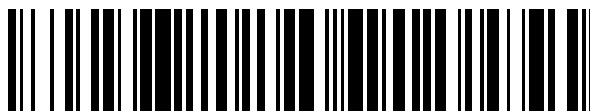


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 550 621**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/395** (2006.01)

**C12P 21/08** (2006.01)

**C07K 16/00** (2006.01)

**C07K 16/28** (2006.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.02.2006 E 06735370 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.08.2015 EP 1853718**

54 Título: **Anticuerpos anti-CD19 y usos en oncología**

30 Prioridad:

**15.02.2005 US 653587 P**

**22.07.2005 US 702063 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**11.11.2015**

73 Titular/es:

**DUKE UNIVERSITY (100.0%)**  
**230 North Building, Research Drive, Box 90083**  
**Durham**  
**North Carolina 27708-0083, US**

72 Inventor/es:

**YAZAWA, NORIHITO;**  
**GRON, HANNE;**  
**HAMAGUCHI, YASUHITO y**  
**TEDDER, THOMAS F.**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

ES 2 550 621 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Anticuerpos anti-CD19 y usos en oncología

## 1. Introducción

La presente invención se refiere a un anticuerpo anti-CD 19 para su uso en métodos para el tratamiento de trastornos o enfermedades de células B en sujetos humanos, incluyendo neoplasias de células B, usando anticuerpos terapéuticos que se unen al antígeno CD19 humano. En una realización preferida, los anticuerpos anti-CD19 terapéuticos de las composiciones y para su uso en los métodos de la invención preferiblemente median la citotoxicidad humana mediada por células dependiente de antígeno (ADCC). La presente invención se refiere adicionalmente a composiciones que comprenden anticuerpos anti-CD19 humanizados o quiméricos del isotipo humano IgG1 y/o IgG3. La presente invención se refiere adicionalmente a dichas composiciones que preferiblemente mediante ADCC humana. La presente invención también abarca anticuerpos anti-CD 19 monoclonales humanizados, o quiméricos.

## 2. Antecedentes de la invención

Los marcadores de superficie de células B se han sugerido en líneas generales como dianas para el tratamiento de trastornos o enfermedades de células B, enfermedad autoinmune, y rechazo de trasplantes. Ejemplos de marcadores de superficie de células B incluyen marcadores de superficie de leucocitos CD10, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD24, CD37, CD53, CD72, CD74, CD75, CD77, CD79a, CD79b, CD80, CD81, CD82, CD83, CD84, CD85, y CD86. Se han desarrollado anticuerpos que se unen específicamente a algunos de estos marcadores, y algunos se han ensayado para el tratamiento de enfermedades y trastornos.

Por ejemplo, terapias basadas en anticuerpo monoclonal (mAb) quimérico o radiomarcado dirigidas contra la molécula de superficie celular CD20 específica para células B maduras y sus equivalentes malignos han demostrado ser un tratamiento eficaz *in vivo* para linfoma no Hodgkin (Tedder et al., Immunol. Today 15:450-454 (1994); Press et al., Hematology, 221-240 (2001); Kaminski et al., N. Engl. J. Med., 329:459-465 (1993); Weiner, Semin. Oncol., 26:43-51 (1999); Onrust et al., Drugs, 58:79-88 (1999); McLaughlin et al., Oncology, 12:1763-1769 (1998); Reff et al., Blood, 83:435-445 (1994); Maloney et al., Blood, 90:2188-2195 (1997); Maloney et al., J. Clin. Oncol., 15:3266-3274 (1997); Anderson et al., Biochem. Soc. Transac., 25:705-708 (1997)). También se ha descubierto que la terapia con anticuerpo monoclonal anti-CD20 mejora las manifestaciones de artritis reumatoide, lupus sistémico eritematoso, púrpura trombocitopénica idiopática y anemia hemolítica, así como otras enfermedades mediadas por el sistema inmune (Silverman et al., Arthritis Rheum., 48:1484-1492 (2002); Edwards et al., Rheumatology, 40:1-7 (2001); De Vita et al., Arthritis Rheumatism, 46:2029-2033 (2002); Leandro et al., Ann. Rheum. Dis., 61:883-888 (2002); Leandro et al., Arthritis Rheum., 46:2673-2677 (2001)). El anticuerpo monoclonal anti-CD22 LL-2 demostró ser eficaz en el tratamiento de pacientes con linfoma agresivo y recidivante que experimentan tratamiento quimioterapéutico (Goldenberg patentes de Estados Unidos N° 6.134.982 y 6.306.393). El anticuerpo anti-CD20 (IgG1), RITUXAN™, se ha usado satisfactoriamente en el tratamiento de ciertas enfermedades tales como púrpura trombocitopénica inmune en el adulto, artritis reumatoide, y anemia hemolítica autoinmune (Cured et al., documento WO 00/67796). A pesar de la eficacia de esta terapia, la mayoría de las leucemias linfoblásticas agudas (ALL) y muchas otras neoplasias de células B no expresan CD20, expresan CD20 a bajos niveles, o han perdido la expresión de CD20 después de inmunoterapia con CD20 (Smith et al., Oncogene, 22:7359-7368 (2003)). Además, la expresión de CD20 no es predictiva de respuesta a una terapia anti-CD20 ya que solamente la mitad de los pacientes con linfoma no Hodgkin responden a inmunoterapia dirigidas a CD20.

La molécula CD19 humana es un receptor de superficie celular estructuralmente distinto expresado en la superficie de células B humanas incluyendo, aunque sin limitación, células pre-B, células B en desarrollo temprano (es decir, células B inmaduras), células B maduras a través de diferenciación terminal en células plasmáticas, y células B malignas. CD19 se expresa por la mayoría de leucemias linfoblásticas agudas pre-B (ALL), linfomas no Hodgkin, leucemias linfocíticas crónicas de células B (CLL), leucemias pro-linfocíticas, leucemias de células capilares, leucemias linfocíticas agudas comunes, y algunas leucemias linfoblásticas nulas-agudas (Nadler et al., J. Immunol., 131:244-250 (1983), Loken et al., Blood, 70:1316-1324 (1987), Uckun et al., Blood, 71:13-29 (1988), Anderson et al., 1984, Blood, 63:1424-1433 (1984), Scheuermann, Leuk. Lymphoma, 18:385-397(1995)). La expresión de CD19 en células plasmáticas sugiere adicionalmente que puede expresarse en tumores de células B diferenciados tales como mieloma múltiple, plasmacitomas, tumores de Waldenstrom (Grossbard et al., Br. J. Haematol., 102:509-15(1998); Treon et al., Semin. Oncol., 30:248-52(2003)). A diferencia de CD20, se cree que el antígeno CD19 se expresa a niveles mayores y que las células lo internalizan cuando se une mediante un anticuerpo anti-CD19.

El antígeno CD19 también ha sido una de las muchas dianas propuestas para inmunoterapia. Sin embargo, se cree que la indisponibilidad percibida como diana debido a la internalización celular, ha presentado obstáculos al desarrollo de protocolos terapéuticos que podrían usarse satisfactoriamente en sujetos humanos. El anticuerpo CLB-CD19 (mAb murino IgG2a anti-CD19) demostró inhibir el crecimiento de tumores humanos implantados en ratones atímicos (Hooijberg et al., Cancer Research, 55:840-846 (1995)). En otro estudio, el anticuerpo murino monoclonal FMC63 (IgG2a) se quimerizó usando una región Fc de IgG1 humana. La administración de este anticuerpo

quimérico a ratones SCID que albergan un linfoma de células B humanas (modelo de xenotrasplante) no indujo citotoxicidad mediada por el complemento o ADCC, pero provocó eliminación significativa de las células tumorales trasplantadas (Geoffrey et al., *Cancer Immunol. Immunother.*, 41:53-60 (1995)).

Los resultados obtenidos usando modelos de ratón de xenotrasplante de implante de tumor condujeron a estudios usando anticuerpos murinos anti-CD19 en pacientes humanos. El anticuerpo murino CLB-CD19 se administró a seis pacientes diagnosticados con un linfoma no Hodgkin progresivo en los que había fracasado la terapia convencional previa (quimioterapia o radioterapia). A estos pacientes se les dieron dosis totales de anticuerpo que variaban de 225 a 1.000 mg (Hekman et al., *Cancer Immunol. immunotherapy*, 32:364-372 (1991)). Aunque las células tumorales en circulación se redujeron temporalmente en dos pacientes después de la infusión del anticuerpo, solamente un paciente consiguió remisión parcial después de dos periodos de tratamiento con anticuerpo. No pudieron extraerse conclusiones respecto a la eficacia terapéutica a partir de este pequeño grupo de pacientes refractarios.

Posteriormente, estos investigadores demostraron que los efectos anti-tumorales de mAb contra CD20 conjugados son bastante superiores a los de mAb contra CD19 en modelos de trasplante (Hooijberg et al., *Cancer Res.*, 55:840-846 (1995); y Hooijberg et al., *Cancer Res.*, 55:2627-2634 (1995)). Además, no observaron efectos aditivos o sinérgicos sobre la incidencia del tumor cuando se usaron mAb contra CD19 y CD20 en combinación (Hooijberg et al., *Cancer Res.*, 55:840-846 (1995)). Aunque los modelos de xenotrasplante en animales se reconocieron como malos indicadores de pronóstico para la eficacia en sujetos humanos, los resultados negativos en estos estudios en animales desalentaron el interés en la terapia con anticuerpos anti-CD 19 desnudos.

El uso de inmunotoxinas basadas en anticuerpo anti-CD19 produjo resultados igualmente desalentadores. En ensayos clínicos iniciales, el anticuerpo anti-CD19 B4 (mAb IgG1 murino) se conjugó con la toxina vegetal ricina y se administró a pacientes humanos que tenían mieloma múltiple en los que falló la terapia convencional previa (Grossbard et al., *British Journal of Haematology*, 102:509-515(1998)), linfoma no Hodgkin avanzado (Grossbard et al., *Clinical Cancer Research*, 5:2392-2398 (1999)), y neoplasias refractarias de células B (Grossbard et al., *Blood*, 79:576-585 (1992)). Estos ensayos demostraron en líneas generales la seguridad de administrar el conjugado B4-ricina a seres humanos; sin embargo, los resultados fueron mixtos y las tasas de respuesta fueron desalentadoras en comparación con los ensayos clínicos con RITUXAN™ (Grossbard et al., *Clinical Cancer Research*, 5:2392-2398 (1999)). Además, una parte significativa de los paciente desarrolló una respuesta de anticuerpo humano anti-ratón (HAMA) o una respuesta de anticuerpo humano anti-ricina (HARA).

En otro ensayo, se trataron siete pacientes con linfoma no Hodgkin de bajo grado previamente tratados con terapia convencional con el anticuerpo murino CLB-CD19 en combinación con infusión continua de interleuquina-2 de baja dosis (Vlasveld et al., *Cancer, Immunol. Immunotherapy*, 40:37-47 (1995)). Hubo una remisión parcial en un paciente de leucemia, y se observó una reducción mayor del 50% de las células B en circulación. Las cantidades de células B en circulación no cambiaron en 4 de los 5 pacientes restantes evaluados. Por tanto, la evaluación terapéutica de anticuerpos murinos anti-CD19 es inmunotoxinas basadas en anticuerpo anti-CD19 en seres humanos, generó datos anecdóticos que no pudieron evaluarse para la eficacia.

La publicación internacional N° WO 2005/012493 proporciona proteínas de fusión de anticuerpo anti-CD19 humanizado, quimérico y humano, y fragmentos del mismo que se unen a un marcador de células B humanas. Dichos anticuerpos, proteínas de fusión y fragmentos de los mismos son útiles para el tratamiento y diagnóstico de diversos trastornos de células B, incluyendo neoplasias de células B y enfermedades autoinmunes.

### 3. Sumario de la invención

La invención se refiere a composiciones y anticuerpos inmunoterapéuticos para su uso en métodos para el tratamiento de enfermedades y trastornos de células B en sujetos humanos tales como, aunque sin limitación, neoplasias de células B, usando anticuerpos terapéuticos que se unen al antígeno CD19 humano y que median preferiblemente ADCC humana. La presente invención se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden anticuerpos anti-CD19 humanizados del isotipo humano IgG1 o IgG3. La presente invención se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden anticuerpos anti-CD19 humanizados del isotipo humano IgG1 o IgG3 human que median preferiblemente ADCC humana. La presente invención se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden anticuerpos anti-CD19 quimerizados del isotipo IgG1 o IgG3 que median ADCC humana. En realizaciones preferidas, la presente invención se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden anticuerpos monoclonales anti-CD19 humanizados, o quiméricos.

Se describen formulaciones y regímenes terapéuticos para tratar sujetos humanos diagnosticados con neoplasias de células B que derivan de células B y sus precursores, incluyendo aunque sin limitación, leucemias linfoblásticas agudas (ALL), linfomas de Hodgkin, linfomas no Hodgkin, leucemias linfocíticas crónicas de células B (CLL), mieloma múltiple, linfoma folicular, linfoma de células del manto, leucemias pro-linfocíticas, leucemias de células capilares, leucemias linfocíticas agudas comunes y algunas leucemias linfoblásticas nulas-agudas.

Los anticuerpos para su uso en los métodos de la invención se muestran a modo de ejemplo, usando un modelo de ratón transgénico para evaluar inmunoterapias dirigidas a CD19 en sujetos humanos.

- La invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo monoclonal anti-CD19 quimerizado, o humanizado que (a) es del isotipo humano IgG1 o IgG3, o (b) media la citotoxicidad humana celular dependiente de anticuerpo (ADCC), en un vehículo farmacéuticamente aceptable, donde el anticuerpo comprende las secuencias expuestas como los aminoácidos 33 a 37, los aminoácidos 51 a 68 y los aminoácidos 101 a 115 de la SEC ID N° 2 y las secuencias expuestas como los aminoácidos 43 a 58, los aminoácidos 74 a 80 y los aminoácidos 113 a 121 de la SEC ID N° 16, o las secuencias expuestas como los aminoácidos 33 a 37, los aminoácidos 51 a 68 y los aminoácidos 101 a 114 de la SEC ID N° 4 y las secuencias expuestas como los aminoácidos 44 a 58, los aminoácidos 74 a 80 y los aminoácidos 113 a 121 de la SEC ID N° 18, donde se introduce una sustitución de aminoácido en una o más de dichas secuencias y donde el anticuerpo es capaz de reducir las células B que expresan CD19 de la médula ósea.
- Una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo monoclonal anti-CD19 quimerizado del isotipo humano IgG1 o IgG3 puede ser menor de aproximadamente 1 mg/kg de peso corporal del paciente.
- Una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo monoclonal anti-CD19 quimerizado del isotipo humano IgG1 o IgG3 puede ser mayor de aproximadamente 2 mg/kg de peso corporal del paciente.
- El anticuerpo anti-CD19 que media ADCC puede ser del isotipo humano IgG1, o IgG3.
- El anticuerpo anti-CD19 puede tener una vida media de al menos 4 a 7 días.
- La composición puede comprender una dosis de 1500 mg/m<sup>2</sup> o menos del anticuerpo anti-CD19 y el anticuerpo anti-CD19 puede administrarse por vía parenteral, intraperitoneal, intramuscular, intravenosa o subcutánea.
- La composición puede comprender una dosis de 375 mg/m<sup>2</sup> o menos del anticuerpo anti-CD19 y el anticuerpo anti-CD19 puede administrarse por vía parenteral, intraperitoneal, intramuscular, intravenosa o subcutánea.
- La composición puede comprender una dosis de 1,5 mg/m<sup>2</sup> o menos del anticuerpo anti-CD19 y el anticuerpo anti-CD19 puede administrarse por vía parenteral, intraperitoneal, intramuscular, intravenosa o subcutánea.
- La composición puede comprender una dosis de 0,5 ug/m<sup>2</sup> o menos del anticuerpo anti-CD19 y el anticuerpo anti-CD19 puede administrarse por vía parenteral, intraperitoneal, intramuscular, intravenosa o subcutánea.
- El anticuerpo anti-CD19 puede marcarse de forma detectable, puede ser un anticuerpo desnudo, puede conjugarse con un compuesto terapéutico, puede conjugarse con un agente citotóxico, o puede conjugarse con un agente de diagnóstico.
- El anticuerpo anti-CD19 puede ser biespecífico.
- El anticuerpo anti-CD19 biespecífico puede tener especificidad por la unión a células efectoras.
- La función ADCC del anticuerpo anti-CD19 puede evaluarse midiendo la capacidad del anticuerpo anti-CD19 de mediar la lisis de células diana por células efectoras *in vitro*.
- El anticuerpo anti-CD19 puede comprender una cadena pesada que consiste en una secuencia que tiene al menos un 90% de identidad con la SEC ID N° 2 o SEC ID N° 4.
- El anticuerpo anti-CD19 puede comprender la cadena ligera que consiste en una secuencia que tiene al menos un 95% de identidad con la SEC ID N° 16 o SEC ID N° 18.
- La invención también proporciona un anticuerpo monoclonal anti-CD19 humanizado que (a) es del isotipo humano IgG1 o IgG3, o (b) media la citotoxicidad humana celular dependiente de anticuerpo (ADCC), donde el anticuerpo comprende las secuencias expuestas como los aminoácidos 33 a 37, 51 a 68 y 101 a 115 de la SEC ID N° 2 y las secuencias expuestas como los aminoácidos 43 a 58, 74 a 80 y 113 a 121 de la SEC ID N° 16, o las secuencias expuestas como los aminoácidos 33 a 37, 51 a 68 y 101 a 114 de la SEC ID N° 4 y las secuencias expuestas como los aminoácidos 44 a 58, 74 a 80 y 113 a 121 de la SEC ID N° 18, donde se introduce una sustitución de aminoácido en una o más de dichas secuencias, para su uso en un método para tratar una neoplasia de células B en un paciente humano, donde el anticuerpo es capaz de reducir las células B que expresan CD19 de la médula ósea.
- El anticuerpo anti-CD19 puede comprender una cadena pesada que consiste en una secuencia que tiene al menos un 90% de identidad con la SEC ID N° 2 o la SEC ID N° 4.
- El anticuerpo puede comprender la cadena ligera que consiste en una secuencia que tiene al menos un 95% de identidad con la SEC ID N° 16 o la SEC ID N° 18.
- El anticuerpo puede ser capaz de reducir las células B en circulación.

La neoplasia de células B puede ser leucemia linfoblástica aguda, linfoma de células del manto, leucemia linfoblástica aguda de células pre-B, o linfoma linfoblástico de células B precursoras.

5 El anticuerpo anti-CD19 que media la ADCC puede ser del isotipo humano IgG1 o IgG3.

La neoplasia de células B puede tratarse antes de la administración del anticuerpo anti-CD19.

10 La neoplasia de células B puede tratarse con una terapia diferente a una terapia con anticuerpo anti-CD19 posterior a la administración del anticuerpo anti-CD19.

15 El tratamiento de la neoplasia puede ser quimioterapia, radioinmunoterapia, terapia con toxinas, terapia con enzimas activadoras de profármaco, terapia con anticuerpos, terapia potenciadora de monocitos o macrófagos, terapia inmuno-reguladora, terapia con estatina de la neovascularización tumoral, terapia con caliceamicina, terapia quirúrgica, o cualquier combinación de las mismas.

20 La invención también proporciona un anticuerpo monoclonal anti-CD19 que media la citotoxicidad humana celular dependiente de anticuerpo (ADCC) que comprende las secuencias expuestas como los aminoácidos 33 a 37, los aminoácidos 51 a 68 y los aminoácidos 101 a 115 de la SEC ID N° 2 y las secuencias expuestas como los aminoácidos 43 a 58, los aminoácidos 74 a 80 y los aminoácidos 113 a 121 de la SEC ID N° 16, o las secuencias expuestas como los aminoácidos 33 a 37, los aminoácidos 51 a 68 y los aminoácidos 101 a 114 de la SEC ID N° 4 y las secuencias expuestas como los aminoácidos 44 a 58, los aminoácidos 74 a 80 y los aminoácidos 113 a 121 de la SEC ID N° 18, donde se introduce una sustitución de aminoácido en una o más de dichas secuencias y donde el anticuerpo es capaz de reducir las células B que expresan CD19 de la médula ósea para su uso en un régimen para 25 (a) tratar una enfermedad en fase prematura resultante de una neoplasia de células B en un paciente humano, o (b) tratar una neoplasia de células B en un sujeto humano donde el sujeto humano no ha recibido previamente tratamiento para la neoplasia, la neoplasia de células B es CD19 positiva o el ser humano tiene un recuento de monocitos de al menos 1 por dl, donde el régimen administrado reduce las células B en circulación.

30 El anticuerpo puede comprender una cadena pesada que consiste en una secuencia que tiene al menos un 90% de identidad con la SEC ID N° 2 o la SEC ID N° 4.

35 El anticuerpo anti-CD19 puede comprender la cadena ligera que consiste en una secuencia que tiene al menos un 95% de identidad con la SEC ID N° 16 o la SEC ID N° 18.

Puede administrarse posteriormente una terapia diferente a una terapia con anticuerpo anti-CD19 al ser humano.

40 La terapia puede ser quimioterapia, radioterapia, terapia basada en toxinas, terapia basada en agentes radioquímicos o terapia quirúrgica.

El régimen puede comprender la administración del anticuerpo como un agente terapéutico único, en combinación con otro agente terapéutico, o en combinación con un agente que reduce los efectos secundarios tóxicos.

45 El régimen puede comprender la administración repetida del anticuerpo.

El anticuerpo anti-CD19 puede tener una vida media que es de al menos 4 a 7 días.

El anticuerpo anti-CD19 puede ser un anticuerpo de isotipo humano IgG1 o IgG3.

50 El anticuerpo anti-CD19 puede ser un anticuerpo humanizado.

55 La neoplasia de células B puede ser un linfoma no Hodgkin de subtipo de células B (NHL) incluyendo NHL de grado bajo/folicular, NHL linfocítico pequeño (SL), NHL de grado intermedio/folicular, NHL difuso de grado intermedio, NHL inmunoblástico de grado alto, NHL linfoblástico de grado alto, NHL de células no escindidas pequeñas de grado alto y NHL de enfermedad voluminosa; linfoma de Burkitt; mieloma múltiple; leucemia linfoblástica aguda de pre-B y otras neoplasias que derivan de precursores tempranos de células B; leucemia linfocítica aguda común; leucemia linfocítica crónica; leucemia de células capilares; leucemia linfoblástica nula-aguda; macroglobulinemia de Waldenstrom; y leucemia pro-linfocítica; enfermedad de cadena ligera; plasmacitoma; mieloma osteosclerótico; leucemia de células plasmáticas; gammapatía monoclonal de importancia indeterminada (MGUS); mieloma múltiple asintomático (SMM); mieloma múltiple indolente (IMM); o linfoma de Hodgkin.

