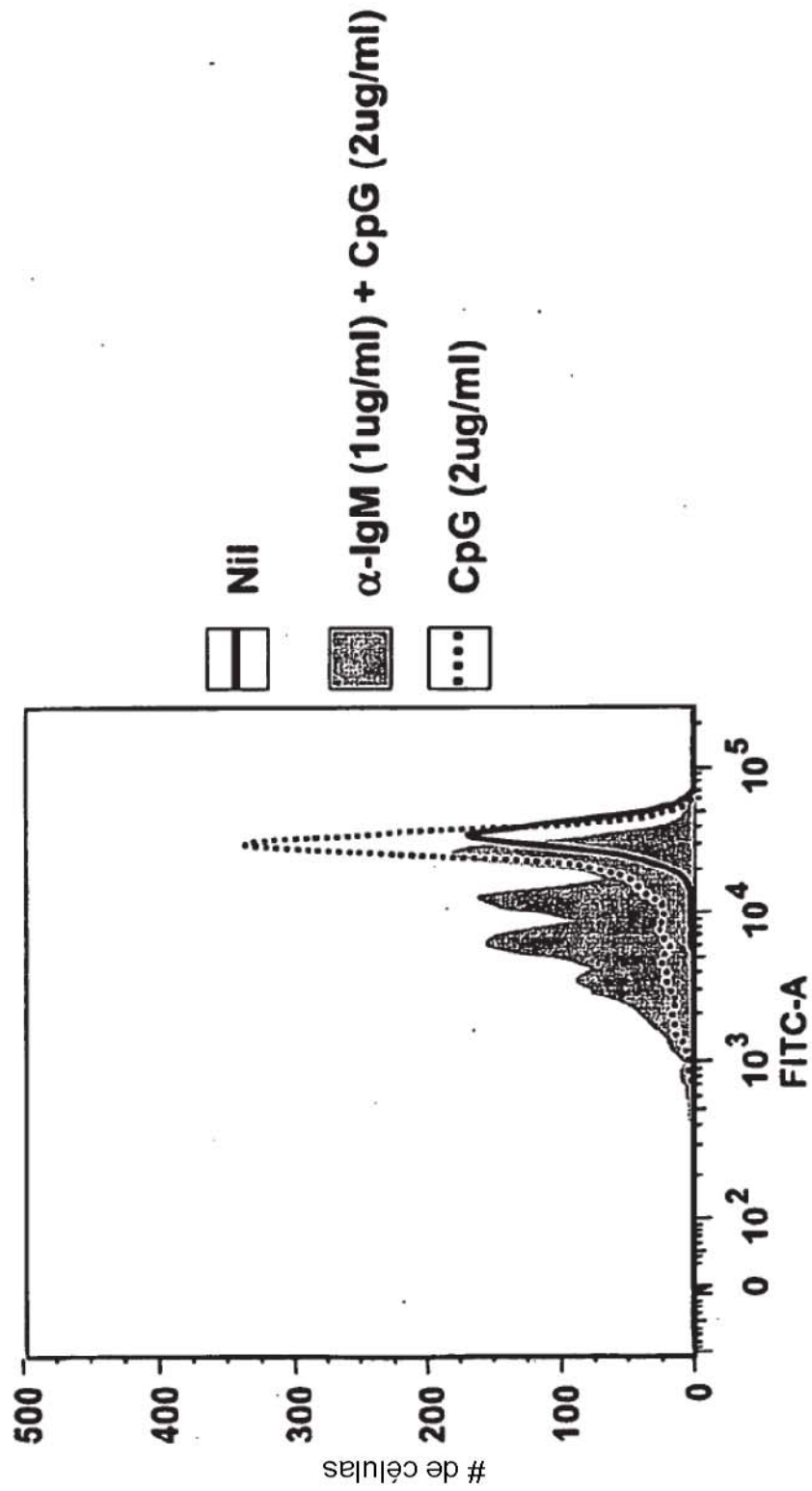


Figura 41A

Los anticuerpos α -CD19 inhiben la proliferación de las células B mediada por α -IgM/CpG