El régimen puede comprender adicionalmente administrar un compuesto que potencia la función de monocitos o macrófagos.

65 El ser humano puede estar inmunocomprometido.

El anticuerpo anti-CD19 puede administrarse por vía parenteral, intraperitoneal, o intramuscular.

El anticuerpo anti-CD19 puede administrarse por vía intravenosa o subcutánea.

5 El anticuerpo anti-CD19 puede administrarse por vía subcutánea en una dosis de 37,5 mg/m<sup>2</sup> o menos.

El anticuerpo anti-CD19 puede administrarse en una dosis de 1,5 mg/m<sup>2</sup> o menos.

10 El régimen puede comprender más de una administración del anticuerpo anti-CD19 al ser humano.

El régimen puede comprender adicionalmente administrar un anticuerpo anti-CD20, un anticuerpo anti-CD22, un anticuerpo anti-CD52, o cualquier combinación de los mismos.

15 En una realización, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo monoclonal anti-CD19 humanizado del isotipo humano IgG1 o IgG3 en un vehículo farmacéuticamente aceptable. En otra realización, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo monoclonal anti-CD19 quimerizado del isotipo humano IgG1 o IgG3 en un vehículo farmacéuticamente aceptable. En realizaciones relacionadas, una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo monoclonal anti-CD19 quimerizado del isotipo humano IgG1 o IgG3 es menor de 1 mg/kg de peso corporal del paciente. En otras realizaciones relacionadas, una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo monoclonal anti-CD19 quimerizado del isotipo humano IgG1 o IgG3 es mayor de 2 mg/kg de peso corporal del paciente.

25 De acuerdo con un aspecto, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de anticuerpo monoclonal anti-CD19 humanizado que media la citotoxicidad humana celular dependiente de anticuerpo (ADCC), en un vehículo farmacéuticamente aceptable. La composición farmacéutica puede comprender un anticuerpo monoclonal anti-CD19 quimerizado que media la citotoxicidad humana celular dependiente de anticuerpo (ADCC), y/o citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) y/o actividad apoptótica en un vehículo farmacéuticamente aceptable.

30 La presente invención se refiere a anticuerpos para su uso en un método para tratar una neoplasia de células B en un ser humano que comprende administrar a un ser humano que lo necesite un anticuerpo monoclonal anti-CD19 humanizado del isotipo humano IgG1 o IgG3 en una cantidad suficiente para reducir las células B en circulación. La presente invención también se refiere a anticuerpos para su uso en un método para tratar una neoplasia de células B en un ser humano que comprende administrar a un ser humano que lo necesite un anticuerpo monoclonal anti-CD19 humanizado que media la citotoxicidad humana celular dependiente de anticuerpo (ADCC) en una cantidad suficiente para reducir las células B en circulación. La presente invención se refiere a anticuerpos para su uso en un método para tratar una neoplasia de células B en un paciente humano que comprende la administración de un régimen terapéuticamente eficaz de un anticuerpo monoclonal anti-CD19 humanizado del isotipo humano IgG1 o IgG3 a un paciente humano que necesite dicho tratamiento.

45 En una realización, la presente invención se refiere al tratamiento de una neoplasia de células B en un paciente humano que comprende la administración de un régimen terapéuticamente eficaz de un anticuerpo monoclonal anti-CD19 humanizado que media la citotoxicidad humana celular dependiente de anticuerpo (ADCC), a un paciente humano que necesita dicho tratamiento. En otra realización, la presente invención se refiere al tratamiento de una enfermedad en fase prematura resultante de una neoplasia de células B en un paciente humano que comprende la administración de un régimen terapéuticamente eficaz de un anticuerpo monoclonal anti-CD19 que media la citotoxicidad humana celular dependiente de anticuerpo (ADCC), a un ser humano que necesita dicho tratamiento. En una realización adicional, la presente invención se refiere al tratamiento de una neoplasia de células B en un paciente humano que comprende la administración de un régimen terapéuticamente eficaz de un anticuerpo monoclonal anti-CD19 que media la citotoxicidad humana celular dependiente de anticuerpo (ADCC), a un ser humano que lo necesita, donde el sujeto humano no ha recibido previamente tratamiento para la neoplasia. Otra realización más de la presente invención se refiere al tratamiento de una neoplasia de células B en un paciente humano que comprende la administración de un régimen terapéuticamente eficaz de un anticuerpo monoclonal anti-CD19 que media la citotoxicidad humana celular dependiente de anticuerpo (ADCC), a un paciente humano que necesita dicho tratamiento, donde la neoplasia de células B es CD19 positiva. En una realización adicional, la presente invención se refiere al tratamiento de una neoplasia de células B en un paciente humano que comprende la administración de un régimen terapéuticamente eficaz de un anticuerpo monoclonal anti-CD19 que media la citotoxicidad humana celular dependiente de anticuerpo (ADCC), a un paciente humano que necesita dicho tratamiento, donde el paciente humano tiene un recuento de monocitos de al menos 1 por dl de sangre en circulación.

### 3. 1 Definiciones

65 Como se usa en este documento, los términos "anticuerpo" y "anticuerpos" (inmunoglobulinas) abarcan los anticuerpos monoclonales (se incluyen los anticuerpos monoclonales de longitud completa), los anticuerpos

policionales, 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')<sup>2</sup>, 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 epítomos 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 glucoproteínas 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 (V<sub>H</sub>), seguido por varios dominios constantes. Cada cadena ligera tiene un dominio variable en un extremo (V<sub>L</sub>) 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. Se cree que restos de aminoácidos particulares forman una interfase entre los dominios variables de cadena ligera y pesada. Tales anticuerpos pueden derivarse de cualquier mamífero, que incluye, aunque sin limitación, seres 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 flanqueantes (FR). Los dominios variables de cadenas pesadas y ligeras nativas comprenden cada uno cuatro regiones FR, en gran medida adoptan una configuración en lámina  $\beta$  conectadas por tres CDR, que forman lazos que conectan, y en algunos casos forman parte de la estructura en lámina  $\beta$ . Las CDR en cada cadena se mantienen unidas en estrecha proximidad por las regiones FR y, con las CDR de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión al antígeno de los anticuerpos (véase, Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ª 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 este documento se refiere a los restos de aminoácidos de un anticuerpo que están asociados con su unión al antígeno. Las regiones hipervariables abarcan los restos de aminoácidos de las "regiones determinantes de complementariedad" o "CDR" (por ejemplo, los restos 24-34 (L1), 50-56 (L2) y 89-97 (L3) del dominio variable de la cadena ligera y los restos 31-35 (H1), 50-65 (H2) y 95-102 (H3) del dominio variable de la cadena pesada; Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ª edición, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)) y/o los restos de un "bucle hipervariable" (por ejemplo, los restos 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 restos de "flanqueantes" o "FR" son los restos del dominio variable que flanquean las CDR. Los restos FR 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 este documento 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 (policionales) que típicamente incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítomos), 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. Como alternativa, las células transfectadas de forma estable o transitoria con los genes de las cadenas pesada y ligera que codifican el anticuerpo monoclonal pueden producir el 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 "monoclonal" se usa en este documento para referirse a un anticuerpo que se deriva de una población clonal de células, que incluye cualquier clon eucariota, procariota o 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 descrito por primera vez por Kohler et al., *Nature*, 256:495 (1975), o pueden hacerse por cualquier método de ADN recombinante (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos N° 4.816.567), que incluye el aislamiento a partir de bibliotecas de anticuerpos en fagos por medio del uso de las técnicas descritas, por ejemplo, en Clackson et al., *Nature*, 352:624-628 (1991) y Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222:581-597 (1991). Estos métodos pueden usarse para producir anticuerpos de mamíferos monoclonales, quiméricos, humanizados, humanos, de dominio, diacuerpos, vaccicuerpos, anticuerpos lineales, y 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 muestran la actividad biológica deseada (patente de Estados Unidos N° 4.816.567; Morrison et al., *Proc Natl Acad Sci. Estados Unidos*, 81: 6851-6855 (1984)). Los anticuerpos quiméricos de interés en este documento 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 Estados Unidos N° 5.693.780).

Las formas "humanizadas" de los anticuerpos no-humanos (por ejemplo, murinos) 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 restos de las CDR nativas se reemplazan por los restos 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, restos de la región FR de la inmunoglobulina humana se sustituyen por los correspondientes restos no humanos. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender restos 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 o 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 FR son los de una secuencia de inmunoglobulina humana. En ciertas realizaciones, el anticuerpo humanizado comprenderá al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina (Fc), típicamente la de una inmunoglobulina humana. Para más detalles, véase, Jones et al., *Nature*, 321:522-525 (1986); Riechmann et al., *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 técnica. 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 técnica.

El antígeno "CD19" se refiere a un antígeno de aproximadamente 90 kDa identificado, por ejemplo, por el anticuerpo HD237 o B4 (Kiesel et al., *Leukemia Research* II, 12:1119 (1987)). CD19 se encuentra en células a través de la diferenciación de células de linaje B desde la fase de célula madre a través de la diferenciación terminal en células plasmáticas incluyendo, aunque sin limitación, células pre-B, células B (incluyendo células B vírgenes, células B estimuladas con antígeno, células B de memoria, células plasmáticas, y linfocitos B) y células dendríticas foliculares. CD19 también se encuentra en células B en tejido fetal humano. En realizaciones preferidas, el antígeno CD19 abordado por los anticuerpos de la invención es el antígeno CD19 humano.

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 citolíticas naturales (NK), neutrófilos y macrófagos) reconocen el anticuerpo unido a una célula diana y causan posteriormente la lisis de la célula diana. En una realización, 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 Estados Unidos N° 5.500.362 o 5.821.337. Las células efectoras útiles para estos ensayos incluyen las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y las



células citolíticas 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 et al., 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 et al., 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 Fc $\gamma$ RI, el Fc $\gamma$ RII, Fc $\gamma$ RIII y/o Fc $\gamma$ RIV 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 citolíticas naturales (NK), los monocitos, las células T citotóxicas y los neutrófilos; siendo preferidas las PBMC y células NK. En realizaciones preferidas las células efectoras son células humanas.

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 realización, el FcR es una secuencia humana nativa de FcR. Además, en ciertas realizaciones, el FcR se une a un anticuerpo IgG (un receptor gamma) e incluye los receptores de las subclases Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RII, Fc $\gamma$ RIII, y Fc $\gamma$ RIV, se incluyen variantes alélicas y formas de estos receptores empalmadas alternativamente. Los receptores Fc $\gamma$ RII incluyen el Fc $\gamma$ RIIA (un "receptor activador") y Fc $\gamma$ RIIB (un "receptor inhibidor"), que tienen secuencias de aminoácidos similares que difieren principalmente en los dominios citoplasmáticos de éstos. El receptor activador Fc $\gamma$ RIIA contiene en su dominio citoplasmático un motivo de activación del inmunorreceptor basado en tirosina (ITAM). El receptor inhibidor Fc $\gamma$ RIIB contiene en su dominio citoplasmático un motivo de inhibición del inmunorreceptor basado en tirosina (ITIM). (Véase, Daëron, Annu. Rev. Immunol., 15:203-234 (1997)). Los FcR se revisan en Ravetch y Kinet, Annu. Rev. Immunol, 9:457-92 (1991); Capel et al., Immunomethods, 4:25-34 (1994); y de Haas et al., J. Lab. Clin. Med., 126:330-41 (1995). Otros FcR, incluyendo aquellos a identificar en el futuro, están incluidos por el término "FcR" en este documento. El término también incluye el receptor neonatal, FcRn, que es responsable de la transferencia de IgG maternas al feto (Guyer et al., Immunol., 117:587 (1976) y Kim et al., 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 en 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 V<sub>H</sub>-V<sub>L</sub>. 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 este documento, es un término bien entendido en la técnica y significa la medida, o la fuerza, de unión del anticuerpo al epítipo. La afinidad puede medirse y/o expresarse de varias formas conocidas en la técnica, se incluyen, aunque sin limitación, 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 este documento 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 este documento, o la selección de los métodos de tratamiento descritos en este documento, 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.

Un "epítipo" es un término bien entendido en la técnica 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 este documento es un antígeno expresado en la superficie de una célula B, que puede fijarse como diana con un agente que se una 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 preferiblemente 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 realización, 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 este documento, 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  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma$ , y  $\mu$ , 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. Se sabe que las IgG1 e IgG3 humanas actúan como mediadoras en la ADCC en seres humanos.

Como se usa en este documento, 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).

Como se usa en este documento, el término "antigenicidad" significa que un compuesto es reconocido por un anticuerpo o puede unirse a un anticuerpo e inducir una respuesta inmune.

Como se usa en este documento, 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 técnica, tal como, aunque sin limitación, la modificación de la fluorescencia indirecta de los anticuerpos como se describió por Gray et al., J. Virol. Meth., 44:11-24. (1993).

Por los términos "tratar", "que trata" 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 "tratar", "que trata" o "tratamiento de" (o términos gramaticalmente equivalentes) se refieren a los regímenes de tratamiento, tanto profilácticos como terapéuticos.

Como se usa en este documento, 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 reducir las células B.

Una cantidad "terapéuticamente eficaz" como se usa en este documento, 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 los especialistas en la técnica. Además, los especialistas en la técnica 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

Las Fig. 1A-1E ilustran la expresión de CD19 por líneas de ratón hCD19TG. La Fig. 1A muestra la expresión de CD19 humano y de ratón por células B de ratones hCD19TG (TG-<sup>1+/+</sup>). La Fig. 1B muestra las densidades medias relativas de la expresión de CD19 humano y de ratón por células B sanguíneas CD19<sup>+</sup> de ratones hCD19TG. La Fig. 1C muestra las densidades relativas de la expresión de hCD19 y mCD19 por células B CD19<sup>+</sup> de tejidos de ratón TG-<sup>1+/+</sup>. La Fig. 1D muestra la densidad de unión de anticuerpos anti-CD19 en células B B220<sup>+</sup> de sangre y bazo de ratón de ratones TG-<sup>1+/+</sup>. La Fig. 1E muestra la unión del anticuerpo anti-CD19 a células 300.19 transfectadas por ADNc de hCD19.

Las Fig. 2A-2D muestran la reducción de células B de sangre, bazo, y ganglio linfático en ratones hCD19TG. La Fig. 2A muestra la reducción representativa de células B de sangre, bazo, y ganglio linfático 7 días después de

tratamiento con anticuerpo anti-CD19 o de control de isotipo coincidente (CTL) de ratones TG-1<sup>+/-</sup>. La Fig. 2B muestra un curso de tiempo de reducción de células B en circulación por anticuerpos anti-CD19. La Fig. 2C y Fig. 2D muestran las cantidades de células B en bazo y ganglio linfático ( $\pm$ DTM), respectivamente, después de tratamiento de ratones TG-1<sup>+/-</sup> con anticuerpo anti-CD19 (barras rellenas) o control (barras abiertas) a las dosis indicadas.

Las Fig. 3A-3F representan la reducción de células B en médula ósea después de tratamiento con anticuerpo anti-CD19. La Fig. 3A muestra la expresión representativa de hCD19 y mCD19 por subpoblaciones de células B de médula ósea TG-1<sup>+/-</sup> evaluadas por tinción de inmunofluorescencia de cuatro colores con análisis de citometría de flujo. La Fig. 3B muestra la reducción de células hCD19<sup>+</sup> en la médula ósea de ratones hCD19TG siete días después de tratamiento con anticuerpo FMC63 o de control de isotipo coincidente (250  $\mu$ g) evaluada por tinción de inmunofluorescencia de dos colores con análisis de citometría de flujo. La Fig. 3C muestra la reducción de células B B220<sup>+</sup> representativas en la médula ósea siete días después de tratamiento con anticuerpo anti-CD19 o de control de isotipo coincidente (250  $\mu$ g) de ratones TG-1<sup>+/-</sup>. La Fig. 3D muestra la reducción del subconjunto de células B representativo siete días después de tratamiento con anticuerpo FMC63 o de control de isotipo coincidente (250  $\mu$ g) de ratones TG-1<sup>+/-</sup> evaluado por tinción de inmunofluorescencia de tres colores. Las células IgMB220<sup>lo</sup> pro-/pre-B se subdividieron adicionalmente en base a la expresión de CD43 (paneles inferiores). La Fig. 3E muestra reducción representativa de células CD25<sup>+</sup>a220<sup>lo</sup> pre-B siete días después de tratamiento con anticuerpo FMC63 o de control de isotipo coincidente (250  $\mu$ g) de líneas de ratón hCD19TG evaluado por tinción de inmunofluorescencia de dos colores. La Fig. 3F muestra gráficos de barras que indican cantidades ( $\pm$ DTM) de células pro-B, pre-B, B inmaduras, y maduras dentro de fémures bilaterales siete días después de tratamiento con anticuerpo FMC63 (barras cerradas) o de control (barras abiertas) de  $\geq$  3 parejas de camada.

Las Fig. 4A-4C demuestran que las células B de la cavidad peritoneal son sensibles a tratamiento con anticuerpo anti-CD19. La Fig. 4A muestra la expresión de CD19 humano y de ratón por células B CD5<sup>+</sup>B220<sup>+</sup> B1a y CD5<sup>-</sup>B220<sup>hi</sup> B2 de la cavidad peritoneal (convencionales). La Fig. 4B muestra reducción de células B220<sup>+</sup> de la cavidad peritoneal de ratones TG-1<sup>+/-</sup> tratados con anticuerpos anti-CD19 (HB12a, HB12b, y FMC63 a 250  $\mu$ g; B4 y HD237 a 50  $\mu$ g) o anticuerpo de control (250  $\mu$ g). La Fig. 4C muestra la reducción representativa de células B CD5<sup>+</sup>B220<sup>+</sup> B1a y CD5-B220<sup>hi</sup> B2 siete días después de tratamiento con anticuerpo anti-CD19 o de control de ratones hCD19TG.

La Fig. 5A representa las secuencias de nucleótidos (SEC ID N° 1) y de aminoácidos predicha (SEC ID N° 2) para secuencias de unión de cadena pesada V<sub>H</sub>-D-J<sub>H</sub> del anticuerpo anti-CD19 HB12a. La Fig. 5B representan las secuencias de nucleótidos (SEC ID N° 3) y de aminoácidos predicha (SEC ID N° 4) para secuencias de unión de cadena pesada V<sub>H</sub>-D-J<sub>H</sub> del anticuerpo anti-CD19 HB12b.

La Fig. 6A representan las secuencias de nucleótidos (SEC ID N° 15) y de aminoácidos predicha (SEC ID N° 16) para secuencias de cadena ligera del anticuerpo anti-CD19 HB12a. La Fig. 6B representa las secuencias de nucleótidos (SEC ID N° 17) y de aminoácidos predicha (SEC ID N° 18) para secuencias de cadena ligera del anticuerpo anti-CD19 HB12b.

Las Fig. 7A-7B representan la alineación de secuencia de aminoácidos de anticuerpos publicados de ratón anti-CD19 (humano). La Fig. 7A muestra una alineación de secuencia para secuencias de unión de cadena pesada V<sub>H</sub>-D-J<sub>H</sub> incluyendo una secuencia consenso (SEC ID N° 5), HB12a (SEC ID N° 2), 4G7 (SEC ID N° 6), HB12b (SEC ID N° 4), HD37 (SEC ID N° 7), B43 (SEC ID N° 8), y FMC63 (SEC ID N° 9). La Fig. 7B muestra análisis de secuencia de aminoácidos de cadena ligera V<sub>K</sub> de anticuerpos anti-CD19. Están alineadas la secuencia consenso (SEC ID N° 10), HB12a (SEC ID N° 16), HB12b (SEC ID N° 18), HD37 (SEC ID N° 11), B43 (SEC ID N° 12), FMC63 (SEC ID N° 13), y 4G7 (SEC ID N° 14).

Las Fig. 8A-8C demuestran que la densidad de CD19 influye en la eficacia de la reducción de células B por anticuerpos anti-CD19 *in vivo*. Se muestra la reducción representativa de células B en sangre y bazo en ratones hCD19TG después de tratamiento con anticuerpo HB12b (Fig. 8A) o FMC63 (Fig. 8B) (siete días, 250  $\mu$ g/ratón). La Fig. 8C muestra las densidades relativas de unión de anticuerpo anti-CD19 y anti-CD20 en células B de sangre B220<sup>+</sup> de ratones TG-1<sup>+/-</sup>. La Fig. 8D muestra las densidades relativas de unión de anticuerpo anti-CD19 y anti-CD20 en células B de bazo B220<sup>+</sup> de ratones TG-1<sup>+/-</sup>.

Las Fig. 9A-9D demuestran que la reducción de células B después de tratamiento con anticuerpo anti-CD19 es dependiente de Fc $\gamma$  y monocitos. Fig. 9A Reducción representativa de células B de sangre y bazo 7 días después de tratamiento con anticuerpo contra CD19 o de control de isotipo de camadas hCD19 TG-1<sup>+/-</sup> Fc $\gamma$ <sup>+/-</sup> o TG-1<sup>+/-</sup> Fc $\gamma$ <sup>-/-</sup>. Fig. 9B Reducción de células B en sangre y tejido siete días después de tratamiento con anticuerpo de camadas Fc $\gamma$ <sup>-/-</sup> en el día cero. Fig. 9C Cantidades representativas de células B en ratones hCD19TG-1<sup>+/-</sup> con reducción de monocitos. Fig. 9D Reducción de células B de sangre y tejido siete días después de tratamiento con anticuerpo.

Las Fig. 10A-10D demuestran la duración y respuesta a dosis de la reducción de células B después de tratamiento con anticuerpo anti-CD19. La Fig. 10A muestra las cantidades de células B de sangre B220<sup>+</sup> y células T Th $\gamma$ -1<sup>+</sup> después de tratamiento con anticuerpo FMC63 o de control de isotipo de ratones TG-1<sup>+/-</sup> en el día cero. Las Fig. 10B-C muestran reducción representativa de células B tisulares en ratones mostrados en la Fig. 10A a las 11, 16, y 30 semanas después de tratamiento con anticuerpo, la Fig. 10D muestra respuestas a dosis de anticuerpo anti-CD19 para reducción de células B de sangre, médula ósea, y bazo.

Las Fig. 11A-11C demuestran que CD 19 no se internaliza después de la unión del anticuerpo *in vivo*. Expresión de CD19 en superficie celular y eliminación de células B en ratones TG-1<sup>+/-</sup> tratados con anticuerpo HB12a (Fig. 11A), HB12b (Fig. 11B), FMC63 (Fig. 11C) o de control de isotipo coincidente. (250 µg) *in vivo*.

Las Fig. 12A-12C demuestran la saturación de CDC19 después de la unión del anticuerpo anti-CD19 *in vivo*. La Fig. 12A muestra la eliminación de células B en ratones TG-1<sup>+/-</sup> tratados con anticuerpo FMC63 o de control de isotipo coincidente (250 µg) *in vivo*. La Fig. 12B muestra que el tratamiento con anticuerpo FMC63 (250 µg) satura los sitios de unión del anticuerpo en hCD19 en 1 hora de administración. La Fig. 12C muestra que el tratamiento con anticuerpo anti-CD19 HB12b (250 µg) satura los sitios de unión del anticuerpo en hCD19 en 1 hora de administración evaluado en la Fig. 12B.

Las Fig. 13A-13B demuestran que el tratamiento con anticuerpo anti-CD19 reduce los niveles séricos de inmunoglobulina y autoanticuerpo en ratones TG-1<sup>+/-</sup>. La Fig. 13A representa los niveles séricos de inmunoglobulina y la Fig. 13B los niveles de autoanticuerpo anti-ADNbc, anti-ADNmc y anti-histona después de tratamiento con anticuerpo anti-CD19.

Las Fig. 14A-14B demuestran que el tratamiento con anticuerpo anti-CD19 bloquea las respuestas inmunes humorales en ratones TG-1<sup>+/-</sup>. Los ratones tratados con anticuerpo se inmunizaron con Fig. 14A TNP-LPS, Fig. 14B DNP-Ficoll y Fig. 14C-14D DNP-KLH. Las camadas se trataron con anticuerpo FMC63 (círculos cerrados) o de control (círculos abiertos) (250 µg) (A-C) 7 días antes o (D) 14 días después de las inmunizaciones primarias en el día 0.

La Fig. 15 demuestra que los tratamientos simultáneos de anticuerpo anti-CD19 y anti-CD20 son aditivos.

La Fig. 16 demuestra que la administración subcutánea (s.c.), intraperitoneal (i.p.) e i.v. de anticuerpo anti-CD19 reduce de forma eficaz las células B en circulación y tejido *in vivo*.

Fig. 17A-17B. El tratamiento con anticuerpo anti-CD19 previene el crecimiento de linfoma hCD19<sup>+</sup> *in vivo* (Fig. 17A) y aumenta la tasa de supervivencia (Fig. 17B).

## 5. Descripción detallada de la invención

La invención se refiere a composiciones y anticuerpos inmunoterapéuticos para su uso en métodos para el tratamiento de enfermedades y trastornos de células B en sujetos humanos tales como, aunque sin limitación, neoplasias de células B, usando anticuerpos terapéuticos que se unen al antígeno CD19 y preferiblemente median ADCC humana. La presente invención se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden anticuerpos anti-CD19 humanizados, o quiméricos del isotipo humano IgG1 o IgG3. La presente invención también se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden anticuerpos anti-CD19 humanizados del isotipo humano IgG2 o IgG4 que preferiblemente median ADCC humana. En ciertas realizaciones, la presente invención también se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden anticuerpos anti-CD19 monoclonales humanizados, o quimerizados que pueden producirse por medios conocidos en la técnica.

Se describen formulaciones y regímenes terapéuticos para tratar sujetos humanos diagnosticados con neoplasias de células B que derivan de células B y sus precursores incluyendo, aunque sin limitación, leucemias linfoblásticas agudas (ALL), linfomas de Hodgkin, linfomas no Hodgkin, leucemias linfocíticas crónicas de células B (CLL), mieloma múltiple, linfoma folicular, linfoma de células del manto, leucemias pro-linfocíticas, leucemias de células capilares, leucemias linfocíticas agudas comunes y algunas leucemias linfoblásticas nulas-agudas.

### 5.1 Generación de anticuerpos anti-CD19

#### 5.1.1. Anticuerpos policlonales anti-CD19

Los anticuerpos policlonales se crean preferiblemente en animales por múltiples inyecciones subcutáneas (sc) o intraperitoneales (i.p.) del antígeno relevante y un adyuvante. Puede ser útil conjugar el antígeno relevante con una proteína que sea inmunogénica en la especie a inmunizar, por ejemplo, hemocianina de lapa californiana, albúmina sérica, tiroglobulina bovina, o inhibidor de tripsina de soja usando un agente bifuncional o derivatizante, por ejemplo, éster de maleimidobertzoil sulfosuccinimida (conjugación a través de restos de cisteína), N-hidroxisuccinimida (a través de restos de lisina), glutaraldehído, anhídrido succínico, SOCl<sub>2</sub>.

Los animales se inmunizan frente al antígeno, conjugados inmunogénicos, o derivados combinando, por ejemplo, 100 µg o 5 µg de la proteína o conjugado (para conejos o ratones, respectivamente) con 3 volúmenes de adyuvante completo de Freund e inyectando la solución por vía intradérmica en múltiples sitios. Un mes después los ratones se refuerzan con 1/5 a 1/10 de la cantidad original de péptido o conjugado en adyuvante incompleto de Freund por inyección subcutánea en múltiples sitios. De siete a 14 días después se extrae sangre de los animales y se ensaya el suero para el título de anticuerpo. Los animales se refuerzan hasta que el título alcanza un nivel constante. Preferiblemente, el animal se refuerza con el conjugado del mismo antígeno, pero se conjuga con una proteína diferente y/o a través de un reactivo diferente de reticulación. Los conjugados también pueden prepararse en cultivo celular recombinante como fusiones proteicas. Además, se usan adecuadamente agentes de agregación tales como alumbre para potenciar la respuesta inmune.

#### 5.1.2. Anticuerpos monoclonales anti-CD19

Los anticuerpos monoclonales anti-CD19 de la invención muestran especificidad de unión al antígeno CD19 humano y pueden mediar preferiblemente la ADCC humana. Estos anticuerpos pueden generarse usando una amplia diversidad de técnicas conocidas en la técnica incluyendo el uso de hibridoma, tecnologías de presentación recombinante, y en fagos, o una combinación de las mismas. Los anticuerpos son altamente específicos, estando dirigidos contra un único sitio antigénico. Además, en contraste con las preparaciones convencionales de anticuerpos (policlonales) que típicamente incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítomos), cada anticuerpo monoclonal está dirigido contra un único determinante en el antígeno CD19 humano. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales a usar de acuerdo con la presente invención pueden prepararse por el método de hibridoma descrito por primera vez por Kohler et al., *Nature*, 256:495 (1975), que puede usarse para generar anticuerpos murinos (o anticuerpos derivados de otros mamíferos no humanos, por ejemplo, rata, cabra, oveja, vaca, camello, etc.), o anticuerpos humanos derivados de animales transgénicos (véanse, las patentes de Estados Unidos N° 6.075.181, 6.114.598, 6.150.584, y 6.657.103). Como alternativa, los anticuerpos monoclonales pueden prepararse por métodos de ADN recombinante (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos N° 4.816.567) e incluyen anticuerpos quiméricos y humanizados. Los "anticuerpos monoclonales" también pueden aislarse de bibliotecas de anticuerpos en fagos usando las técnicas descritas en Clackson et al., *Nature*, 352:624-628 (1991) y Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222:581-597 (1991), por ejemplo.

Puede producirse un anticuerpo anti-CD19 modificado por ingeniería mediante cualquier medio conocido en la técnica incluyendo, aunque sin limitación, aquellas técnicas descritas a continuación y mejoras a esas técnicas. La producción a gran escala de alta producción típicamente implica cultivar una célula hospedadora que produce el anticuerpo anti-CD19 modificado por ingeniería y recuperar el anticuerpo anti-CD19 del cultivo de células hospedadoras.

#### 5.1.3. Técnica de hibridoma

Los anticuerpos monoclonales pueden producirse por medio de las técnicas de hibridoma, que incluyen aquellas conocidas en la técnica y que se enseñan, por ejemplo, en Harlow et al., *Anticuerpos: Un manual de laboratorio*, (Cold Spring Harbor Laborator y Press, 2da ed. 1988.); Hammerling et al., 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 hospedador apropiado, tal como un hámster o un 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*. Después, los linfocitos 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*, pág. 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 et al., *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, pág. 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 convencionales (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, pág. 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.

## 5.1.4. Técnicas de ADN recombinante

El ADN que codifica un anticuerpo anti-CD19 descrito en este documento se aísla y secuenciar 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 hospedadoras 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 hospedadoras 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 V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> se amplifican a partir de bibliotecas de ADNc de animales (por ejemplo, las bibliotecas de ADNc humano o murino de los tejidos afectados). El ADN de codificación de los dominios V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> 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 V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> 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 et al., 1995, J. Immunol. Methods, 182:41-50; Ames et al., 1995, J. Immunol. Methods, 184:177-186; Kettleborough et al., 1994, Eur. J. Immunol., 24:952-958; Persic et al., 1997, Gene, 187:9-18; Burton et al., 1994, Advances in Immunology, 57:191-280; solicitud internacional N° PCT/GB91/O1 134; publicación internacional N° 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 Estados Unidos N° 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 hospedador 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')<sub>2</sub> pueden emplearse también por medio del uso de métodos conocidos en la técnica tales como los descritos en la publicación PCT N° WO 92/22324; Mullinax et al., 1992, BioTechniques, 12. (6):864-869; Sawai et al., 1995, AJRI, 34:26-34; y Better et al., 1988, Science, 240:1041-1043.

Los anticuerpos pueden aislarse a partir de bibliotecas de anticuerpos en fagos que se generan por medio del uso de las técnicas descritas en McCafferty et al., Nature, 348:552-554 (1990). Clackson et al., Nature, 352:624-628 (1991). Marks et al., J. Mol. Biol., 222:581-597 (1991) describen el aislamiento de anticuerpos humanos y murinos respectivamente, por medio del uso de bibliotecas de fagos. El intercambio de cadenas puede usarse en la producción de anticuerpos humanos de alta afinidad (intervalo nM) (Marks et al., Bio/Technology, 10:779-783 (1992)), así como por la infección combinatoria y recombinación in vivo como una estrategia para la construcción de bibliotecas de fagos muy grandes (Waterhouse et al., 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 V<sub>H</sub> o V<sub>L</sub>, un sitio de restricción, y una secuencia flanco para proteger que el sitio de restricción pueda usarse para amplificar las secuencias V<sub>H</sub> o V<sub>L</sub> en clones de scFv. Por medio del uso de las técnicas de clonación conocidas por los especialistas en la técnica, los dominios V<sub>H</sub> 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 V<sub>L</sub> 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 V<sub>H</sub> o V<sub>L</sub> pueden comprender un promotor EF-1a, 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 V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> 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 los especialistas en la técnica.

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 Estados Unidos N° 4.816.567; Morrison et al., 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 que no es una inmunoglobulina.

#### 5.1.5. Anticuerpos quiméricos

Los anticuerpos anti-CD19 en este documento 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 (patente de Estados Unidos N° 4.816.567, Morrison et al., Proc Natl. Acad Sci Estados Unidos, 81:6851-6855 (1984)). Los anticuerpos quiméricos de interés en este documento 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 rhesus o cinomolgos) y secuencias de la región constante humana (patente de Estados Unidos N° 5.693.780).

#### 5.1.6. Anticuerpos anti-CD19 humanizados

Un anticuerpo humanizado puede producirse usando una diversidad de técnicas conocidas en la técnica, que incluyen, aunque sin limitación, injerto de CDR (véase, por ejemplo, la patente europea N° EP 239.400; la publicación internacional N° WO 91/09967, y las patentes de Estados Unidos N° 5.225.539, 5.530.101, y 5.585.089), recubrimiento o remodelado (véase, por ejemplo, las patentes europeas N° EP 592.106 y EP 519.596; Padlan, 1991, Molecular Immunology, 28 (4/5):489-498; Studnicka et al., 1994, Protein Engineering, 7 (6) :805-814; y Roguska et al., 1994, Proc. Natl. Acad.Sci., 91:969-973), intercambio de cadenas (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos N° 5.565.332, y las técnicas descritas en, por ejemplo, la patente de Estados Unidos N° 6.407.213, la patente de Estados Unidos N° 5.766.886, la publicación internacional N° WO 9317105, Tan et al., J. Immunol., 169:1119-25 (2002), Caldas et al., Protein Eng., 13 (5) :353-60 (2000), Morea et al., Methods, 20 (3) :267-79 (2000), Baca et al., J. Biol. Chem., 272 (16):10678-84 (1997), Roguska et al., Protein Eng., 9 (10):895-904 (1996), Couto et al., Cancer Res., 55 (Sup. 23):5973s-5977s (1995), Couto et al., Cancer Res., 55 (8):1717-22 (1995), Sandhu JS, Gene, 150 (2):409-10 (1994) y Pedersen et al., J. Mol. Biol., 235 (3):959-73 (1994). A menudo, restos FR en las regiones FR se sustituirán con el resto correspondiente del anticuerpo donante de la CDR para alterar, preferiblemente mejorar, la unión al antígeno. Estas sustituciones en los FR se identifican por métodos bien conocidos en la técnica, por ejemplo, por la modelación de las interacciones de las CDR y los restos de los FR para identificar restos de los FR importantes para la unión al antígeno y la comparación de secuencia para identificar los restos de los FR inusuales en posiciones particulares (véase, por ejemplo, Queen et al., patente de Estados Unidos N° 5.585.089; y Riechmann et al., 1988, Nature, 332: 323).

Un anticuerpo humanizado anti-CD19 tiene uno o más restos de aminoácidos introducidos en él de una fuente nohumana. Estos restos de aminoácidos no humanos se denominan a menudo como restos "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 flanqueantes humanas. La humanización de anticuerpos es bien conocida en la técnica y esencialmente puede realizarse según el método de Winter et al. (Jones et al., Nature, 321:522-525 (1986); Riechmann et al., Nature, 332:323-327 (1988); Verhoeyen et al., 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 (documento EP 239.400; publicación PCT N° WO91/09967; y patentes de Estados Unidos N° 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 restos de las CDR y posiblemente algunos restos de los FR se sustituyen por restos de sitios análogos en los anticuerpos de roedores. La humanización de los anticuerpos anti-CD19 también puede lograrse por recubrimiento o remodelación (documentos EP 592.106; EP 519.596; Padlan, 1991, Molecular Immunology 28 (4/5):489-498; Studnicka et al., Protein Engineering, 7 (6):805-814 (1994); y Roguska et al., Proc Natl Acad. Sci., 91:969-973 (1994)) o el intercambio de cadenas (patente de Estados Unidos N° 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 biblioteca 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 restos específicos que pueden ser críticos para la unión del antígeno, la formación estructural adecuada y/o la estabilidad del mAb humanizado previsto (Sims et al., J. Immunol, 151:2296 (1993); Chothia et al., J. Mol. Biol., 196:901 (1987). Las secuencias de los FR resultantes que coinciden con los criterios deseados se usan luego como las regiones de los FR humanos donantes para el anticuerpo humanizado.

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

humanizados diferentes (Carter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos, 89:4285 (1992); Presta et al., 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 los especialistas en la técnica. 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 restos en el funcionamiento de la secuencia de la inmunoglobulina candidata, es decir, el análisis de los restos que influyen en la capacidad de la inmunoglobulina candidata para unirse al CD19. De esta manera, los restos de las FR 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 restos 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 et al., J. Mol. Biol., 294:151 (1999).

#### 5.1.7. Anticuerpos humanos

Para uso *in vivo* de anticuerpos en seres humanos, puede ser preferible usar anticuerpos humanos. Los anticuerpos completamente humanos son particularmente deseables para tratamiento terapéutico de sujetos humanos. Los anticuerpos humanos pueden prepararse por una diversidad de métodos conocidos en la técnica incluyendo métodos de presentación en fagos descritos anteriormente usando bibliotecas de anticuerpos derivadas de secuencias humanas de inmunoglobulina, incluyendo mejoras a estas técnicas. Véanse, también, las patentes de Estados Unidos N° 4.444.887 y 4.716.111; y las publicaciones PCT WO 98/46645, WO 98/50433, WO 98/24893, WO98/16654, WO 96/34096, WO 96/33735, y WO 91/10741. Un anticuerpo humano también puede ser un anticuerpo donde las cadenas pesada y ligera están codificadas por una secuencia de nucleótidos derivada de una o más fuentes de ADN humano.

Los anticuerpos humanos anti-CD 19 también pueden producirse usando ratones transgénicos que son incapaces de expresar inmunoglobulinas endógenas funcionales, pero que pueden expresar genes humanos de inmunoglobulina. Por ejemplo, pueden introducirse complejos génicos de inmunoglobulina humana de cadena pesada y ligera aleatoriamente o por recombinación homóloga en células madre embrionarias de ratón. Como alternativa, la región variable, la región constante, y la región de diversidad humanas pueden introducirse en células madre embrionarias de ratón además de los genes humanos de cadena pesada y ligera. Los genes de ratón de inmunoglobulina de cadena pesada y ligera pueden volverse no funcionales por separado o simultáneamente con la introducción de loci de inmunoglobulina humana por recombinación homóloga. Por ejemplo, se ha descrito que la delección homocigótica del gen de la región de unión de cadena pesada del anticuerpo (JH) en ratones quiméricos y mutantes de la línea germinal provoca la inhibición completa de la producción de anticuerpos endógenos. Las células madre embrionarias modificadas se expanden y se micro-inyectan en blastocistos para producir ratones quiméricos. Después, los ratones quiméricos se crían para producir descendencia homocigótica que exprese anticuerpos humanos. Los ratones transgénicos se inmunizan del modo normal con un antígeno seleccionado, por ejemplo, todo o una parte de un polipéptido de la invención. Pueden obtenerse anticuerpos anti-CD19 dirigidos contra el antígeno CD19 humano a partir de ratones transgénicos inmunizados usando tecnología convencional de hibridoma. Los transgenes de inmunoglobulina humana albergados por los ratones transgénicos se reordenan durante la diferenciación de células B, y posteriormente experimentan cambio de clase y mutación somática. Por tanto, usando dicha técnica, es posible producir anticuerpos IgG, IgA, IgM e IgE terapéuticamente útiles, incluyendo, aunque sin limitación, IgG1 (gamma 1) e IgG3. Para un resumen de esta tecnología para producir anticuerpos humanos véase, Lonberg y Huszar (Int. Rev. Immunol., 13:65-93 (1995)). Para un análisis detallado de esta tecnología para producir anticuerpos humanos y anticuerpos monoclonales humanos y protocolos para producir dichos anticuerpos véanse, por ejemplo, las publicaciones PCT N° WO 98/24893, WO 96/34096, y WO 96/33735; y las patentes de Estados Unidos N° 5.413.923; 5.625.126; 5.633.425; 5.569.825; 5.661.016; 5.545.806; 5.814.318; y 5.939.598. Además, empresas tales como Abgenix, Inc. (Freemont, CA) y Genpharm (San Jose, CA) comprometerse a proporcionar anticuerpos humanos dirigidos contra un antígeno seleccionado usando tecnología similar a la descrita anteriormente. Para un análisis específico de transferencia de una serie de genes de inmunoglobulina de la línea germinal humana en ratones mutantes en la línea germinal que provocará la producción de anticuerpos humanos tras exposición a antígeno véase, por ejemplo, Jakobovits et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:2551 (1993); Jakobovits et al., Nature, 362:255-258 (1993); Bruggermann et al., Year in Immunol., 7:33 (1993); y Duchosal et al., Nature, 355:258 (1992).



Los anticuerpos humanos también pueden obtenerse de bibliotecas de presentación en fagos (Hoogenboom et al., J. Mol. Biol., 227:381 (1991); Marks et al., J. Mol. Biol., 222:581-597 (1991); Vaughan et al., Nature Biotech., 14:309 (1996)). La tecnología de presentación en fagos (McCafferty et al., Nature, 348:552-553 (1990)) puede usarse para producir anticuerpos humanos y fragmentos de anticuerpo *in vitro*, a partir de repertorios génicos de dominio variable (V) de inmunoglobulina de donantes no inmunizados. De acuerdo con esta técnica, se clonan genes del dominio V de anticuerpo en fase en un gen de proteína de envuelta principal o minoritaria de un bacteriófago filamentoso, tal como M13 o fd, y se presentan como fragmentos de anticuerpo funcionales sobre la superficie de la partícula fágica. Como la partícula filamentosa contiene una copia de ADN monocatenario del genoma del fago, selecciones basadas en las propiedades funcionales del anticuerpo también provocan la selección del gen que codifica el anticuerpo que muestra esas propiedades. Por tanto, el fago imita algunas de las propiedades de la célula B. La presentación en fagos puede realizarse en una diversidad de formatos; para su revisión véase, por ejemplo, Johnson, Kevin S. y Chiswell, David J., Current Opinion in Structural Biology 3:564-571 (1993). Pueden usarse varias fuentes de segmentos génicos V para la presentación en fagos. Clackson et al., Nature, 352:624-628 (1991) aislaron una serie diversa de anticuerpos anti-oxazolona de una pequeña biblioteca combinatoria aleatoria de genes V derivados de los bazos de ratones inmunizados. Puede construirse un repertorio de genes V de donantes humanos no inmunizados y pueden aislarse los anticuerpos contra una serie diversa de antígenos (incluyendo auto-antígenos) siguiendo esencialmente las técnicas descritas por Marks et al., J. Mol. Biol., 222:581-597 (1991), o Griffith et al., EMBO J., 12:725-734 (1993). Véanse, también, las patentes de Estados Unidos N° 5.565.332 y 5.573.905.

Los anticuerpos humanos también pueden generarse por células N activadas *in vitro* (véanse, las patentes de Estados Unidos 5.567.610 y 5.229.275). Los anticuerpos humanos también pueden generarse *in vitro* usando técnicas de hibridoma tales como, aunque sin limitación, las descritas por Roder et al. (Methods Enzymol., 121:140-167 (1986)).