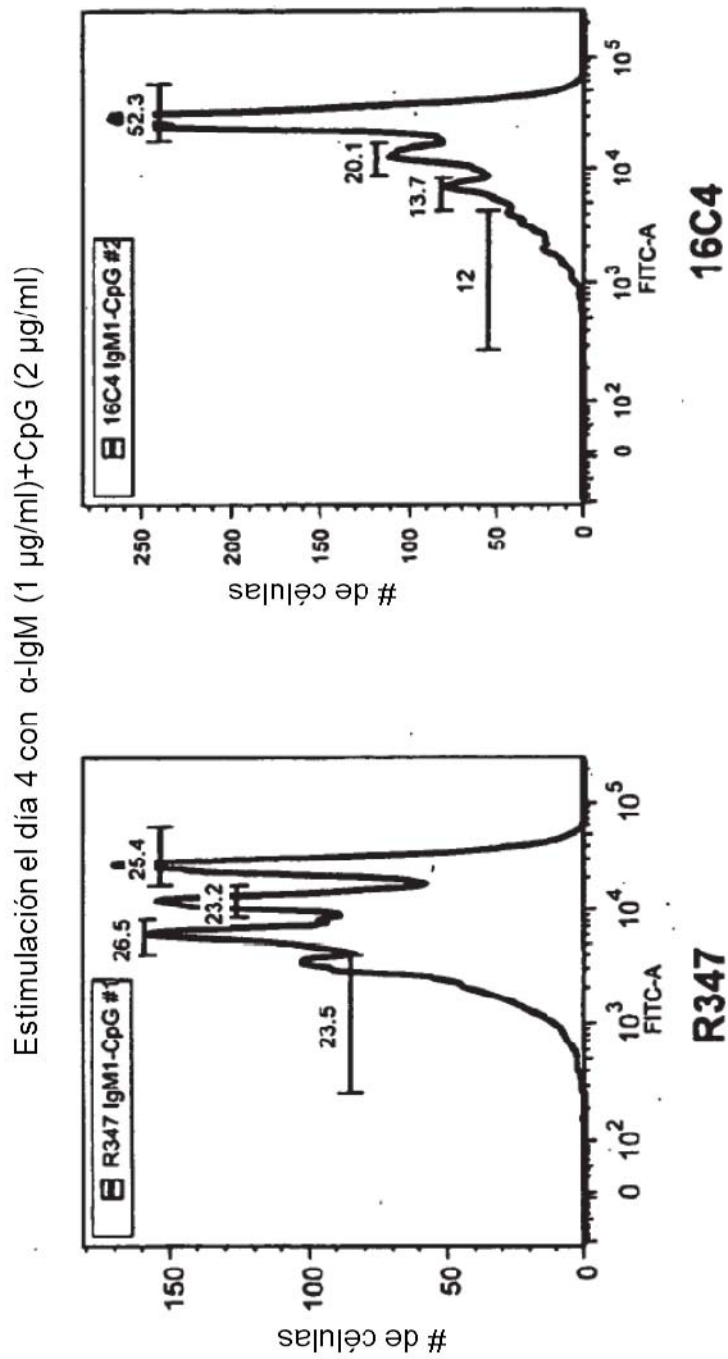
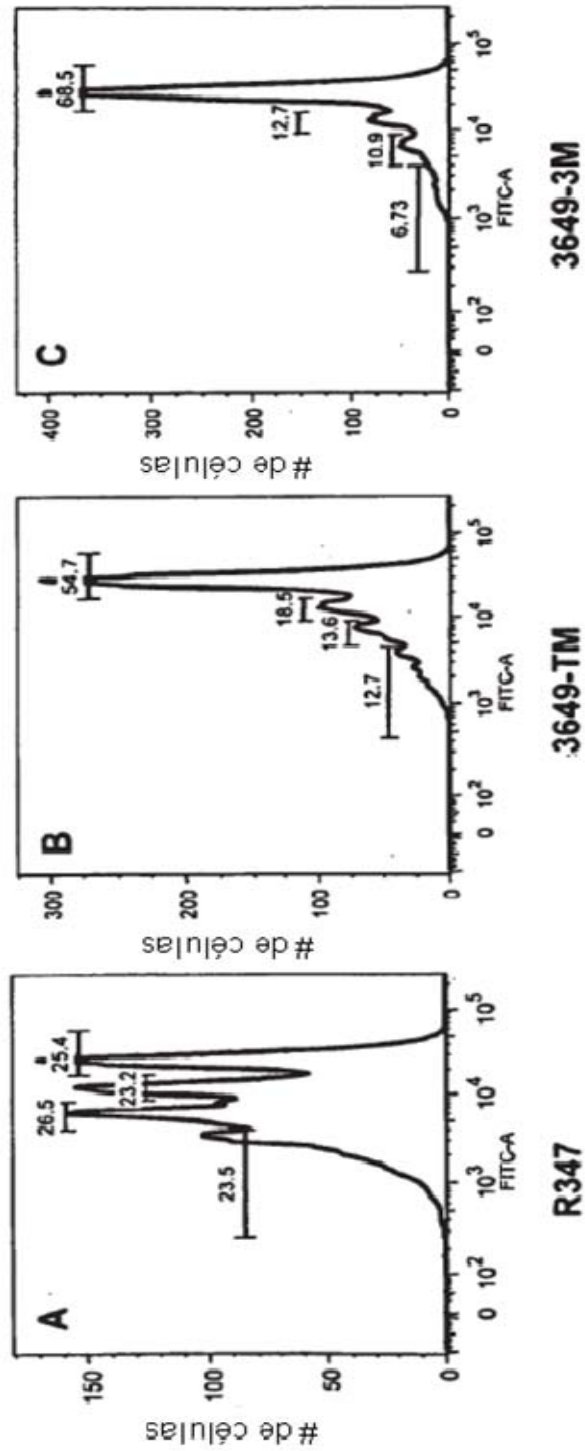


Figura 41B

Variantes de Fc de los anticuerpos α -CD19 muestran propiedades inhibitorias alteradas



Estimulación el día 4 con α -IgM (1 μ g/ml)+CpG (2 μ g/ml)

Figura 42A-C

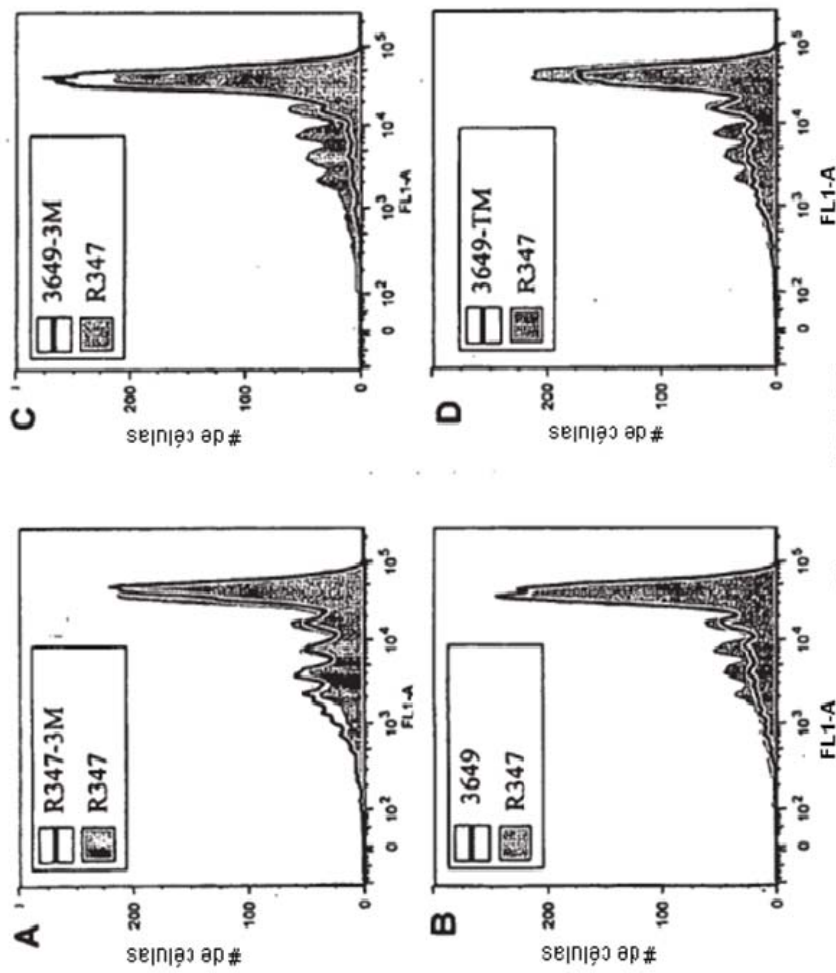


Figura 43A-E

Estimulación el día 4
con α -IgM (5
 μ g/ml)+CpG (1
 μ g/ml)