#### 5.1.8. Anticuerpos alterados/mutantes

Los anticuerpos anti-CD19 de las composiciones y para su uso en los métodos de la invención pueden ser anticuerpos mutantes. Como se usa en este documento, "anticuerpo mutante" o "anticuerpo alterado" se refiere a una secuencia de aminoácidos variante de un anticuerpo anti-CD19 donde uno o más de los restos de aminoácido de un anticuerpo anti-CD19 se han modificado. Las modificaciones en la secuencia de aminoácidos del anticuerpo anti-CD19 incluyen modificaciones en la secuencia para mejorar la afinidad o avidéz del anticuerpo por su antígeno, y/o modificaciones de la parte Fc del anticuerpo para mejorar la función efectora. Las modificaciones pueden hacerse para anticuerpos anti-CD19 conocidos o anticuerpos anti-CD19 identificados como se describe en este documento. Dichos anticuerpos alterados necesariamente tienen menos del 100% de identidad o similitud de secuencia con un anticuerpo anti-CD19 conocido. El anticuerpo alterado puede tener una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 25%, 35%, 45%, 55%, 65%, o 75% de identidad o similitud de secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos del dominio variable de cadena pesada o ligera de un anticuerpo anti-CD19, más preferiblemente al menos un 80%, más preferiblemente al menos un 85%, más preferiblemente al menos un 90%, y mucho más preferiblemente al menos un 95%. El anticuerpo alterado puede tener una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 25%, 35%, 45%, 55%, 65%, o 75% de identidad o similitud de secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos de la CDR1, CDR2, o CDR3 de cadena pesada de un anticuerpo anti-CD19, más preferiblemente al menos un 80%, más preferiblemente al menos un 85%, más preferiblemente al menos un 90%, y mucho más preferiblemente al menos un 95%. En una realización preferida, el anticuerpo alterado mantendrá la capacidad de unión a CD19 humano. El anticuerpo anti-CD19 de la invención puede comprender una cadena pesada que es aproximadamente un 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o más idéntica a una secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 2 (Fig. 5A) correspondiente a la cadena pesada de HB12a. El anticuerpo anti-CD19 de la invención puede comprender una cadena pesada que es aproximadamente un 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o más idéntica a una secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 4 (Fig. 5B) correspondiente a la cadena pesada de HB12b. El anticuerpo anti-CD19 de la invención puede comprender una cadena ligera que es aproximadamente un 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o más idéntica a una secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 16 (Fig. 6A) correspondiente a la cadena ligera de HB12a. El anticuerpo anti-CD19 de la invención puede comprender una cadena ligera que es aproximadamente un 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o más idéntica a una secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 18 (Fig. 6B) correspondiente a la cadena ligera de HB12b. Los hibridomas que producen anticuerpos anti-CD19 HB12a y HB12b se han depositado con los números de depósito de la ATCC PTA-6580 y PTA-6581.

La identidad o similitud con respecto a una secuencia se define en este documento como el porcentaje de restos de aminoácidos en la secuencia candidata que son idénticos (es decir, el mismo resto) o similar (es decir el resto de aminoácido del mismo grupo basado en las propiedades de las cadenas laterales comunes, ver más adelante) a restos de anticuerpos anti-CD19, después de alinear las secuencias e introducir huecos, si es necesario, para lograr el máximo porcentaje de identidad de secuencia. Ninguna de las extensiones, delecciones 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 técnica, 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. l 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 técnica. Así, por ejemplo, los programas están disponibles en el paquete de análisis de secuencia de Wisconsin, versión 9.1 (Devereux, J. et al., 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 polinucleótido 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. Preferiblemente los parámetros "peso hueco" y "peso de longitud" que se usan en cada programa son 50 y 3 para polinucleótidos y 12 y 4 para polipéptidos, respectivamente. Preferiblemente, 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 técnica, 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](http://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 et al., 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 huecos para propósitos de comparación, el Gapped Blast puede usarse como se describe en Altschul et al., 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). Véase, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.

Otro ejemplo no limitante preferido de un algoritmo matemático utilizado para la comparación de secuencias es el algoritmo de Myers y Miller, 1988, CABIOS 4:11-17. Dicho algoritmo se incorpora en el programa ALIGN (versión 2.0) que es parte del paquete de software de alineación de secuencias GCG. Cuando se utiliza el programa ALIGN para comparar secuencias de aminoácidos, puede usarse una tabla de pesos de restos PAM120, una penalización por longitud de hueco de 12, y una penalización por hueco de 4.

Otro ejemplo no limitante de un programa para determinar la identidad y/o similitud entre las secuencias conocidas en la técnica 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). Preferiblemente, la matriz de sustitución de aminoácido Blosum62 (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 técnica 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 hueco 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 huecos. En el cálculo de porcentaje de identidad, por lo general se cuentan las coincidencias exactas.

- 5 Preferiblemente, 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.
- 10 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 restos 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 restos de la región de marco para modificar incluyen aquellos que se unen directamente de forma no covalente al antígeno (Amit et al., Science, 233:747-753 (1986).); interactúan/afectan la conformación de una CDR (Chothia et al., J.Mol. Biol., 196:901-917 (1987)); y/o participan en la interfase V<sub>L</sub>-V<sub>H</sub> (documento EP 239 400B1). La modificación de uno o más de tales restos 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 restos flanqueantes pueden modificarse en esta realización 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 restos de la región hipervariable se modifica. Normalmente, sin embargo, un anticuerpo alterado comprenderá alteración(es) adicional(es) en la región hipervariable.
- 20 Los restos 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.
- 25 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 restos de la(s) región(es) hipervariable(s) se sustituyen por un resto de alanina o polialanina(s) para afectar la interacción de los aminoácidos con el antígeno de la segunda especie de mamífero. Aquellos restos 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 este documento.
- 30 Otro procedimiento para generar ese anticuerpo alterado implica la maduración de afinidad por medio del uso de la expresión en fagos (Hawkins et al., J.Mol. Biol., 254:889-896 (1992) y Lowman et al., 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 este documento.
- 35 Las mutaciones en las secuencias de anticuerpos pueden incluir sustituciones, deleciones, que incluye deleciones internas, adiciones, que incluye adiciones que producen proteínas de fusión, o sustituciones conservadoras de restos de aminoácidos dentro de y/o adyacentes a la secuencia de aminoácidos, pero que resultan en un cambio "silencioso", 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 restos 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 restos 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, aunque sin limitación, los isómeros D de los aminoácidos comunes, ácido  $\alpha$ -amino isobutírico, ácido 4-aminobutírico, Abu, ácido 2-amino butírico,  $\gamma$ -Abu,  $\epsilon$ -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,  $\beta$ -alanina, fluoro-aminoácidos, aminoácidos de diseño tales como  $\beta$ -metil aminoácidos, C $\alpha$ -metil aminoácidos, N-metil  $\alpha$  aminoácidos, y los análogos de aminoácidos en general.
- 60
- 65

Puede madurarse la afinidad de los sitios seleccionados para la modificación mediante la expresión en fagos (véase anteriormente).

Cualquier técnica para mutagénesis conocida en la técnica 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, aunque sin limitación, mutagénesis química, mutagénesis dirigida in vitro (Kunkel, Proc Natl. Acad Sci Estados Unidos, 82:488 (1985); Hutchinson, C. et al., J. Biol. Chem., 253: 6551 (1978)), mutagénesis dirigida a oligonucleótidos (Smith, Ann Rev. Genet, 19:423-463 (1985.); Hill et al., Methods Enzymol, 155:558-568 (1987)), extensión por solapamiento basada en la PCR (Ho et al., Gene, 77:51-59 (1989)), mutagénesis con megacebador basada en la PCR (Sarkar et al., Biotechniques, 8:404-407 (1990)), etc. Las modificaciones pueden confirmarse por secuenciación de dideoxi- ADN bicatenario.

En ciertas realizaciones de la invención los anticuerpos anti-CD19 pueden 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 realizaciones, 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, aunque sin limitación 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*. Véase, por ejemplo, Pastan et al., Cell, 47:641 (1986), y Goldenberg et al., 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 *Phytolacca 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. Véase, 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 de SYNAGIS® o fragmentos del mismo (por ejemplo, un anticuerpo o un fragmento del mismo con mayor afinidad y menor tasa de disociación). Véase, en general, las patentes de Estados Unidos N° 5.605.793, 5.811.238, 5.830.721, 5.834.252 y 5.837.458, y Patten et al., 1997, Curr. Opin. Biotechnol, 8:724-33; Harayama, 1998, Trends Biotechnol. 16 (2): 76-82; Hansson et al., 1999, J. Mol. Biol., 287:265-76; y Lorenzo y Blasco, 1998, Biotechniques 24 (2): 308 -313. El anticuerpo puede ser una proteína de fusión de dominio de unión de inmunoglobulina como se describe en la publicación de Estados Unidos 20030118592, la publicación de Estados Unidos 200330133939, y la publicación PCT WO 02/056910, todo de Ledbetter et al.

#### 5.1.9. Anticuerpos de dominio

Los anticuerpos anti-CD19 de las composiciones y para su uso en los métodos de la invención 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 pesada ( $V_H$ ) o ligera ( $V_L$ ) de los anticuerpos humanos. Los ejemplos de anticuerpos de dominio incluyen, aunque sin limitación, los disponibles de Domantis Limited (Cambridge, Reino Unido) y Domantis Inc. (Cambridge, MA, Estados Unidos) que son específicos para dianas terapéuticas (véase, por ejemplo, el documento WO04/058821; documento WO04/003019, las patentes de Estados Unidos N° 6.291.158, 6.582.915, 6.696.245 y 6.593.081). Las bibliotecas disponibles en el mercado de dominios de anticuerpos pueden usarse para identificar anticuerpos anti-CD19 de dominio. Los anticuerpos anti-CD19 de la invención pueden comprender una unidad funcional de unión al CD19 y una unidad funcional de unión al receptor Fc gamma.

#### 5.1.10. 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 ( $V_H$ ) conectado a un dominio variable de cadena ligera ( $V_L$ ) en la misma cadena polipeptídica ( $V_H$ - $V_L$ ). 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, los documentos EP 404.097, WO 93/11161; y Hollinger et al., Proc Natl. Acad Sci Estados Unidos, 90:6444-6448 (1993).

## 5.1.11. Vaccicuerpos

Los anticuerpos anti-CD19 son vaccicuerpos. Los vaccicuerpos son polipéptidos diméricos. Cada monómero de un vaccicuerpo consiste en un scFv con especificidad por una molécula de superficie sobre una APC conectado a través de una región bisagra y un dominio Cy3 a un segundo scFv. 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, véase, Bogen et al., publicación de solicitud de patente de Estados Unidos N° 20040253238.

## 5.1.12. Anticuerpos lineales

Los anticuerpos anti-CD19 pueden ser anticuerpos lineales. Los anticuerpos lineales comprenden un par de segmentos Fd en tándem (VH-CH1-VH-CH1) los cuales forman un par de regiones de unión al antígeno. Los anticuerpos lineales pueden ser biespecífico o monoespecífico. Véase, Zapata et al., Protein Eng., 8 (10):1057-1062 (1995).

## 5.1.13. Anticuerpo parental

En ciertas realizaciones de la invención, el anticuerpo anti-CD19 es 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 restos 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 este documento. 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 este documento. 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 de origen natural. Preferiblemente el anticuerpo parental es un anticuerpo humanizado o un anticuerpo humano.

## 5.1.14. 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')<sub>2</sub>, 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 (véase, por ejemplo, Morimoto et al., Journal of Biochemical and Biophysical Methods, 24:107-117 (1992) y Brennan et al., Science, 229:81 (1985)). Sin embargo, estos fragmentos pueden producirse ahora directamente por células hospedadoras recombinantes. Por ejemplo, los fragmentos de anticuerpo pueden aislarse a partir de las bibliotecas 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')<sub>2</sub> (Carter et al., Bio/Technology, 10:163-167 (1992)). Según otro enfoque, los fragmentos F (ab')<sub>2</sub> pueden aislarse directamente del cultivo de la célula hospedadora recombinante. Otras técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpos serán evidentes para los especialistas. En otras realizaciones, el anticuerpo de elección es un fragmento Fv de simple cadena (scFv). Véase, por ejemplo, WO 93/16185. En ciertas realizaciones, el anticuerpo no es un fragmento Fab.

## 5.1.15. Anticuerpos biespecíficos

Los anticuerpos biespecíficos son anticuerpos que tienen especificidades de unión por al menos dos epítopos diferentes. Los anticuerpos biespecíficos ejemplares pueden unirse a dos epítopos 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 (FcγR), 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')<sub>2</sub>: anticuerpos biespecíficos).

Los métodos para preparar los anticuerpos biespecíficos se conocen en la técnica. (Véase, por ejemplo, Millstein et al., Nature, 305:537-539 (1983); Trautnecker et al., EMBO J., 10:3655-3659 (1991); Suresh et al., Methods in Enzymology, 121: 210 (1986); Kostelny et al., J. Immunol, 148 (5):1547-1553 (1992); Hollinger et al., Proc Natl. Acad

Sci Estados Unidos, 90:6444-6448 (1993); Gruber et al., J. Immunol, 152:5368 (1994); patentes de Estados Unidos N° 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, documento WO 94/04690, documento WO 91/00360, documento WO 92/200373, documento WO 93/17715, documento WO 92/08802, y documento EP 03089).

En ciertas realizaciones de la invención, las composiciones y anticuerpos para su uso en los métodos no comprenden un anticuerpo murino biespecífico con especificidad por CD19 humano y la cadena épsilon de CD3 del receptor de células T tal como el anticuerpo biespecífico descrito por Daniel et al., Blood, 92:4750-4757 (1998). Cuando el anticuerpo anti-CD19 de las composiciones y para su uso en los métodos de la invención es biespecífico, el anticuerpo anti-CD19 puede estar humanizado y tiene la especificidad por CD19 humano y es capaz de unirse a una célula efectora humana tal como, por ejemplo, un monocito/macrófago y/o una célula citotóxica natural para lograr la muerte celular.

#### 5.1.16. 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 restos 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). Véase, Caron et al., 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 enlazadores heterobifuncionales como se describe en Wolff et al., Cancer Research, 53:2560-2565 (1993). Como alternativa, puede diseñarse por ingeniería un anticuerpo que tenga dos regiones Fc y por lo tanto pueda tener una mayor capacidad para lisar por complemento y ADCC. Véase, Stevenson et al., 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 técnica (por ejemplo, la publicación de patente de Estados Unidos N° 20040185045 y la publicación PCT N° WO 2004/016750, ambas de Koenig et al., que describen la alteración de la región Fc para mejorar la afinidad de unión por el Fc $\gamma$ RIIB en comparación con la afinidad de unión para el Fc $\gamma$ RIIA; véase, también, la publicación PCT N° WO 99/58572 de Armour et al., WO 99/51642 de Idusogie et al., y US 6.395.272 de Deo et al. Los métodos de modificación de la región Fc para disminuir la afinidad de unión a Fc $\gamma$ RIIB también se conocen en la técnica (por ejemplo, la publicación de patente de Estados Unidos N° 20010036459 y la publicación PCT N° WO 01/79299, ambas de Ravetch et al. Los anticuerpos modificados que tienen regiones variantes de Fc con afinidad de unión mejorada para Fc $\gamma$ RIIA y/o Fc $\gamma$ RIIB en comparación con una región Fc de tipo silvestre se describen también (por ejemplo, la publicación PCT N° WO2004/063351, de Stavenhagen et al.).

Los ensayos in vitro conocidos en la técnica 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 Sección 5.3.2.

#### 5.1.17. Regiones variantes de Fc

En este documento se describe formulaciones de proteínas que comprenden una región variante de Fc. Es decir, una región Fc de origen no natural, por ejemplo una región Fc que comprende uno o más restos de aminoácidos de origen no natural. 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 este documento 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 $\gamma$ 2 y C $\gamma$ 3 (C $\gamma$ 2 y C $\gamma$ 3) y la bisagra entre C $\gamma$ 1 (C $\gamma$ 1) y C $\gamma$ 2 (C $\gamma$ 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 restos C226 o P230 en su carboxilo-terminal, en donde la numeración está de acuerdo con el índice EU como en Kabat et al., (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 resto del anticuerpo humano IgG 1 EU como se describe en Kabat et al. 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, aunque sin limitación, proteínas que comprenden regiones variante de Fc, las cuales no son variantes de un Fc de origen natural. Nota: Los polimorfismos se observaron en varias posiciones de Fc, que incluyen aunque sin limitación 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 técnica.

En este documento se describen 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 silvestre). Los ejemplos de propiedades de unión incluyen aunque sin limitación, la especificidad de unión, la constante de equilibrio de disociación (KD), las tasas de disociación y de asociación (koff y kon 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 KD puede ser preferible a una molécula de unión con una alta KD. Sin embargo, en algunos casos el valor de kon o koff puede ser más relevante que el valor de la KD. Un especialista en la técnica 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 técnica para la determinación de las interacciones Fc-FcγR, es decir, la unión específica de una región Fc a un FcγR 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 aunque sin limitación 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*, 4ª 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, FcγRIIIA. La proteína variante de Fc puede tener una mayor unión a los receptores de Fc, FcγRIIB. 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 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 el 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 menciona en este documento 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 citólisis de la célula diana. La citólisis 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 citolíticas naturales (NK). Los ejemplos específicos de los ensayos ADCC in vitro se describen en Wisecarver et al., 1985 79:277-282; Bruggemann et al., 1987, J. Exp. Med. 166:1351-1361; Wilkinson et al., 2001, J. Immunol. Methods 25:183-191; Patel et al., 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 et al., 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, FcγRIIIA 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.

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 et al., 1996, J. Immunol. Methods, 202:163. En una realización, una proteína variante de Fc tiene una mejor actividad CDC en relación con una molécula comparable. En una realización 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 presente invención puede proporcionar formulaciones, donde la región Fc comprende un resto de aminoácido de origen no natural en una o más posiciones seleccionadas del grupo que consiste en 234, 235, 236, 239, 240, 241, 243, 244, 245, 247, 252, 254, 256, 262, 263, 264, 265, 266, 267, 269, 296, 297, 298, 299, 313, 325, 326, 327, 328, 329, 330, 331, 333 y 334 como se enumeran por el índice EU como se establece en Kabat. Opcionalmente, la región Fc puede comprender un resto de aminoácido de origen no natural en posiciones adicionales y/o alternativas conocidas para los especialistas en la técnica (véase, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos N° 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).

La presente invención puede proporcionar una formulación de proteína variante Fc, donde la región Fc comprende al menos un resto de aminoácido de origen no natural seleccionado del grupo que consiste en 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, 241R, 243W, 243L, 243Y, 243R, 243Q, 244H, 245A, 247V, 247G, 252Y, 254T, 256E, 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, 269H, 269Y, 269F, 269R, 296E, 296Q, 296N, 296S, 296T, 296L, 296I, 296H, 269G, 297S, 297D, 297E, 298H, 298I, 298T, 298F, 299I, 299L, 299A, 299S, 299V, 299H, 299F, 299E, 313F, 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, 332D, 332S, 332W, 332F, 332E, 332N, 332Q, 332T, 332H, 332Y, y 332A enumerados por el índice EU según lo establecido en Kabat. Opcionalmente, la región Fc puede comprender restos de aminoácidos de origen no natural adicionales y/o alternativos conocidos para los especialistas en la técnica (véase, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos N° 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).

La presente invención puede proporcionar una proteína variante de Fc donde la región Fc comprende al menos un resto de aminoácido de origen no natural en una o más posiciones seleccionadas del grupo que consiste en 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 resto de aminoácido de origen no natural seleccionado del grupo que consiste en 239D, 330L y 332E, enumerados por el índice EU según lo establecido en Kabat. Opcionalmente, la región Fc puede comprender un aminoácido de origen no natural adicional en una o más posiciones seleccionadas del grupo que consiste en 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 de origen no natural seleccionado del grupo que consiste en 239D, 330L y 332E, enumerados por el índice EU como se establece en Kabat y puede proporcionarse al menos un aminoácido de origen no natural en una o más posiciones seleccionadas del grupo que consiste en 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 et al., 1997, Nat. Biotech. 15:637-40; Duncan et al., 1988, Nature 332:563-564; Lund et al., 1991; J. Immunol 147:2657-2662; Lund et al., 1992, Mol. Immunol. 29:53-59; Alegre et al., 1994, 57:1537-1543 Transplantation; Hutchins et al., 1995, Proc Natl. Acad Sci Estados Unidos, 92:11980-11984; Jefferis et al., 1995, Immunol Lett, 44:111-117; Lund et al., 1995, Faseb J, 9:115-119; Jefferis et al., 1996, Immunol Lett 54:101-104; Lund et al., 1996, J Immunol 157:4963-4969; Armour et al., 1999, Eur J Immunol 29:2613-2624; Idusogie et al., 2000, J Immunol 164:4178-4184, Ramos et al., 2000, J Immunol 164:1925-1933; Xu et al., 2000, Cell Immunol 200:16-26; Idusogie et al., 2001, J Immunol 166:2571-2575, Shields et al., 2001, J Biol Chem, 276:6591-6604; Jefferis et al., 2002, Immunol Lett 82:57-65; Presta et al., 2002, Biochem Soc Trans 30:487-490; las patentes de Estados Unidos N° 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 Estados Unidos N° 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 los especialistas en la técnica.

Los métodos para generar regiones Fc de origen no natural se conocen en la técnica. Por ejemplo, pueden generarse sustituciones y/o delecciones de aminoácidos por métodos de mutagénesis, que incluyen, aunque sin limitación, 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, pág. 177-183 (1990)), y mutagénesis de cassette (Wells et al., Gene 34:315-323 (1985, )), Preferiblemente, 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, pág. 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 técnica (véase, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos N° 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 Estados Unidos N° 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 aunque sin limitación aumentar o reducir la función efectora. Pueden generarse glicoformas de ingeniería por cualquier método conocido para los especialistas en la técnica, 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 técnica, e incluyen aunque sin limitación los descritos en Umaña et al., 1999, Nat. Biotechnol 17:176-180; Davies et al., 20017 Biotechnol Bioeng 74:288-294; Shields et al., 2002, J Biol Chem 277:26733-26740; Shinkawa et al., 2003, J Biol Chem 278:3466-3473); la patente de Estados Unidos N° 6.602.684; las patentes de Estados Unidos N° 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 glucosilación GlycoMAb™ (Glycart Biotechnology AG, Zurich, Suiza). Véase, por ejemplo, los documentos WO 00061739; EA01229125; US20030115614; Okazaki et al., 2004, JMB, 336: 1239-1249.

#### 5.1.18. Glucosilación de los anticuerpos

La glucosilación de anticuerpos que se usan de acuerdo con la invención puede modificarse. Por ejemplo, puede hacerse un anticuerpo aglucosilado (es decir, el anticuerpo carece de glucosilación). La glucosilación 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 glucosilación 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 glucosilación en el marco de la región variable para eliminar así la glucosilación en dicho sitio. Tal aglucosilación puede aumentar la afinidad del anticuerpo por el antígeno. Este enfoque se describe en mayor detalle en la patente de Estados Unidos N° 5.714.350 y 6.350.861. También pueden hacerse una o más sustituciones de aminoácidos que dan como resultado la eliminación de un sitio de glucosilación en la región Fc (por ejemplo, la asparagina 297 de IgG). Además, los anticuerpos aglucosilados pueden producirse en células bacterianas que carecen de la maquinaria de glucosilación necesaria.

Adicional o alternativamente, puede hacerse un anticuerpo que tiene un tipo de glucosilación alterada, tal como un anticuerpo hipofucosilado, que tiene una cantidad reducida de restos fucosil o un anticuerpo que tiene incrementadas las estructuras GlcNAc en dos partes. Se demostró que tales patrones de glucosilación 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 hospedadora con la maquinaria de glucosilación alterada. Las células con la maquinaria de glucosilación alterada se describen en la técnica y pueden usarse como células hospedadoras en las cuales expresar los anticuerpos recombinantes de la invención para producir con ello un anticuerpo con glucosilación alterada. Véase, por ejemplo, Shields, R.L. et al., (2002) J.

Biol. Chem., 277:26733-26740; Umaña et al., (1999) Nat. Biotech. 17:176-1, así como, la patente de Estados Unidos Nº 6.946.292; la patente europea Nº EP 1.176.195; las publicaciones PCT WO 03/035835, WO 99/54342.

## 5.2. Fabricación/producción de los anticuerpos anti-cd19

- 5 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 técnica para la fabricación a gran escala de anticuerpos. Por ejemplo, esto puede lograrse por medio del uso de sistemas de expresión recombinantes tales como, aunque sin limitación, los descritos a continuación.

### 10 5.2.1. Sistemas de expresión recombinante

La expresión recombinante de un anticuerpo para su uso en la invención o variante 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 técnica. Véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos Nº 6.331.415. Así, se describen en este documento 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 los especialistas en la técnica 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 (véase, por ejemplo, la publicación internacional Nº WO 86/05807 y WO 89/01036, y la patente de Estados Unidos Nº 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.

Como alternativa, los anticuerpos anti-CD19 de las composiciones y para su uso en los métodos de la invención pueden hacerse 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 Estados Unidos Nº 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 (véase, en las patentes de Estados Unidos Nº 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 (véase, la patente de Estados Unidos Nº 6.091.001). La línea de células hospedadoras 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 hospedadora 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 hospedadora por técnicas convencionales, las células transfectadas luego se cultivan mediante técnicas convencionales para producir un anticuerpo. Así, la invención incluye células hospedadora 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 hospedadora para la expresión de la molécula de inmunoglobulina completa, como se detalla a continuación.

Una variedad de sistemas hospedadores 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 (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos Nº 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 et al., Gene, 45:101 (1986); y Cockett et al., Bio/Technology, 08:02 (1990)). Además, puede elegirse una cepa de células hospedadora 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 glucosilación) y el procesamiento (por ejemplo, la escisión) de los productos de proteína pueden ser importantes para la función de la proteína. Las diferentes células hospedadoras tienen mecanismos característicos y específicos para el procesamiento post-traducciona y la modificación de las proteínas y los productos génicos. Pueden elegirse líneas celulares adecuadas o sistemas hospedadores para garantizar la correcta modificación y el procesamiento del anticuerpo o porciones expresadas de éste. Para este fin, pueden usarse células hospedadora eucarióticas que poseen la maquinaria celular para el procesamiento apropiado de la transcripción primaria, la glucosilación, y la

fosforilación del producto del gen. Tales células hospedadoras de mamífero incluyen, aunque sin limitación CHO, VERY, BHK, Hela, COS, MDCK, 293, 3T3, W138, BT483, Hs578T, HTB2, BT20 y T47D, NS0 (una línea celular de mieloma murino que no produce endógenamente ninguna cadena de inmunoglobulina funcional), y las células CRL7030 y HsS78Bst.

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

En los sistemas bacterianos, varios 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, aunque sin limitación, el vector de expresión pUR278 de *E. coli* (Ruther et al., 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., 264: 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 hospedadoras de mamífero, pueden usarse varios 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, véase, 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 de traducción 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 (véase, por ejemplo, Bittner et al., Methods in Enzymol, 153:51-544 (1987)).

Para la producción a largo plazo, de alto rendimiento, de proteínas recombinantes se prefiere expresión estable. Por ejemplo, pueden generarse líneas celulares que expresan de manera estable la molécula de anticuerpo. En lugar de sistemas de expresión transitoria que usan vectores de replicación que contienen orígenes virales de replicación, las células hospedadoras pueden transformarse con ADN controlado por elementos de control de la expresión (por ejemplo, promotor, potenciador, terminadores de la transcripción, sitios de poliadenilación, etc.), y un gen marcador de selección. Después de la introducción del ADN foráneo, las células pueden dejarse cultivar durante 1-2 días en un medio enriquecido, y luego se cambian a un medio selectivo. El marcador de selección en el plásmido recombinante confiere resistencia a la selección y permite que las células integren de forma estable el plásmido en sus cromosomas y crezcan para formar focos que a su vez pueden clonarse y expandirse en líneas celulares. Los plásmidos que codifican el anticuerpo anti-CD19 pueden usarse para introducir el gen/ADNc en cualquier línea celular adecuada para la producción en cultivo. Como alternativa, pueden usarse plásmidos llamados "vectores de dirección" para introducir elementos de control de la expresión (por ejemplo, promotores, potenciadores, etc.) en localizaciones cromosómicas apropiadas en la célula hospedadora para "activar" el gen endógeno para anticuerpos anti-CD19.

Pueden usarse varios sistemas de selección que incluyen, aunque sin limitación, los genes de la timidina quinasa del virus de herpes simple (Wigler et al., Cell, 11:223 (1977)), la hipoxantinaganina fosforribosiltransferasa (Szybalski y Szybalski, Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos 48:202 (1992)), y la adenina fosforribosiltransferasa (Lowy et al., 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 et al., *Proct. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos*, 77:357 (1980); O'Hare et al., *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 et al., *Gene*, 30:147 (1984)). Los métodos comúnmente conocidos en la técnica 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 et al., (Eds, ), *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Nueva York (1993); Kriegler, *Gene Transfer and Expression, A Laborator y Manual*, Stockton Press, Nueva York (1990), y en los capítulos 12 y 13, Dracopoli et al., (Eds, ), *Current Protocols en Human Genetics*, John Wiley & Sons, Nueva York (1994); Colberre-Garapin et al., 1981, *J. Mol. Biol.* 150:1.

Los niveles de expresión de una molécula de anticuerpo pueden aumentarse mediante la amplificación del vector (para una revisión, véase, 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 hospedadora 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 et al., *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 los especialistas en la técnica 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 hospedadora 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 técnica 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 talla), la centrifugación, la solubilidad diferencial, o por cualquier otra técnica convencional para la purificación de proteínas. Además, los anticuerpos de la presente invención o sus fragmentos pueden fusionarse con secuencias de polipéptidos heterólogos descritos en este documento o de otro tipo conocido en la técnica para facilitar la purificación.

#### 5.2.2. 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 hospedadoras o fragmentos lisados, se eliminan, por ejemplo, por centrifugación o ultrafiltración. Carter et al., *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 en el mercado, 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 y1, y2, o y4 (Lindmark et al., *J. Immunol. Methods*, 62:1-13 (1983)). La proteína G se recomienda para todos los isotipos de ratón y para y3 humana (Guss et al., *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 cromatofoco, 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).

### 5.3. Anticuerpos anti-CD19 terapéuticos

El anticuerpo anti-CD19 usado en las composiciones y para su uso en los métodos de la invención es preferiblemente un anticuerpo humanizado que media preferiblemente la ADCC humana. En ciertas realizaciones los anticuerpos anti-CD19 pueden ser anticuerpos quiméricos. En realizaciones preferidas, el anticuerpo anti-CD19 es un anticuerpo anti-CD19 monoclonal, humanizado o quimérico. El anticuerpo anti-CD19 usado en las composiciones y para su uso en los métodos de la invención es preferiblemente un anticuerpo humanizado del isotipo humano IgG1 o IgG3. El anticuerpo anti-CD19 usado en las composiciones y para su uso en los métodos de la invención puede ser un anticuerpo humano o anticuerpo humanizado del isotipo humano IgG2 o IgG4 que preferiblemente media la ADCC.

Aunque dichos anticuerpos pueden generarse usando las técnicas descritas anteriormente, los anticuerpos murinos HB12A y HB12B como se describen en este documento u otros anticuerpos anti-CD19 disponibles en el mercado pueden quimerizarse o humanizarse.

Por ejemplo, los anticuerpos anti-CD19 conocidos que pueden usarse incluyen, aunque sin limitación, HD37 (IgG1) (Dako, Carpinteria, CA), BU12 (G.D. Johnson, Universidad de Birmingham, Birmingham, Reino Unido), 4G7 (IgG1) (Becton-Dickinson, Heidelberg, Alemania), J4.119 (Beckman Coulter, Krefeld, Alemania), B43 (PharMingen, San Diego, CA), SJ25C1 (BD PharMingen, San Diego, CA), FMC63 (IgG2a) (Chemicon Int'l., Temecula, CA) (Nicholson et al., Mol. Immunol., 34:1157-1165 (1997); Pietersz et al., Cancer Immunol. Immunotherapy, 41:53-60 (1995); y Zola et al., Immunol. Cell Biol., 69:411-422 (1991)), B4 (IgG1) (Beckman Coulter, Miami, FL; Nadler et al., J. Immunol. 131:244-250 (1983)), y/o HD237 (IgG2b) (Fourth International Workshop on Human Leukocyte Differentiation Antigens, Viena, Austria, 1989; y Pezzutto et al., J. Immunol. 138 (9):2793-2799 (1987)).

En ciertas realizaciones, el anticuerpo anti-CD19 de la invención comprende la cadena pesada de HB12a que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 2 (Fig. 5A). En otras realizaciones, el anticuerpo anti-CD19 de la invención comprende la cadena pesada de HB12b que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 4 (Fig. 5B).

En ciertas realizaciones, el anticuerpo anti-CD19 de la invención comprende la cadena ligera de HB12a que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 16 (Fig. 6A). En otras realizaciones, el anticuerpo anti-CD19 de la invención comprende la cadena ligera de HB12b que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 18 (Fig. 6B).

En ciertas realizaciones, el anticuerpo es una variante de isotipo cambiado de un anticuerpo conocido (por ejemplo, a un isotipo humano IgG1 o IgG3) tal como los descritos anteriormente (por ejemplo, HB12a o HB12b).

Los anticuerpos anti-CD19 usados en las composiciones y para su uso en los métodos de la invención pueden ser anticuerpos desnudos, inmunoconjugados o proteínas de fusión. Preferiblemente, los anticuerpos anti-CD19 descritos anteriormente para su uso en las composiciones y para su uso en los métodos de la invención son capaces de reducir o eliminar las células B en un humano tratado con el mismo. La reducción de las células B puede ser sobre las células B circulantes, o en tejidos particulares, tales como, aunque sin limitación, la médula ósea, el bazo, los tejidos linfoides asociados al intestino, y/o los ganglios linfáticos. Esa reducción puede conseguirse a través de varios mecanismos, tales como la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo (ADCC) 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 "reducción" de las células B se entiende una reducción en la circulación de las células B y la células B en tejido(s) específico(s) de al menos aproximadamente el 25%, 40%, 50%, 65%, 75%, 80%, 85 %, 90%, 95% o más como se describe en la Sección 5.4.3. En realizaciones particulares se reducen virtualmente todas las células B detectables de la circulación y/o tejido(s) particular(es). Por "reducción" de inmunoglobulina (Ig) circulante se entiende una reducción en al menos aproximadamente el 25%, 40%, 50%, 65%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o más como se describe en la Sección 5.4.3. Como se describe en este documento, puede reducirse virtualmente toda la Ig detectable de la circulación.

## 5.3.1. Selección de anticuerpos por unión a 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 convencional o ensayos convencionales de citometría de flujo. En un ensayo de unión directa, un anticuerpo candidato se prueba por su unión al antígeno CD19 humano. En ciertas realizaciones, 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 a 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, aunque sin limitación, 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 unión competitiva, 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.

Para facilitar la formación de complejo anticuerpo-antígeno y su detección, el ensayo de unión puede realizarse 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, aunque sin limitación, 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 realización, la unión puede ser indirecta, es decir, a través de un anticuerpo unido. En otra realización, 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 mediar por un anticuerpo disponible en el mercado, tal como el anti-GST (Santa Cruz Biotechnology).

Por ejemplo, puede realizarse dicho ensayo de afinidad de unión usando el antígeno CD19 humano que está inmovilizado en 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).

Finalmente, el marcaje que queda sobre la superficie sólida puede detectarse por cualquier método de detección conocido en la técnica. 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 convencionales 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 los especialistas en la técnica (véase, Ausubel et al., Supra). Los anticuerpos de prueba se ensayaron para determinar su capacidad para unirse al antígeno CD19 humano.

Como alternativa, la reacción de unión puede realizarse 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 biblioteca de fagos puede seleccionarse al pasar fago a partir de una biblioteca 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 es 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 bibliotecas de anticuerpos que se cultivan bajo condiciones que permiten la expresión de los miembros de la biblioteca en la placa de microtitulación. Se cosechan los miembros de las bibliotecas 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 et al., 1992, *BioTechniques*, 13:422-427; publicación PCT N° 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.

### 5.3.2. Selección de anticuerpos por función efectora de ADCC humana

Se prefieren anticuerpos de la clase IgG humana para su uso en la invención porque tienen características funcionales tales como una larga vida media en el suero y la capacidad de mediar diversas funciones efectoras se usan en ciertas realizaciones 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 seres 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 citolíticas naturales o los macrófagos activados. Pueden enlazarse varios componentes del complemento. En cuanto a la unión, se sugiere que varios restos 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 de la invención 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 resto de cisteína (s) en la región Fc, lo que permite la formación de un enlace disulfuro intercatenario 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 et al., *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 et al., *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 et al., *Anti-Cancer Drug Design*, (3) 219-230 (1989)).

Se conocen en la técnica otros métodos de ingeniería de regiones Fc de anticuerpos con el fin de alterar las funciones efectoras (por ejemplo, la publicación de patente de Estados Unidos N° 20040185045 y la publicación PCT N° WO 2004/016750, ambas de Koenig et al., las cuales describen la alteración de la región Fc para mejorar la afinidad de unión de Fc al Fc $\gamma$ R1IB en comparación con la afinidad de unión para el Fc $\gamma$ R1IA; ver también la publicación PCT N° WO 99/58572 de Armour et al., WO 99/51642 de Idusogie et al., y US 6, 395, 272 de Deo et al. También se conocen en la técnica métodos para modificar la región Fc para disminuir la afinidad de unión al Fc $\gamma$ R1IB (por ejemplo, la publicación de patente de Estados Unidos N° 20010036459 y la publicación PCT N° WO 01/79299, ambas de Ravetch et al.). También se describieron anticuerpos modificados que tienen regiones Fc variantes con una mayor afinidad de unión por Fc $\gamma$ R1IIIA y/o Fc $\gamma$ R1IIA en comparación con una región Fc de tipo silvestre (por ejemplo, la publicación PCT N° WO2004/063351, de Stavenhagen et al.).

Se han encontrado al menos cuatro tipos diferentes de Fc $\gamma$ R que se denominan respectivamente, Fc $\gamma$ R1 (CD64), Fc $\gamma$ R2 (CD32), Fc $\gamma$ R3 (CD16), y Fc $\gamma$ R4. En humanos, los Fc $\gamma$ R2 y Fc $\gamma$ R3 se clasifican en Fc $\gamma$ R2IA y Fc $\gamma$ R2IB, y Fc $\gamma$ R3IA y Fc $\gamma$ R3IB, respectivamente. El Fc $\gamma$ R es una proteína de membrana que pertenece a la superfamilia de las inmunoglobulinas, Fc $\gamma$ R2, Fc $\gamma$ R3, y Fc $\gamma$ R4 tienen una cadena a que tiene una región extracelular que contiene dos dominios del tipo inmunoglobulina, el Fc $\gamma$ R1 tiene una cadena a con una región extracelular que contiene tres dominios de tipo inmunoglobulina, como un componente constitutivo, y la cadena a está implicada en la actividad de unión de la IgG. Además, Fc $\gamma$ R1 y Fc $\gamma$ R3 tienen una cadena y o C como un componente constitutivo la cual tiene una función de transducción de señales en asociación con la cadena a (Annu. Rev. Immunol., 18, 709 (2000), Annu. Rev. Immunol., 19, 275 (2001)). El Fc $\gamma$ R4 se describió por Bruhns et al., 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 Estados Unidos N° 5.500.362 o 5.821.337. Las células efectoras útiles para tales ensayos incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMNC) y células citolíticas naturales (NK). Por ejemplo, puede ensayarse 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 ensayarse para la activación del complemento. En cualquier caso, la citólisis de las células diana se detecta por la liberación del marcador desde las células lisadas. 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 después terapéuticamente en ese paciente en particular. Alternativa o adicionalmente, 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 et al., 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, y opcionalmente la actividad apoptótica de un anticuerpo son bien conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos N° 6.194.551 (véase, por ejemplo, Chaouchi et al., J. Immunol., 154(7): 3096-104 (1995); Pedersen et al., Blood, 99(4): 1314-1318 (2002); Alberts et al., Molecular Biology of the Cell; Steensma et al., Methods Mol Med., 85: 323-32, (2003)). Los anticuerpos de la presente invención pueden ser capaces o pueden modificarse para tener la capacidad de inducir la ADCC y/o la CDC y/o una respuesta apoptótica. Preferiblemente, dichos ensayos para determinar la función ADCC se practican usando células efectoras humanas para evaluar la función ADCC humana.

### 5.3.3. Inmunoconjugados y proteínas de fusión

De acuerdo con ciertos aspectos de la invención, los agentes terapéuticos o toxinas pueden conjugarse a anticuerpos anti-CD19 quimerizados o humanizados para su uso en las composiciones y para su uso en los métodos de la invención. En ciertas realizaciones, estos conjugados pueden generarse como proteínas de fusión (véase la Sección 5.1.8). Los ejemplos de agentes terapéuticos y toxinas incluyen, aunque sin limitación, los miembros de la familia de las moléculas enediina, tales como caliceamicina y esperamicina. Las toxinas químicas también pueden tomarse del grupo que consiste en duocarmicina (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos N° 5.703.080, la patente de Estados Unidos N° 4.923.990), metotrexato, doxorubicina, melfalán, clorambucilo, ARA-C, vindesina, mitomicina C, cisplatino, etopósido, bleomicina y 5-fluorouracilo. Los ejemplos de agentes quimioterapéuticos también incluyen 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 (véase, la patente de Estados Unidos N° 4.675.187), melfalán y otras mostazas relacionadas con nitrógeno.

Por ejemplo, puede usarse "CVB" (1,5 g/m<sup>2</sup> de ciclofosfamida, 200-400 mg/m<sup>2</sup> de etopósido, y 150-200 mg/m<sup>2</sup> de carmustina) en las terapias de combinación de la invención. CVB es un régimen usado para tratar linfoma no Hodgkin (Patti et al., Eur. J. Haematol., 51:18 (1993)). Otros regímenes quimioterapéuticos de combinación adecuados son bien conocidos para los especialistas en la técnica. Véase, por ejemplo, Freedman et al., "Non-Hodgkin's Lymphomas," en Cancer Medicine, Volumen 2, 3ª Edición, Holland et al. (eds.), pág. 2028-2068 (Lea & Febiger 1993). Como ilustración, regímenes quimioterapéuticos de primera generación para el tratamiento de



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 de tercera generación adecuado es MACOP-B (metotrexato, doxorubicina, ciclofosfamida, vincristina, prednisona, bleomicina y leucovorina). Fármacos útiles adicionales incluyen butirato de fenilo y brostatina-1.

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*, véase, por ejemplo, Pastan et al., *Cell*, 47:641 (1986) y Goldenberg et al., *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 *Phytolacca americana* (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, véase, 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, 19na Ed. (Mack Publishing Co. 1995), y en Goodman y Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics 7ma Ed. (MacMillan Publishing Co.1985). Los especialistas en la técnica conocen otras toxinas adecuadas y/o agentes quimioterapéuticos.

El 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 peptídico, véase, WO81/01145) en un fármaco anti-cáncer activo. Véase, por ejemplo, WO 88/07378 y la patente de Estados Unidos Nº 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 en los métodos descritos en este documento incluyen, aunque sin limitación, 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 serrata, la termolisina, la subtilisina, las carboxipeptidasas y las catepsinas (tales como la catepsinas B y L), que son útiles para convertir profármacos que contienen péptido en fármacos libres; las Dalanilcarboxipeptidasas, útiles para convertir profármacos que contienen sustituyentes de D-aminoácidos; las enzimas que escinden carbohidratos tales como la  $\beta$ -galactosidasa y la neuraminidasa útiles para convertir profármacos glucosilados en fármacos libres; la  $\beta$ -lactamasa útil para la conversión de fármacos derivatizados con  $\alpha$ -lactamas en fármacos libres, y la penicilina amidasas, 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 técnica como "abzimas", pueden usarse también para convertir los profármacos en fármacos activos libres (véase, por ejemplo, Massey, *Nature* 328:457-458 (1987)). Los conjugados anticuerpo-abzima pueden prepararse como se describe en este documento para la entrega de la abzima como se desee a las partes de un ser humano afectadas por una neoplasia de células B.