Los anticuerpos α -CD19 se internalizan eficientemente en las células Raji

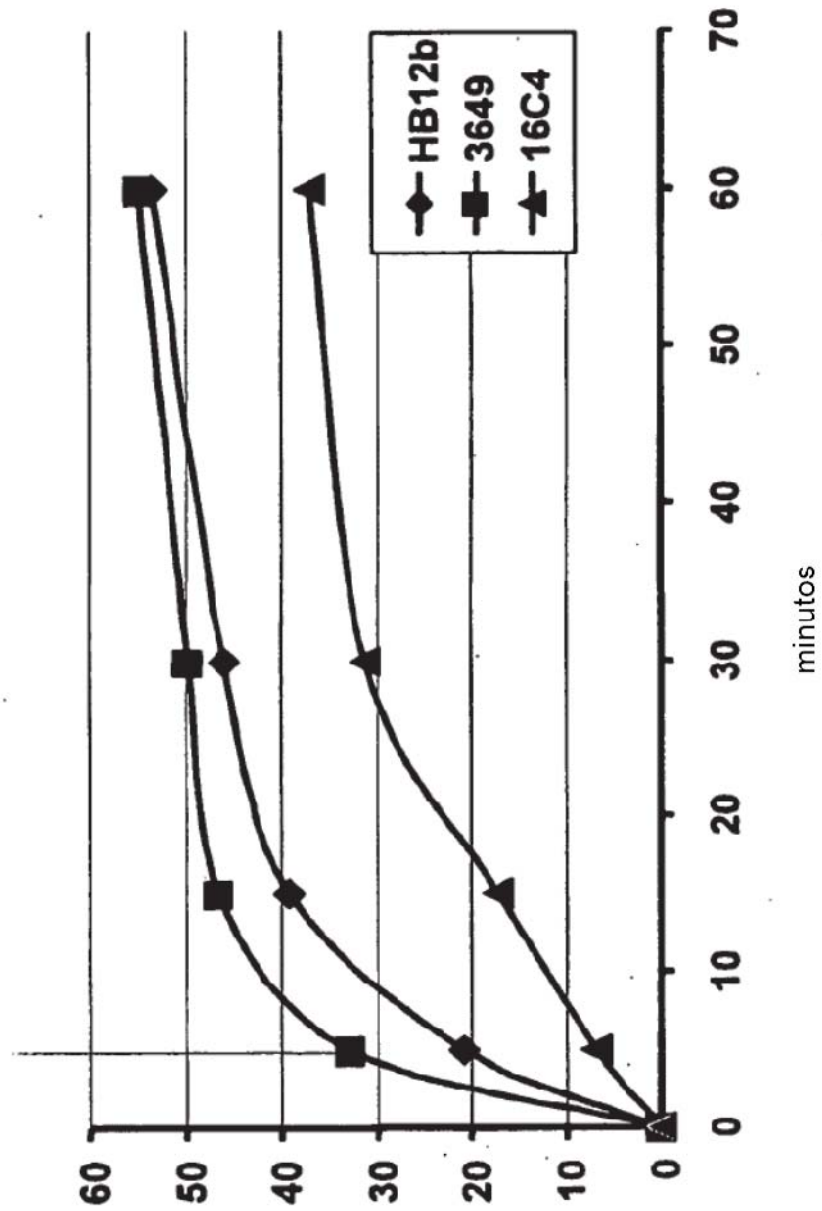


Figura 44

Pérdida significativa de