Las enzimas descritas en este documento pueden unirse covalentemente al anticuerpo por técnicas bien conocidas en la técnica tales como el uso de los reactivos heterobifuncionales entrelazantes discutidos anteriormente. Como alternativa, 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 técnica (véase, por ejemplo, Neuberger et al., *Nature*, 312:604-608 (1984)).

Las modificaciones covalentes de un anticuerpo anti-CD19 se incluyen dentro del alcance de esta descripción. 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 restos de aminoácidos diana con un agente orgánico de derivatización que es capaz de reaccionar con cadenas laterales seleccionadas o con los restos N-o C- terminales.

Los restos cisteinilo reaccionan comúnmente con a-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 restos cisteinilo también se derivatizan por reacción con bromotrifluoroacetona, ácido a-bromo-p- (5-imidozilo) propiónico, fosfato de cloroacetilo, N-alquilmaleimidas,

disulfuro de 3-nitro-2-piridilo, 2-metil piridil disulfuro, p-cloromercuribenzoato, 2-cloromercuri-4-nitrofenol, o cloro-7-nitrobenzoico-2-oxa-1,3-diazol.

5 Los restos 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.

10 Los restos 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 restos lisinilo. Otros reactivos adecuados para derivatizar los restos que contienen  $\alpha$ -amino y/o restos que contienen  $\varepsilon$ -amino incluyen imidoésteres tales como el picolinimato de metilo, el fosfato de piridoxal, el piridoxal, el cloroborohidruro, el ácido trinitrobenzenosulfónico, la 0-metilisourea, la 2, 4 pentanodiona, y la reacción con glixilato catalizada por la transaminasa.

15 Los restos arginilo se modifican por la reacción con uno o varios reactivos convencionales, entre ellos fenilgloxal, 2, 3butanodiona, 1, 2-ciclohexanodiona, y ninhidrina. La derivatización de los restos 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  $\varepsilon$ -amino de la lisina así como el grupo épsilon-amino de la arginina.

20 La modificación específica de los restos tirosilo puede hacerse, con interés particular en la introducción de marcadores espectrales en los restos 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 restos tirosilo se yodan por medio del uso de  $^{125}\text{I}$  o  $^{131}\text{I}$  para preparar proteínas marcadas para su uso en radioinmunoensayos.

25 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 1etil-3-(4-azonia-4,4-dimetilpentil)carbodiimida. Además, los restos aspartilo y glutamilo se convierten a restos asparaginilo y glutaminilo por una reacción con iones amonio.

30 Los restos glutaminilo y asparaginilo están frecuentemente desamidados a los correspondientes restos aspartilo y glutamilo, respectivamente. Estos restos se desamidan en condiciones neutras o básicas. La forma desamida de estos restos cae dentro del alcance de esta invención.

35 Otras modificaciones incluyen la hidroxilación de prolina y lisina, la fosforilación de los grupos hidroxilo de los restos serilo o treonilo, la metilación de los grupos  $\alpha$ -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, pág. 79-86 (1983)), la acetilación de la amina N-terminal, y la amidación de cualquier grupo carboxilo C-terminal.

40 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 hospedadora con capacidades para N- u O- glucosilaciones. 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) restos aromáticos tales como los de la fenilalanina, tirosina, triptófano, o (f) el grupo amida de la glutamina. Estos métodos se describen en el documento WO87/05330 publicado el 11 de septiembre de 1987, y en Aplin y Wriston, *CRC Crit, Rev. Biochem.*, pág. 259-306 (1981).

#### 5.4. Formulaciones farmacéuticas, administración y dosificación

50 Las formulaciones farmacéuticas de la invención contienen como ingrediente activo anticuerpos anti-CD19 humanizados o quiméricos. Las formulaciones contienen el anticuerpo desnudo, inmuconjugado, o proteína de fusión en una cantidad eficaz para producir la respuesta deseada en una unidad de peso o volumen adecuada 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, aunque sin limitación, reducción de células B circulantes, reducción de células B de tejido, regresión de un neoplasia de células B, o disminución de síntomas de la enfermedad. Un especialista en la técnica conocerá otros ensayos y los podrá emplear para medir el nivel de la respuesta.

##### 60 5.4.1. Formulaciones farmacéuticas

Una composición de anticuerpo anti-CD19 puede formularse con un vehículo farmacéuticamente aceptable. El término "farmacéuticamente aceptable" significa uno o más técnicas 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 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, aunque sin limitación, aquellas preparadas a partir de los ácidos siguientes: clorhídrico, bromhídrico, sulfúrico, 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 interacción que pueda perjudicar sustancialmente la eficacia farmacéutica deseada.

Como se describe en este documento, las composiciones de los anticuerpos anti-CD19 se pueden preparar para el almacenamiento al mezclar el anticuerpo o el inmunocombinado que tiene el grado de pureza deseado con vehículos, excipientes o estabilizantes opcionales fisiológicamente aceptables (Remington's Pharmaceutical Sciences, 16va edición, Editor Osol, A. (1999)), en la forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. Los vehículos, excipientes, o estabilizantes 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 octadecildimetilbencilamonio; 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 restos); 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; contracciones 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 técnica 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 realizaciones, la formulación del vehículo adecuado para diversas vías de administración puede ser igual o similar a aquella que se describió para RITUXAN™. Véase, Physicians' Desk Reference (Medical Economics Company, Inc., Montvale, Nueva Jersey, 2005), pág. 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. Los especialistas en la técnica son 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. Además, 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 para su uso en los 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 16ª edición, Editor Osol, A. (1980).

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

Pueden prepararse preparaciones de liberación sostenida. 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. Los ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli (2-hidroxietilmetacrilato), o poli(alcohol vinílico)), polilactidas (patente de Estados Unidos N° 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutámico y  $\gamma$ -etil-L-glutamato, acetato de etilvinilo no degradable, copolímeros degradables de ácido láctico-ácido glicólico tales como el LUPRON DEPOT™ (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 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. Pueden idearse estrategias racionales para la estabilización en dependencia del mecanismo involucrado. Por ejemplo, si se descubre que el mecanismo de agregación es la formación intermolecular del enlace S-S a través del intercambio de tio-disulfuro, la estabilización puede lograrse mediante la modificación de los restos 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 realizaciones, los vehículos farmacéuticamente 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 este documento pueden formularse también como inmunoliposomas. Un "liposoma" es una vesícula pequeña compuesta de diversos tipos de lípidos, fosfolípidos y/o agente tensioactivo que es útil para la entrega de un fármaco (tal como los anticuerpos anti-CD19 descritos en este documento) a un ser 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 técnica, tales como los descritos por Epstein et al., Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos, 82:3688 (1985); Hwang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos, 77:4030 (1980), y las patentes de Estados Unidos N° 4.485.045 y 4.544.545. Los liposomas con el tiempo de circulación mejorado se describen en la patente de Estados Unidos N° 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 et al., J. Biol. Chem., 257:286-288 (1982) a través de una reacción de intercambio de disulfuro. Un agente terapéutico se puede contener también dentro del liposoma. Véase, Gabizon et al., J. National Cancer Inst., (19) 1484 (1989).

Algunas de las formulaciones farmacéuticas incluyen, aunque sin limitación:

- (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 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, clorhidrato de L-histidina monohidratado, L-histidina y polisorbato 20. Por ejemplo, cada vial de uso único puede contener 150 mg de anticuerpo anti-CD19, 123,2 mg de sacarosa, 6,8 mg de clorhidrato 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 con  $\alpha$ -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  $\alpha$ , $\alpha$ -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 jeringa 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 jeringa se puede formular para suministrar 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, clorhidrato 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 clorhidrato 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 clorhidrato 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 puede 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.

La composición farmacéutica de la invención puede ser estable a 4°C. La composición farmacéutica de la invención puede ser estable a temperatura ambiente.

#### 5.4.2. Vida media del anticuerpo

En ciertas realizaciones, la vida media de un anticuerpo anti-CD19 de las composiciones y para su uso en los métodos de la invención es 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 técnica. 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 Estados Unidos N° 6.277.375, y las publicaciones internacionales N° 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 restos 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 los especialistas en la técnica, por ejemplo, por los inmunoensayos que se describen en este documento.

Además, los anticuerpos de las composiciones y para su uso en los 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 técnica, véase, por ejemplo, las publicaciones internacionales N° WO 93/15199, WO 93/15200, y WO 01/77137; y la patente europea N° EP 413.622.

#### 5.4.3. Administración y dosificación

La administración de las composiciones de la invención a un paciente humano puede ser por cualquier vía, que incluyen, aunque sin limitación, 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 técnica, de factores tales como la especie, edad, sexo y condición general del sujeto, 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.

En ciertas realizaciones, la dosis de una composición que comprende el anticuerpo anti-CD19 se mide 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/m<sup>2</sup> 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 convencionales en la técnica.

Los especialistas en la técnica apreciarán que las dosificaciones se pueden seleccionar en base a varios factores que incluyen la edad, el sexo, la especie y la afección del sujeto (por ejemplo, el estadio de neoplasia de células B), el grado deseado de reducción 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 los especialistas en la técnica. 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 algodona o mono). Los modelos y métodos para la evaluación de los efectos de los anticuerpos se conocen en la técnica (Wooldridge et al., Blood, 89 (8) : 2994-2998 (1997)). Para neoplasias de células B, los regímenes terapéuticos convencionales en la técnica para la terapia con anticuerpo se pueden usar con composiciones y anticuerpos para su uso en los métodos de la invención.

Los ejemplos de regímenes de dosificación que se pueden usar incluyen, aunque sin limitación, diariamente, tres veces por semana (intermitente), semanalmente, o cada 14 días. En determinadas realizaciones, la dosificación de regímenes incluye, aunque sin limitación, dosificación mensual o dosificación cada 6-8 semanas.

Los especialistas en la técnica apreciarán que las dosificaciones 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 descritos en este documento se unen a las células B y pueden producir deplación más eficaz (es decir, en dosis baja) de células B (como se describe en este documento). 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/m<sup>2</sup> 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 o 0,01 mg/m<sup>2</sup>. La dosis puede ser entre aproximadamente 0,0005 a aproximadamente 200 mg/m<sup>2</sup>, entre aproximadamente 0,001 y 150 mg/m<sup>2</sup>, entre aproximadamente 0,075 y 125 mg/m<sup>2</sup>, entre aproximadamente 0,375 y 100 mg/m<sup>2</sup>, entre aproximadamente 2,5 y 75 mg/m<sup>2</sup>, entre aproximadamente 10 y 75 mg/m<sup>2</sup>, y entre aproximadamente 20 y 50 mg/m<sup>2</sup>. 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/m<sup>2</sup>. 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, se prefieren las dosis inferiores descritas anteriormente.

Cuando se usan anticuerpos anti-CD 19 quiméricos, la dosis o cantidad del anticuerpo quimérico puede ser mayor de aproximadamente 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13,14, 15, o 16 mg/kg de peso corporal del paciente. Cuado se usan anticuerpos anti-CD19 quiméricos, la dosis o cantidad del anticuerpo quimérico puede ser menor de aproximadamente 1, 0,9, 0,8, 0,7, 0,6, 0,5, 0,4, 0,3, 0,2, or 0,1 mg/kg de peso corporal del paciente.

En algunas realizaciones de esta invención, los anticuerpos y/o composiciones de esta invención pueden administrarse a una dosis inferior a aproximadamente 375 mg/m<sup>2</sup>; a una dosis inferior a aproximadamente 37,5 mg/m<sup>2</sup>; a una dosis inferior a aproximadamente 0,375 mg/m<sup>2</sup>; y/o a una dosis entre aproximadamente 0,075 mg/m<sup>2</sup> y aproximadamente 125 mg/m<sup>2</sup>. Los regímenes de dosificación de la invención pueden comprender dosis bajas, administradas a intervalos repetidos. Por ejemplo, las composiciones de la invención pueden administrarse a una dosis inferior que aproximadamente 375 mg/m<sup>2</sup> a 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 dosificación especificada specified puede producir la reducción de células B en el ser humano tratado usando las composiciones y anticuerpos para su uso en los métodos de la invención durante un periodo de al menos aproximadamente 1, 2, 3, 5, 7, 10, 14, 20, 30, 45, 60, 75, 90, 120, 150 o 180 días o más. En ciertas realizaciones, se reducen las células pre-B (que no expresan inmunoglobulina superficial). En ciertas realizaciones, se reducen las células B maduras (que expresan inmunoglobulina superficial). En otras realizaciones, todos los tipos malignos de células B pueden mostrar reducción. Cualquiera de estos tipos de células B puede usarse para medir la reducción de células B. La reducción de células B puede medirse en fluidos corporales tales como suero de la sangre, o en tejidos tales como médula ósea. Las células B pueden reducirse en al menos un 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, o 100% en comparación con los niveles de células B en el paciente que se está tratando antes del uso de las composiciones y anticuerpos para su uso en los métodos de la invención. Las células B pueden reducirse en al menos un 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, o 100% en comparación con niveles normales típicos de células B para seres humanos. Los niveles normales típicos de células B para seres humanos se determinan usando pacientes comparables al paciente que se está tratando con respecto a la edad, sexo, peso, y otros factores.

Una dosificación de aproximadamente 125 mg/m<sup>2</sup> o menos de un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno puede dar lugar a la reducción de las células B durante un período de al menos aproximadamente 7, 14, 21, 30, 45, 60, 90, 120, 150, o 200 días. Una dosificación de aproximadamente 37,5 mg/m<sup>2</sup> o menos puede reducir las células B durante un período de al menos aproximadamente 7, 14, 21, 30, 45, 60, 90, 120, 150, o 200 días. Una dosificación de aproximadamente 0,375 mg/m<sup>2</sup> o menos puede dar lugar a la reducción de las células B durante al menos aproximadamente 7, 14, 21, 30, 45 o 60 días. Una dosis de aproximadamente 0,075 mg/m<sup>2</sup> o menos puede dar lugar a la reducción 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/m<sup>2</sup>, 0,005 mg/m<sup>2</sup> o incluso 0,001 mg/m<sup>2</sup> o menos puede dar lugar a la reducción 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 reducción 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 reducción 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/m<sup>2</sup> o menos dan lugar a una reducción 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/m<sup>2</sup> o 75 mg/m<sup>2</sup> o menos puede dar lugar a la reducción 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 o 180 días. Una dosis de aproximadamente 50, 37,5 o 10 mg/m<sup>2</sup> puede dar lugar a la reducción 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 o 180 días. Una dosis de aproximadamente 0,375 o 0,1 mg/m<sup>2</sup> puede dar lugar a la reducción de al menos aproximadamente un 50%, 75%, 85% o 90% de las células B durante al menos aproximadamente 7, 14, 21, 30, 60, 75 o 90 días. Una dosis de aproximadamente 0,075, 0,01, 0,001, o 0,0005 mg/m<sup>2</sup> puede dar lugar a la reducción de al menos aproximadamente un 50%, 75%, 85% o 90% de las células B durante al menos aproximadamente 7, 14, 21, 30 o 60 días.

La dosis se puede aumentar o reducir para mantener una dosis constante en la sangre o en un tejido, tal como, aunque sin limitación, 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 dosificación se puede ajustar y/o la velocidad de infusión se puede reducir en base a la respuesta inmunogénica del paciente a las composiciones y anticuerpos para su uso en los métodos 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 neoplasia 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 según se han generado datos adicionales).

De acuerdo con otro aspecto de la invención, 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.

#### 5.4.4. Ensayo 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 convencionales 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 realización, la dosis es una dosis eficaz para alcanzar al menos un 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, o 99% de reducción 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 técnica, por ejemplo, según se proporcionó por Freireich et al., 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.



### 5.5. Diagnóstico del paciente, estadificación y regímenes terapéuticos

El régimen de tratamiento y dosis usados con las composiciones y anticuerpos para su uso en los métodos de la invención pueden elegirse en base a varios factores incluyendo, aunque sin limitación, el estadio de la enfermedad o trastorno de células B que se trata. Los regímenes de tratamiento apropiados se pueden determinar por los especialistas en la técnica 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 convencionales en la técnica 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 de las composiciones y para su uso en los métodos de la invención pueden usarse para tratar las enfermedades de células B, incluyendo los neoplasias de células B. El término "neoplasia de células B" incluye cualquier tumor maligno que se deriva de una célula del linaje de células B. Los neoplasias de células B ejemplares incluyen, aunque sin limitación: 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; gammapatía 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).

Los inventores han demostrado que los anticuerpos y composiciones de la invención pueden reducir células B maduras. La invención se puede emplear para tratar neoplasias 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, aunque sin limitación, leucemia linfoblástica aguda.

La invención puede practicarse para tratar tumores extraganglionares.

#### 5.5.1. Diagnóstico y estadificación de neoplasias 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 estadificación de un cáncer se puede determinar por las observaciones clínicas y métodos de prueba que son bien conocidos por los especialistas en la técnica. Las estadificaciones 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, aunque sin limitación, 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 2microglobulina ( $\beta$ 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, CT).

El estadio de un neoplasia 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 de los estadios de enfermedades y trastornos de células B no son limitantes. Otras características conocidas en la técnica 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.

#### 5.5.2. Criterios clínicos para el diagnóstico de neoplasias de células B

Los criterios de diagnóstico para diferentes neoplasias de células B se conocen en la técnica. 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 neoplasias de células B (véase, por ejemplo, Shaffer et al., Nature 2:920-932 (2002)). Los métodos ejemplares para el diagnóstico clínico de neoplasias de células B en particular se proporcionan a continuación. Otros métodos adecuados serán evidentes para los especialistas en la técnica.

##### 5.5.2.1. 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. (Véase, S. Freedman, et al., Follicular Lymphoma, pág. 367-388, en Non-Hodgkin's Lymphomas, P. Mauch et al., ediciones., Lippincott Williams & Wilkins, Filadelfia, Pensilvania (2004); T. Lister et al., Follicular Lymphoma, pág. 309-324, en Malignant Lymphoma, B. Hancock et al., ediciones, Oxford University Press, Nueva York, N.Y. (2000)).

La mayoría de los NHL foliculares se caracterizan 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) (véase, por ejemplo, Shaffer et al., 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. (Véase, S. Freedman, et al., Follicular Lymphoma, pág. 367-388, en Non-Hodgkin's Lymphomas, P. Mauch et al., ediciones., Lippincott

Williams & Wilkins, Filadelfia, Pensilvania (2004); T. Lister et al., Follicular Lymphoma, pág. 309-324, en Malignant Lymphoma, B. Hancock et al., 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. (Véase, S. Freedman, et al., Follicular Lymphoma, pág. 367-388, en Non-Hodgkin's Lymphomas, P. Mauch et al., ediciones., Lippincott Williams & Wilkins, Filadelfia, Pensilvania (2004); T. Lister et al., Follicular Lymphoma, pág. 309-324, en Malignant Lymphoma, B. Hancock et al., ediciones, Oxford University Press, Nueva York, N.Y. (2000)).

#### 5.5.2.2. 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 anormalidades cromosómicas adicionales. El linfoma de células del manto no se caracteriza típicamente por SHM. (Véase, W. Hiddemann et al., Mantle Cell Lymphoma, pág. 461-476, en Non-Hodgkin's Lymphomas, P. Mauch et al., ediciones., Lippincott Williams & Wilkins, Filadelfia, Pensilvania (2004); D. Weisenburger et al., Mantle Cell Lymphoma, pág. 28-41, en Malignant Lymphoma, B. Hancock et al., ediciones., Oxford University Press, Nueva York, N.Y. (2000)).

El inmunofenotipado (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. (Véase, Lal et al., Role of Fine Needle Aspiration in Lymphoma, pág. 181-220, en W. Finn et al., ediciones, Hematopathology in Oncology, Kluwer Academic Publishers, Norwell, Massachusetts (2004); W. Hiddemann et al., Mantle Cell Lymphoma, pág. 461-476, en NonHodgkin's Lymphomas, P. Mauch et al., 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. (Véase, W. Hiddemann, et al., Mantle Cell Lymphoma pág. 461-476, en Non-Hodgkin's Lymphomas, P. Mauch, et al., ediciones, Lippincott Williams & Wilkins, Filadelfia, Pensilvania (2004); D. Weisenburger, et al., Mantle Cell Lymphoma, pág. 28-41, en Malignant Lymphoma, B. Hancock, et al., ediciones., Oxford University Press, Nueva York, N.Y. (2000)).

#### 5.5.2.3. 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. (Véase, V. Pappa, et al., Molecular Biology, pág. 133-157, en Malignant Lymphoma, B. Hancock, et al., 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. (Véase, I. Magrath, et al., Burkitt's Lymphoma, pág. 477-501, en Non-Hodgkin's Lymphomas, P. Mauch, et al., 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. (Véase, K. MacLennan, Diffuse Aggressive B cell Lymphoma, pág. 49-54, en Malignant Lymphoma, B. Hancock, et al., 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. (Véase, R. Siebert, et al., Blood 91:984-990 (1998); T. Denyssevych, et al., Leukemia, 16:276-283 (2002)).

#### 5.5.2.4. 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. (Véase, Armitage, et al., Diffuse Large B cell Lymphoma, pág. 427-453, en Non-Hodgkin's Lymphomas, P. Mauch, et al., 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). (Véase, 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. (Véase, K. MacLennan, Diffuse Aggressive B cell Lymphoma, pág. 49-54, en Malignant Lymphoma, B. Hancock, et al., 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 continúa 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- $\kappa$ B 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.

#### 5.5.2.5. 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 tiroideas). 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. (Véase, J. Yahalom, et al., Extraganglionic Marginal Zone B cell Lymphoma of Mucosa- Associated Lymphoid Tissue, pág. 345-360, en Non-Hodgkin's Lymphomas, P. Mauch, et al., ediciones, Lippincott Williams & Wilkins, Filadelfia, Pensilvania (2004); J. Radford, Other Low-Grade Non-Hodgkin's Lymphomas, pág. 325-330, en Malignant Lymphoma, B. Hancock, et al., 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. (Véase, J. Yahalom, et al., Extraganglionar Marginal Zone B cell Lymphoma of Mucosa- Associated Lymphoid Tissue, pág. 345-360, en Non-Hodgkin's Lymphomas, P. Mauch, et al., 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. (Véase, J. Yahalom, et al., Extraganglionar Marginal Zone B cell Lymphoma of Mucosa-Associated Lymphoid Tissue, pág. 345-360, en Non-Hodgkin's Lymphomas, P. Mauch, et al., ediciones, Lippincott Williams & Wilkins, Filadelfia, Pensilvania (2004)).

#### 5.5.2.6. 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. (Véase, F. Berger, et al., Nodal Marginal Zone B cell Lymphoma, pág. 361-365, en Non-Hodgkin's Lymphomas, P. Mauch, et al., 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. (Véase, F. Berger, et al., Nodal Marginal Zone B cell Lymphoma, pág. 361-365, en Non-Hodgkin's Lymphomas, P. Mauch, et al., ediciones, Lippincott Williams & Wilkins, Filadelfia, Pensilvania (2004)).

#### 5.5.2.7. 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. (Véase, M. Piris, et al., Splenic Marginal Zone Lymphoma, pág. 275-282, en NonHodgkin's Lymphomas, P. Mauch, et al., 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. (Véase, M. Piris, et al., Splenic Marginal Zone Lymphoma, pág. 275-282, en Non-Hodgkin's Lymphomas, P. Mauch, et al., ediciones, Lippincott Williams & Wilkins, Filadelfia, Pensilvania (2004)).

#### 5.5.2.8. 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 recuento elevado de glóbulos blancos es común en la presentación. Las radiografías de tórax muestran con frecuencia lesiones óseas. La propagación extramedular es común 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. (Véase, J. Whitlock, et al., Acute Lymphocytic Leukemia, pág. 2241-2271, en Wintrobe's Clinical Hematology, Décima Edición, G. Lee, et al., ediciones Williams & Wilkins, Baltimore, Mar y land (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). (Véase, M. Kinney, et al., Classification and Differentiation of the Acute Leukemias, pág. 2209-2240, en Wintrobe's Clinical Hematology, Décima Edición, G. Lee, et al., ediciones Williams & Wilkins, Baltimore, Mar y land (1999); J Whitlock, et al., Acute Lymphocytic Leukemia, pág. 2241-2271; En Wintrobe's Clinical Hematology, Décima Edición, G. Lee, et al., ediciones Williams & Wilkins, Baltimore, Mar y land, (1999)).

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 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. (Véase, M. Kinney, et al., Classification and Differentiation of the Acute Leukemias, pág. 2209-2240, en Wintrobe's Clinical Hematology, Décima Edición, G. Lee, et al., ediciones Williams & Wilkins, Baltimore, Mar y land (1999); J. Whitlock, et al., Acute Lymphocytic Leukemia, pág. 2241-2271; En Wintrobe's Clinical Hematology, Décima Edición, G. Lee, et al., ediciones Williams & Wilkins, Baltimore, Mar y land, (1999)).

#### 5.5.2.9. 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 recuentos de sangre de rutina (recuento de linfocitos de más de 5000 x 10<sup>9</sup>/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. (Véase, J. Gribben, et al., Small B cell Lymphocytic Lymphoma/Chronic Lymphocytic Leukemia and Prolymphocytic Leukemia, pág. 243-261, en Non-Hodgkin's Lymphomas, P. Mauch, et al., ediciones, Lippincott Williams & Wilkins, Filadelfia, Pensilvania (2004); K. Maclennan, Diffuse Indolent B cell Neoplasms, pág. 43-47, en Malignant Lymphoma, B. Hancock, et al., ediciones, Oxford University Press, Nueva York, N.Y. (2000); Clinical Oncology, A. Neal, et al., Neal, Hoskin y Oxford University Press, co-publicación, Nueva York, NY (2003)).

A diferencia de muchos de los neoplasias 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  $\beta$ -2microglobulina, niveles superiores de expresión de CD38 y la 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. (Véase, J. Gribben, et al., Small B cell Lymphocytic Lymphoma/Chronic Lymphocytic Leukemia and Prolymphocytic Leukemia, pág. 243-261, en Non-Hodgkin's Lymphomas, P. Mauch, et al., ediciones, Lippincott Williams & Wilkins, Filadelfia, Pensilvania (2004); K. Maclennan, Diffuse Indolent B cell Neoplasms, pág. 43-47, en Malignant Lymphoma, B. Hancock, et al., ediciones, Oxford University Press, Nueva York, N.Y. (2000)).

#### 5.5.2.10. Leucemia prolinfocítica de células B (PLL)

La PLL, considerada una vez una variante de CLL, se entiende ahora como una enfermedad distinta. La PLL es generalmente una enfermedad de hombres ancianos y se caracteriza por un muy alto recuento de glóbulos blancos (más de 200x10<sup>9</sup>/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. (Véase, J. Gribben, et al., Small B cell Lymphocytic Lymphoma/Chronic Lymphocytic Leukemia and Prolymphocytic Leukemia, pág. 243-261, en Non-Hodgkin's Lymphomas, P. Mauch, et al., 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, inmunofenotípico y genético. (Véase, J. Gribben, et al., Small B cell

Lymphocytic Lymphoma/Chronic Lymphocytic Leukemia and Prolymphocytic Leukemia, pág. 243-261, en Non-Hodgkin's Lymphomas, P. Mauch, et al., ediciones, Lippincott Williams & Wilkins, Filadelfia, Pensilvania (2004)).  
5.5.2.11. 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. (Véase, Clinical Oncology, A. Neal, et al., Neal, Hoskin y Oxford University Press, co-publicación, Nueva York, NY (2003); J. Johnston, Hair y Cell Leukemia, pág. 2428-2446, en Wintrobe's Clinical Hematology, Décima Edición, G. Lee et al., ediciones Williams & Wilkins, Baltimore, Mar y land (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. (Véase, Clinical Oncology, A. Neal, et al., Neal, Hoskin y Oxford University Press, co-publicación, Nueva York, NY (2003); J. Johnston, Hair y Cell Leukemia, pág. 2428-2446, en Wintrobe's Clinical Hematology, Décima Edición, G. Lee et al., ediciones, Williams & Wilkins, Baltimore, Mar y land (1999)).

5.5.2.12. 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 (Véase, J. Sweetenham, et al., Precursor B- and T-Cell Lymphoblastic Lymphoma, pág. 503-513, en Non-Hodgkin's Lymphomas, P. Mauch, et al., 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). (Véase, J. Sweetenham, et al., Precursor B- and T-Cell Lymphoblastic Lymphoma, pág. 503-513, en Non-Hodgkin's Lymphomas, P. Mauch, et al., ediciones, Lippincott Williams & Wilkins, Filadelfia, Pensilvania (2004)).

Los ensayos 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.

5.5.2.13. 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. (Véase, P. Zinzani, et al., Primar y Mediastinal Large B cell Lymphoma, pág.

455-460, en *Non-Hodgkin's Lymphomas*, P. Mauch, et al., 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. (Véase, P. Zinzani et al., *Primar y Mediastinal Large B cell Lymphoma*, pág. 455-460, en *NonHodgkin's Lymphomas*, P. Mauch, et al., ediciones, Lippincott Williams & Wilkins, Filadelfia, Pensilvania (2004)).

#### 5.5.2.14. 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. (Véase, A. Rohatiner, et al., *Lymphoplasmacytic Lymphoma and Waldström's Macroglobulinemia*, pág. 263-273, en *Non-Hodgkin's Lymphomas*, P. Mauch, et al., ediciones, Lippincott Williams & Wilkins, Filadelfia, Pensilvania (2004); K. MacLennan, *Diffuse Indolent B cell Neoplasms*, pág. 43-47, en *Malignant Lymphoma*, B. Hancock, et al., ediciones, Oxford University Press, Nueva York, N.Y. (2000); A. Lal, et al., *Role of Fine Needle Aspiration in Lymphoma*, pág. 181-220, en W. Finn, et al., 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). (Véase, A. Rohatiner, et al., *Lymphoplasmacytic Lymphoma and Waldström's Macroglobulinemia*, pág. 263-273, en *Non-Hodgkin's Lymphomas*, P. Mauch, et al., ediciones, Lippincott Williams & Wilkins, Filadelfia, Pensilvania (2004); K. MacLennan, *Diffuse Indolent B cell Neoplasms*, pág. 43-47, en *Malignant Lymphoma*, B. Hancock, et al., ediciones, Oxford University Press, Nueva York, N.Y. (2000); R. Chaganti, et al., *Cytogenetics of Lymphoma*, pág. 809-824, en *Non-Hodgkin's Lymphomas*, P. Mauch, et al., ediciones, Lippincott Williams & Wilkins, Filadelfia, Pensilvania (2004)).

Los ensayos 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  $\beta$ 2-microglobulina se usa como una prueba de pronóstico. (Véase, A. Rohatiner, et al., *Lymphoplasmacytic Lymphoma and Waldström's Macroglobulinemia*, pág. 263-273, en *Non-Hodgkin's Lymphomas*, P. Mauch, et al., ediciones, Lippincott Williams & Wilkins, Filadelfia, Pensilvania (2004)).

#### 5.5.2.15. 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 CD10 (antígeno común a ALL), fuertemente positivo a HLADR, y positivo a CD-19 (B4) (ver Katz et al. (1988) *Blood* 71 (5):1438-47).

#### 5.5.2.16. 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 et al., *Hodgkin Lymphoma*, pág. 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. (Véase, P. Johnson et al., *Hodgkin's Disease: Clinical Features*, pág. 181204, en *Malignant Lymphoma*, B. Hancock, et al., 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 recuentos 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<sub>2</sub>-microglobulina (β<sub>2</sub>-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. (Véase, P. Johnson, et al., Hodgkin's Disease: Clinical Features, pág. 181-204, en Malignant Lymphoma, B. Hancock, et al., ediciones, Oxford University Press, Nueva York, N.Y. (2000); Clinical Oncology, A. Neal, et al., Neal, Hoskin y Oxford University Press, co-publicación, Nueva York, NY (2003); R. Stein, Hodgkin's Disease, pág. 2538-2571, en Wintrobe's Clinical Hematology, Décima Edición, G. Lee et al., ediciones Williams & Wilkins, Baltimore, Mar y land (1999)).

#### 5.5.2.17. 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 (véase, 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 pág. 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 técnica, 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 normales. Los niveles séricos de beta<sub>2</sub>-microglobulina (β<sub>2</sub>-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.

Los ensayos 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 (<3 g/dl, media = 1,1 g/dl); de cadena pesada clase - por lo general  $\alpha$  o  $\gamma$ ; de cadena ligera clase - por lo general A; 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  $\geq$ 10%; ausencia de anemia, insuficiencia renal, lesiones osteolíticas.

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 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.

#### 5.5.2.18. Plasmacitoma solitario

El plasmocitoma solitario es una de un espectro de neoplasias de células plasmáticas que se extiende desde la gammapatía 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 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. (Véase, C. Wilson, The Plasma Cell Dyscrasias, pág. 113-144, en W. Finn and L. Peterson, ediciones, Hematopathology in Oncology, Kluwer Academic Publishers, Norwell, MA (2004), S. Chaganti, et al., Cytogenetics of Lymphoma, pág. 809-824, en Non-Hodgkin's Lymphomas, P. Mauch, et al., ediciones, Lippincott Williams & Wilkins, Filadelfia, Pensilvania, (2004)).

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

#### 5.5.2.19. 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 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. (Véase, C. Wilson, The Plasma Cell Dyscrasias, pág. 113-144, en W. Finn y L. Peterson, ediciones, Hematopathology in Oncology, Kluwer Academic Publishers, Norwell, MA (2004)).

#### 5.5.2.20. Leucemia de células plasmáticas (PCL)

La PCL, una discrasia de células plasmáticas, es una variante agresiva rara del mieloma múltiple. Los criterios para la leucemia de células plasmáticas es un recuento 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. 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. (Véase, C. Wilson, The Plasma Cell Dyscrasias, pág. 113-144, en W. Finn y L. Peterson, ediciones, Hematopathology in Oncology, Kluwer Academic Publishers, Norwell, Massachusetts, (2004)).

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 que 20% de células plasmáticas con el recuento absoluto de 2000/ml o más.

#### 5.5.2.21. 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 sujetos con esta afección se han asociado a afecciones malignas. Cuando los pacientes se vuelven sintomáticos pueden tener hígado o bazo dilatado y pleuroneuropatía (Véase, J. Foerster, Plasma Cell Dyscrasias: General Considerations, pág. 2612-2630, en Wintrobe's Clinical Hematology, Décima Edición, G. Lee et al., ediciones Williams & Wilkins, Baltimore, MD (1999)).

La MGUS se puede diferenciar del mieloma múltiple por la presencia de cantidad aumentada 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 et al., ediciones Williams & Wilkins, Baltimore, MD (1999)).

#### 5.5.2.22. Neoplasias de células B maduras

Los inventores han demostrado que las composiciones anti-CD19 de la invención pueden reducir las células B maduras. Por tanto, como otro aspecto, la invención se puede practicar para tratar neoplasias de células B maduras que incluyen aunque sin limitación 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 linfóide (MALT), y leucemia linfocítica crónica (CLL), incluyendo CLL de inmunoglobulina mutada y CLL de inmunoglobulina no mutada.

#### 5.5.2.23. Neoplasias 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 aunque sin limitación linfoma de células del manto, leucemia linfoblástica aguda de células pre-B, linfoma linfoblástico de células B precursoras, et al. tumores malignos caracterizados por la expresión de CD19.

#### 5.5.3. Determinación de la densidad de CD19 en una muestra o sujeto

Aunque no es necesario, se pueden emplear ensayos de densidad de CD19 para caracterizar adicionalmente el diagnóstico del paciente. Los métodos de determinación de la densidad de la unión del anticuerpo a las células se conocen por los especialistas en la técnica (Véase, por ejemplo, Sato et al., 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 convencionales 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.

Como alternativa, puede emplearse análisis por clasificación celular activada por fluorescencia (FACS). Generalmente, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo se une a una célula diana que expresa CD19. Después se añade un segundo reactivo que se une al anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo marcado con fluorocromo anti-inmunoglobulina. La tinción con fluorocromo puede medirse después y usarse para determinar la densidad de anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se une 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 convencionales con cantidades conocidas de marcador unido a las mismas. La comparación de la cantidad de marcador unido a la célula con los patrones conocidos se puede usar para calcular la cantidad de anticuerpo unido a la célula.

La presente invención proporciona un método para detectar in vitro o in vivo la presencia y/o densidad de CD19 en una muestra o individuo. Esto puede ser útil también para controlar 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 convencionales 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 a ensayar, 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 ensayo.

La intensidad de fluorescencia media se puede usar como una medida de la densidad de CD19. Pueden retirarse células B de un paciente y teñirse con anticuerpos CD19 que se han marcado con un marcador fluorescente y la intensidad de fluorescencia se mide usando 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 neoplasia de células B, cuando CD19 está presente en la superficie de las células B.

## 5.6. Protocolos inmunoterapéuticos

Las composiciones de anticuerpos anti-CD19 usadas en el régimen/protocolo terapéutico, mencionadas en este documento como "inmunoterapia anti-CD19" pueden ser anticuerpos desnudos, inmunoconjugados 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 inmunoconjugados 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, aunque sin limitación, isótopos radiactivos, agentes quimioterapéuticos, y toxinas tales como las toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, o fragmentos de las mismas.

Los regímenes terapéuticos descritos en este documento, o cualquier régimen de tratamiento deseado se pueden ensayar para la eficacia usando un modelo de animal transgénico tal como el modelo de ratón descrito a continuación en la Sección 6.2, 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 ser humano.

Los anticuerpos anti-CD19 de las composiciones y para su uso en los métodos de la invención se pueden usar para tratar enfermedades de células B, incluyendo neoplasias de células B. El término "neoplasia de células B" incluye cualquier tumor maligno que se deriva de una célula del linaje de células B. Los ejemplos de neoplasias de células B incluyen, aunque sin limitación: 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; gammopatía 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).

Los inventores han descubierto que los anticuerpos y composiciones de la invención pueden reducir las células B maduras. Por tanto, como otro aspecto, la invención se puede emplear para tratar neoplasias 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 aunque sin limitación la leucemia linfoblástica aguda.

La invención se puede practicar para tratar tumores extraganglionares.

#### 5.6.1. Inmunoterapia anti-CD19

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

La inmunoterapia anti-CD19 incluye la administración del anticuerpo anti-CD19 como un agente terapéutico único para el tratamiento de una neoplasia de células 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.

En una realización preferida, un sujeto humano que tiene una neoplasia de células 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 sujetos humanos (incluyendo anticuerpos murinos y quiméricos); sin embargo, se prefieren 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 usada debería ser suficiente para reducir las células B circulantes. El progreso de la terapia se puede controlar en el paciente por el análisis de muestras de sangre. Se pueden usar otros signos de mejoría clínica para controlar la terapia.

Los métodos de medición de la reducción de las células B que se pueden usar en relación con las composiciones y métodos de la invención se conocen bien en la técnica e incluyen, aunque sin limitación las realizaciones siguientes. La reducción 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 controlar por medio del uso de análisis convencionales de suero. La reducción 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 reducción y/o la disminución funcional de las células B. La reducción de las células B puede medirse por tinción inmunoquímica 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 y anticuerpos para su uso en los métodos de la invención. Los métodos para medir la carga tumoral se conocen bien en la técnica e incluyen, aunque sin limitación, los siguientes. El escáner PET se puede usar para medir la actividad metabólica e identificar las áreas de actividad superior que son indicativos de los tumores. El escáner 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 de la invención.

Como se describe en este documento, las células B se reducen y/o la carga tumoral se disminuye mientras se mantiene la función ADCC.

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

De acuerdo con ciertos aspectos de la invención, el anticuerpo anti-CD19 usado en las composiciones y para su uso en los métodos 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 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/m<sup>2</sup> de anticuerpos anti-CD19 administrada 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 administrada 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 5.4.3. 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 del recuento 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 reducción 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 o 21 días. Las dosis de mantenimiento se pueden continuar indefinidamente, hasta que la toxicidad se presente, hasta que se reduzca el recuento 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 controlan como parte de un régimen de tratamiento, las dosis de anticuerpo anti-CD19 administradas pueden espaciarse para permitir la recuperación del recuento 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, los especialistas en la técnica 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 técnica. 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 o 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™ (mAb anti-CD20 marcado con indio) (Biogen Idec) o BEXXAR™ (GSK, Coulter Pharmaceutical).

#### 5.6.2. Combinación con agentes quimioterapéuticos

La inmunoterapia anti-CD19 (usando anticuerpo desnudo, inmunoconjugados, o proteínas de fusión) se puede usar junto con otras terapias que incluyen aunque sin limitación, quimioterapia, la radioinmunoterapia (RIT), quimioterapia y radiación de haz externo (terapia de realización combinada, CMT), o radioinmunoterapia de realización combinada (CMRIT) solo o en combinación, etc. En determinadas realizaciones, 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 este documento, el término "administrar junto con" significa que una inmunoterapia anti-CD19 se puede administrar antes, durante, o posterior a la otra terapia empleada.

La inmunoterapia anti-CD19 puede ser junto con un radionúclido citotóxico o isótopo radioterapéutico. Por ejemplo, un isótopo que emite alfa tal como  $^{225}\text{Ac}$ ,  $^{224}\text{Ac}$ ,  $^{211}\text{At}$ ,  $^{212}\text{Bi}$ ,  $^{213}\text{Bi}$ ,  $^{212}\text{Pb}$ ,  $^{224}\text{Ra}$ , o  $^{223}\text{Ra}$ . Como alternativa, el radionúclido citotóxico puede ser un isótopo que emite beta tal como  $^{186}\text{Re}$ ,  $^{188}\text{Re}$ ,  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{67}\text{Cu}$ ,  $^{177}\text{Lu}$ ,  $^{153}\text{Sm}$ ,  $^{166}\text{Ho}$ , o  $^{64}\text{Cu}$ . Además, el radionúclido citotóxico puede emitir electrones Auger y de baja energía, e incluir los isótopos  $^{251}\text{I}$ ,  $^{123}\text{I}$  o  $^{77}\text{Br}$ . El isótopo puede ser  $^{198}\text{Au}$ ,  $^{32}\text{P}$ , y similares. La cantidad del radionúclido administrado al sujeto puede estar entre aproximadamente 0,001 mCi/kg y aproximadamente 10 mCi/kg.

La cantidad del radionúclido administrada al sujeto puede estar entre aproximadamente 0,1 mCi/kg y aproximadamente 1,0 mCi/kg. La cantidad del radionúclido administrado al sujeto puede estar entre aproximadamente 0,005 mCi/kg y 0,1 mCi/kg.

5 La inmunoterapia anti-CD19 puede ser junto con una toxina química o agente quimioterapéutico. Preferiblemente, la toxina química o agente quimioterapéutico se selecciona entre el grupo que consiste en una enediina tal como caliceamicina y esperamicina; duocarmicina, metotrexato, doxorubicina, melfalán, clorambucilo, ARA-C, vindesina, mitomicina C, cisplatino, etopósido, bleomicina y 5-fluorouracilo.

10 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 enediina, tales como caliceamicina y esperamicina. Las toxinas químicas se pueden tomar también del grupo que consiste en duocarmicina (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos N° 5.703.080 y la patente de Estados Unidos N° 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 (véase, la patente de Estados Unidos N° 4.675.187), melfalán y otras mostazas de nitrógeno relacionadas.

Puede usarse "CVB" (1, 5 g/m<sup>2</sup> de ciclofosfamida, 200-400 mg/m<sup>2</sup> de etopósido y 150-200 mg/m<sup>2</sup> de carmustina) en terapias de combinación de la invención. CVB es un régimen usado para tratar el linfoma no-Hodgkin. Patti et al., Eur. J. Haematol. 51:18 (1993). Los especialistas en la técnica conocen bien otros regímenes quimioterapéuticos de combinación adecuados. Véase, por ejemplo, Freedman et al., "Non-Hodgkin's Lymphomas", en Cancer Medicine, volumen 2, 3ª Edición, Holland et al. (Eds.), páginas 2028-2068 (Lea & Febiger 1993). A modo de ilustración, los regímenes quimioterapéuticos de primera generación 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, inmunconjugado o proteína de fusión de acuerdo con la presente invención. Las citoquinas, los fármacos quimioterapéuticos y el anticuerpo, el inmunconjugado o la proteína de fusión se pueden administrar en cualquier orden, o juntos.