la expresión del CD19 de la superficie después de 24 horas de tratamiento con el anticuerpo anti-CD19

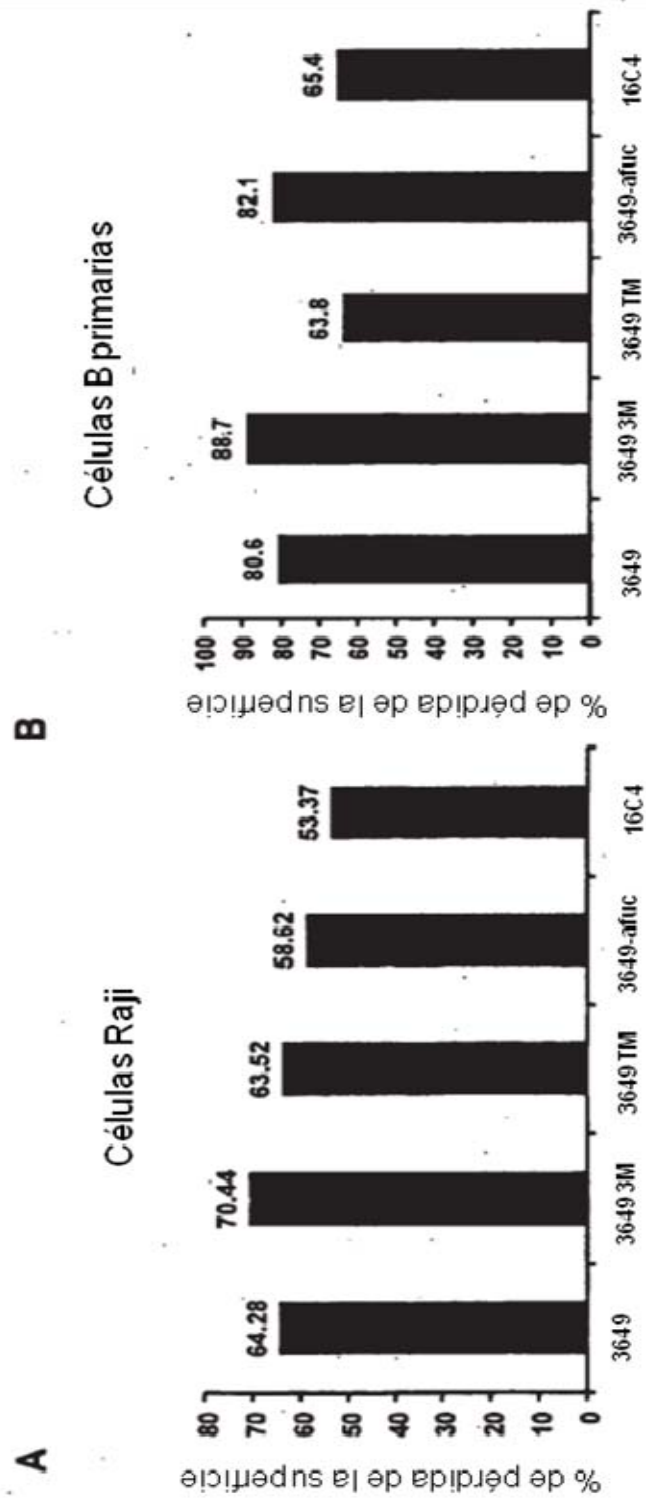


Figura 45