Otras toxinas que son preferidas para su uso en las composiciones y con anticuerpos para su uso en los métodos de la invención incluyen lectinas venenosas, toxinas de plantas tales como ricina, abrina, modicina, botulina y 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. Véase, por ejemplo, Pastan et al., Cell 47:641 (1986), y Goldenberg et al., 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. Véase, 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, 19ª Edición. (Mack Publishing Co., 1995), y en GOODMAN AND GILMAN'S THE PHARMACOLOGICAL BASIS OF THERAPEUTICS, 7ª Edición. (MacMillan Publishing Co., 1985). Los especialistas en la técnica conocen bien otras toxinas adecuadas y/o agentes quimioterapéuticos.

La inmunoterapia anti-CD19 de la presente invención puede ser también junto con una enzima que activa el profármaco que convierte un profármaco en un fármaco anti-cáncer activo (por ejemplo, un agente quimioterapéutico peptídico, véase, el documento WO81/01145). Véase, por ejemplo, el documento WO 88/07378 y la patente de Estados Unidos N° 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. Véase, por ejemplo, Wilman, "Prodrugs in Cancer Chemotherapy" Biochemical Society Transactions, 14, páginas 375-382, la 615ta Reunión de Belfast (1986) y Stella et al., "Prodrugs: A Chemical Approach to Targeted Drug Delivery," Directed



Drug Delivery, Borchardt et al. (ed.), páginas 247-267, Humana Press (1985). Los profármacos que se pueden usar en combinación con los anticuerpos anti-CD19 incluyen, aunque sin limitación, profármacos que contienen fosfato, profármacos que contienen tiofosfato, profármacos que contienen sulfato, profármacos que contienen péptido, profármacos con D-aminoácidos modificados, profármacos glucosilados, profármacos que contienen  $\alpha$ -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, aunque sin limitación, aquellos agentes quimioterapéuticos descritos anteriormente.

La administración de las composiciones y anticuerpos para su uso en los métodos 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.

#### 5.6.3. Combinación con anticuerpos terapéuticos

La inmunoterapia anti-CD19 descrita en este documento puede administrarse en combinación con otros anticuerpos, que incluyen, aunque sin limitación, mAb anti-CD20, mAb anti-CD52, anticuerpo anti-CD22 (como se describe, por ejemplo, en la patente de Estados Unidos Nº 5.484.892, la publicación de patente de Estados Unidos Nº 2004/0001828 de la solicitud de Estados Unidos Nº de serie 10/371.797, la publicación de patente de Estados Unidos Nº 2003/0202975 de la solicitud de Estados Unidos Nº de serie 10/372.481 y la solicitud provisional de Estados Unidos Nº de serie 60/420.472) y anticuerpos anti-CD20, tales como RITUXAN™ (C2B8; RITUXIMAB™; Biogen Idec). 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, aunque sin limitación, HERCEPTIN™ (Trastuzumab; Genentech), MYLOTARG™ (Gemtuzumab ozogamicina; Wyeth Pharmaceuticals), CAMPATH™ (Alemtuzumab; Berlex), ZEVALIN™ (Ipriumomab tiuxetan, Biogen Idec), BEXXAR™ (Tositumomab, GlaxoSmithKline Corixa), ERBITUX™ (Cetuximab; Imclone), y AVASTIN™ (Bevacizumab, Genentech).

El mAb anti-CD19 y anti-CD20 y/o anti-CD22 puede administrarse, 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.

#### 5.6.4. Compuestos de combinación que potencian la función de monocitos o macrófagos

En ciertas realizaciones de los métodos de la invención, un compuesto que potencia 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 técnica e incluyen, sin limitación, citoquinas tales como interleuquinas (por ejemplo, IL-12) e interferones (por ejemplo, interferón  $\alpha$  o  $\gamma$ ).

El compuesto que potencia la función de monocitos o macrófagos o la potenciación se puede formular en la misma composición farmacéutica que el 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 realizaciones de ese tipo, el compuesto que mejora la función de monocito o macrófago, se administra al sujeto humano antes de, simultáneamente con, o a continuación del tratamiento con otros regímenes terapéuticos y/o composiciones de la invención. El sujeto humano puede tener recuento en la sangre de leucocitos, monocitos, neutrófilos, linfocitos, y/o basófilos que están dentro del intervalo normal para los seres 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 sujeto humano puede tener un recuento de leucocitos en la sangre que es menor que el intervalo normal para los seres 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.

Esta realización de la invención puede practicarse con los anticuerpos, inmunoconjugados o fragmentos de anticuerpos de la invención o con otros anticuerpos conocidos en la técnica y es particularmente adecuada para sujetos que son resistentes a terapia con anticuerpo anti-CD19, anti-CD20 y/o anti-CD22 (por ejemplo, terapia con anticuerpos existentes, tales como C2B8), sujetos que se tratan actualmente o trataron previamente con quimioterapia, sujetos que han tenido una recaída en el trastorno de células B, sujetos que están inmunocomprometidos, o sujetos por lo demás tienen un deterioro en la función de macrófagos o monocitos. La prevalencia de pacientes que son resistentes a 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 macrófagos o monocitos. Por tanto, la invención proporciona métodos para potenciar la función ADCC y/o de macrófagos y/o monocitos a usar junto con los métodos de administración de anticuerpos anti-CD19.

#### 5.6.5. Combinación con agentes inmunorreguladores

La inmunoterapia anti-CD19 de la presente invención también puede usarse junto con un agente inmunorregulador. En este enfoque, se prefiere el uso de anticuerpos quiméricos, el uso de anticuerpo anti-CD19 humanizado es el más preferido. El término "agente inmunorregulador" como se usa en este documento para la terapia de combinación, se refiere a sustancias que actúan suprimiendo, enmascarando, o potenciando el sistema inmune del hospedador. Esto incluiría sustancias que suprimen la producción de citoquinas, regulan negativamente o suprimen la propia expresión de antígeno, o enmascaran los antígenos MHC. Los ejemplos de agentes de ese tipo incluyen pirimidinas 2-amino-6-aryl-5-sustituidas (véase, la patente de Estados Unidos Nº 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 Estados Unidos Nº 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- $\gamma$ , - $\beta$ , o - $\alpha$ ; anticuerpos anti-factor de necrosis tumoral  $\alpha$ ; anticuerpos anti-factor de necrosis tumoral  $\beta$ ; anticuerpos anti-interleuquina-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 (documento WO 90/08187 publicado el 26 de julio de 1990); estreptoquinasa; TGF- $\beta$ ; estreptodornasa; ARN o ADN del hospedador; FK506; RS-61443; desoxiespergualina; rapamicina; receptor de células T (patente de Estados Unidos Nº 5.114.721.); fragmentos del receptor de células T (Offner et al., Science 251:430432 (1991); documento WO 90/11294; y documento WO 91/01133), y anticuerpos del receptor de células T (documento EP 340.109) tal como T10B9. Los ejemplos de citoquinas incluyen, aunque sin limitación linfoquinas, 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-metionilo, y hormona del crecimiento bovina; hormona paratiroidea; tiroxina; insulina; proinsulina; relaxina; prorelaxina; hormonas glucoproteicas tales como la hormona foliculo-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- $\alpha$ , 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  $\alpha$ ; factor de crecimiento de plaquetas; factores de crecimiento transformante (TGF, tales como TGF- $\alpha$  y TGF- $\alpha$  ; factor de crecimiento I y II tipo insulina; eritropoyetina (EPO); factores osteoinductivos; interferones; factores estimuladores de colonias (CSF) tales como CSF de macrófagos (M-CSF); CgP de granulocitos-macrófagos (GM-CSF); y CSF de granulocitos (G-CSF); interleuquinas (IL) tales como IL-1, IL-1 $\alpha$ , 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, tal como TNF- $\alpha$  o TNF- $\beta$ , y otros factores polipeptídicos, incluyendo LIF y el ligando kit (KL). Como se usa en este documento, el término citoquina incluye las proteínas de fuentes naturales o de cultivo de células recombinantes y equivalentes biológicamente activos de las citoquinas de secuencia nativa. Como se describe en este documento, los métodos pueden incluir además administrar al sujeto uno o más agentes inmunomoduladores, por ejemplo una citoquina. Las citoquinas adecuadas pueden seleccionarse del grupo que consiste en interleuquina-1 (IL-1), IL-2, IL-3, IL-12, IL-15, IL-18, G-CSF, GM-CSF, trombopoyetina, e interferón  $\gamma$ .

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 entre ciclosporina A, un glucocorticoide (por ejemplo prednisona o metilprednisolona), anticuerpo monoclonal OKT-3, azatioprina, bromocriptina, globulina heteróloga anti-linfocito, o una mezcla de los mismos.

#### 5.6.6. Combinación con otros agentes terapéuticos

Los agentes que actúan sobre la neovascularización del tumor se pueden usar también junto con la inmunoterapia anti-CD19 e incluyen agentes de unión de tubulina tales como combrestatina A4 (Griggs et al., Lancet Oncol. 2:82, (2001)) y angiostatina y endostatina (revisado en Rosen, Oncologist 5:20 (2000), incorporado por referencia en este documento). Los inmunomoduladores adecuados para su uso en combinación con anticuerpos anti-CD19 incluyen, aunque sin limitación,  $\alpha$ -interferón, interferón- $\gamma$ , y factor de necrosis tumoral alfa (TNF $\alpha$ ). Los agentes terapéuticos usados en terapias de combinación con composiciones de la invención son péptidos.

La inmunoterapia anti-CD19 puede ser junto con una o más moléculas de caliceamicina. La familia de antibióticos de caliceamicina es capaz de producir rupturas de ADN bicatenario en concentraciones sub-picomolares. Los análogos estructurales de caliceamicina que pueden usarse incluyen, aunque sin limitación,  $\gamma$ 11,  $\gamma$ 21,  $\gamma$ 31, N-acetil- $\gamma$ 11, PSAG y 011 (Hinman et al., Cancer Research 53:3336-3342 (1993) y Lode et al., Cancer Research 58: 2925-2928 (1998)).

Como alternativa, puede prepararse una proteína de fusión que comprende un anticuerpo anti-CD19 y un agente citotóxico, por ejemplo, por técnicas recombinantes o de síntesis de péptidos.

Un anticuerpo anti-CD19 de la invención puede conjugarse a un "receptor" (tal como estreptavidina) para su utilización en pre-direccionamiento tumoral donde se administra el conjugado receptor-antagonista al paciente, seguido por la eliminación del conjugado no unido de la circulación usando un agente de limpieza y después por la administración de un "ligando" (por ejemplo, biotina) 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 de la invención. Los compuestos de ese tipo incluyen analgésicos (por ejemplo, acetaminofeno), bifosfonatos, antihistamínicos (por ejemplo, maleato de clorfeniramina) y esteroides (por ejemplo, dexametasona, retinoides, deltoides, betametasona, cortisol, cortisona, prednisona, deshidrotestosterona, glucocorticoides, mineralocorticoides, estrógenos, testosterona, progestinas).

El agente terapéutico usado en combinación con la inmunoterapia anti-CD19 de la invención puede ser una molécula pequeña (es decir, compuestos inorgánicos u orgánicos que tienen un peso molecular de menos de aproximadamente 2500 dalton). Por ejemplo, pueden obtenerse en el mercado bibliotecas de moléculas pequeñas en Specs y BioSpecs BV (Rijswijk, Países Bajos), ChemBridge Corporation (San Diego, CA), Comgenex USA Inc. (Princeton, NJ), y Maybridge Chemicals Ltd. (Cornwall PL34 OHW, Reino Unido).

La inmunoterapia anti-CD19 se puede administrar en combinación con un agente anti-bacteriano. Los ejemplos no limitantes 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 sujetos. Los ejemplos específicos de agentes antibacterianos incluyen, aunque sin limitación, 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.

La inmunoterapia anti-CD19 de la invención se puede administrar en combinación con un agente anti-fúngico. Los ejemplos específicos de agentes anti-fúngicos incluyen, aunque sin limitación, fármacos de azol (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 liposómica B (AMBISONE®)), yoduro de potasio (KI), pirimidina (por ejemplo, flucitosina (ANCOBON®) y voriconazol (VFEND ®)). La administración de agentes anti-bacterianos y anti-fúngicos puede 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 están significativamente reducidas.

La inmunoterapia anti-CD19 de la invención 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. La inmunoterapia anti-CD19 se puede administrar en combinación con uno o más agentes que se conocen bien en la técnica para el uso en la atenuación de los efectos secundarios de la administración de anticuerpo, quimioterapia, toxinas, o fármacos.

Como se describe en este documento, cuando la inmunoterapia anti-CD19 de la invención 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, Millennium).

Como se describe en este documento, cuando la inmunoterapia anti-CD19 de la invención 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 sujeto 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 técnica.

#### 5.7. Uso de anticuerpos anti-CD19 en el diagnóstico de neoplasias de células B

La presente invención incluye también anticuerpos anti-CD19 de la invención, y composiciones de los mismos, que se unen inmuno-específicamente 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 una neoplasia 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 inmuno-específicamente al antígeno CD19 humano con una sustancia detectable, que incluyen aunque sin limitación, diversas enzimas, tales como, aunque sin limitación, peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, beta-galactosidasa, o acetilcolinesterasa; grupos prostéticos, tales como, aunque sin limitación, estreptavidina biotina y avidina/biotina; técnicas fluorescentes, tales como, aunque sin limitación, umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, fluoresceína diclorotriazinilamina, cloruro de dansilo o ficoeritrina; técnicas luminiscentes, tales como aunque sin limitación, luminol; técnicas bioluminiscentes, tales como aunque sin limitación, luciferasa, luciferina, y aequorina, técnicas radiactivas, tales como, aunque sin limitación, yodo ( $^{131}\text{I}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{123}\text{I}$ ,  $^{121}\text{I}$ ), carbono ( $^{14}\text{C}$ ), azufre ( $^{35}\text{S}$ ), tritio ( $^3\text{H}$ ), indio ( $^{115}\text{In}$ ,  $^{113}\text{In}$ ,  $^{112}\text{In}$ ,  $^{111}\text{In}$ ), y tecnecio ( $^{99}\text{Tc}$ ), talio ( $^{201}\text{Tl}$ ), galio ( $^{68}\text{Ga}$ ,  $^{67}\text{Ga}$ ), paladio ( $^{103}\text{Pd}$ ), molibdeno ( $^{99}\text{Mo}$ ), xenón ( $^{133}\text{Xe}$ ), flúor ( $^{18}\text{F}$ ),  $^{153}\text{Sm}$ ,  $^{177}\text{Lu}$ ,  $^{159}\text{Gd}$ ,  $^{149}\text{Pm}$ ,  $^{140}\text{La}$ ,  $^{175}\text{Yb}$ ,  $^{166}\text{Ho}$ ,  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{47}\text{Sc}$ ,  $^{186}\text{Re}$ ,  $^{188}\text{Re}$ ,  $^{142}\text{Pr}$ ,  $^{105}\text{Rh}$ ,  $^{97}\text{Ru}$ ,  $^{68}\text{Ge}$ ,  $^{57}\text{Co}$ ,  $^{65}\text{Zn}$ ,  $^{85}\text{Sr}$ ,  $^{32}\text{P}$ ,  $^{153}\text{Gd}$ ,  $^{169}\text{Yb}$ ,  $^{51}\text{Cr}$ ,  $^{54}\text{Mn}$ ,  $^{75}\text{Se}$ ,  $^{113}\text{Sn}$  y  $^{117}\text{Te}$ ; 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 técnica), por medio del uso de técnicas conocidas en la técnica. Véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos Nº 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. Como se describe en este documento, la presente descripción proporciona kits de diagnóstico que comprenden un anticuerpo anti-CD19 conjugado con una gente de diagnóstico o detectable.

#### 5.8. Kits

La presente descripción proporciona un envase o kit farmacéutico que comprende uno o más recipientes llenados con una composición de la presente descripción para la prevención, tratamiento, control o mejora de una neoplasia de células B, o uno o más síntomas de la misma, potenciados por o que potencian una neoplasia de células B.

La presente descripción proporciona kits que pueden usarse en los métodos descritos anteriormente. Un kit comprende una composición de la presente descripción, en uno o más recipientes. En otra realización, un kit comprende una composición de la invención, en uno o más recipientes, y uno o más agentes profilácticos o terapéuticos diferentes útiles para la prevención, control o tratamiento de una neoplasia de células B, o uno o más síntomas de la misma, potenciados por o que potencian una neoplasia de células B en uno o más recipientes diferentes. El kit comprende adicionalmente instrucciones para prevenir, tratar, controlar o mejorar una neoplasia de células B, así como información sobre los efectos secundarios y dosificación para el método de administración. Opcionalmente, asociado con dicho recipiente o recipientes puede haber una notificación en forma prescrita por una agencia gubernamental que regula la fabricación, uso o venta de productos farmacéuticos o biológicos, reflejando dicha notificación la aprobación por la agencia de la fabricación, uso o venta para administración a seres humanos.

#### 6. Ejemplos

En los siguientes ejemplos se usó un modelo de ratón transgénico para evaluar inmunoterapias dirigidas a CD19 humano. Estos datos muestran que anticuerpos que se unen al antígeno CD19 y que también median ADCC son eficaces para inducir la reducción de células B *in vivo*, en sujetos que tienen células efectoras que expresan FcγR, (preferiblemente, FcγRIII o FcγRIV) y realizan ADCC. Dichos anticuerpos pueden usarse para inducir una reducción duradera de células B *in vivo*, y en ciertas realizaciones pueden eliminar casi todas las células B de la circulación, el bazo y los ganglios linfáticos. Sorprendentemente, las células B de médula ósea y sus precursores que expresan densidades relativamente bajas del antígeno CD19 se reducen también. La eficacia de reducción de células B no es dependiente de la región de CD19 humano en que se une un anticuerpo anti-CD19, pero se ve influenciada por la densidad de CD19 (en la muestra del paciente). La eficacia de eliminación de células B puede correlacionarse con la

capacidad del anticuerpo anti-CD19 de mediar la ADCC. La eficacia de eliminación de células B usando anticuerpos anti-CD19 también puede correlacionarse con la expresión/función de FcγR efector del hospedador.

## 6.1. Materiales y métodos

Los anticuerpos murinos anti-CD19 HB12a y HB12b descritos en este documento son ejemplares de anticuerpos que se unen a CD19 humano. Dichos anticuerpos pueden usarse para diseñar anticuerpos anti-CD19 humanos, humanizados, o quiméricos usando las técnicas descritas anteriormente en la Sección 5.1. Los anticuerpos anti-CD19 humanos, humanizados, o quiméricos que tienen la misma especificidad por CD19 humano o partes del mismo que los anticuerpos HB12a y HB12b se contemplan para su uso en las composiciones y anticuerpos para su uso en los métodos de la invención. En particular, se contemplan anticuerpos anti-CD19 humanos, humanizados, o quiméricos que tienen las mismas regiones CDR1, CDR2, y/o CDR3 de cadena pesada o similar que los HB12a o HB12b para su uso en las composiciones y anticuerpos para su uso en los métodos de la invención.

### 6.1.1. Materiales y métodos

*Generación de anticuerpos y análisis de secuencias.* Los anticuerpos HB12a y HB12b se generaron en ratones Balb/c inmunizados con una línea celular pre-B de ratón que se transfectó con ANDc que codificaban CD19 humano (Zhou et al., Mol. Cell Biol., 14:3884-94 (1994)). Ambos anticuerpos se presentaron al Fifth International Workshop and Conference on Human Leukocyte Differentiation Antigens que se mantuvo en Boston el 3 - 7 de noviembre de 1993.

Se determinó la utilización del gen de cadena pesada usando ARN extraído de  $1-5 \times 10^6$  células de hibridoma usando el kit RNEASY® Mini (QIAGEN®, Valencia, CA). Se sintetizó ADNc de primer hebra en un volumen de 20 µl a partir de 2 µg de ARN total usando 200 unidades de transcriptasa inversa SUPERScript III® y ADNc de primera hebra, tampón de síntesis de INVITROGEN® (Carlsbad, CA), 20 ng de cebadores hexaméricos aleatorios y 20 unidades de inhibidor de RNasa de PROMEGA® (Madison, WI), y 80 nmoles de dNTP de Denville (Metuchen, NJ). Se usó un µl de solución de ADNc como molde para la amplificación por PCR de genes de cadena pesada ( $V_H$ ). Las reacciones de PCR se realizaron en un volumen de 50 µl de una mezcla de reacción compuesta por Tris-HCl 10 mM (pH 8,3),  $\text{NH}_4\text{Cl}$  5 mM, KCl 50 mM,  $\text{MgCl}_2$  1,5 mM, dNTP 800 µM (Denville), 400 pmol de cada cebador, y 2,5 U de ADN polimerasa Taq (Invitrogen) con polimerasa con corrección de errores pfu al 10% (Stratagene LaJolla, CA). Para  $V_L$ , las reacciones de PCR se realizaron en un volumen de 50 µl de una mezcla de reacción compuesta por Tris-HCl 20 mM (pH 8,4), KCl 50 mM,  $\text{MgCl}_2$  1,5 mM, dNTP 800 µM (Denville), 400 pmol de cada cebador, y 2,5 U de ADN polimerasa Taq (Invitrogen) con adiciones de polimerasa con corrección de errores pfu al 10% (Stratagene). Después de una etapa de desnaturalización de 3 min., la amplificación fue para 32 ciclos (94°C durante 1 min, 58°C durante 1 min, 72°C durante 1 min) seguido de una extensión de 10 minutos a 72°C (Thermocycler, Perkin Elmer). El ADNc de cadena pesada se amplificó usando un cebador promiscuo de  $V_H$  5' con sentido (MsV<sub>H</sub>E; 5' GGG AAT TCG AGG TGC AGC TGC AGG AGT CTG G 3') (SEC ID N° 19) como se ha descrito previamente (Kantor et al., J. Immunol., 158: 1175-1186 (1997)) y un cebador antisentido complementario a la región codificante de  $C_\gamma$  (cebador  $C_\gamma 1$ ; 5' GAG TTC CAG GTC ACT GTC ACT GGC TCA GGG A3') (SEC ID N° 20).

La utilización del gen de cadena ligera se determinó usando ARN citoplasmático extraído como se ha descrito para la cadena pesada. La secuencia de nucleótidos de la región variable 5' se obtuvo del ADNc que se generó usando el kit GeneRacer™ (Invitrogen). El ARN total se desfosforiló con fosfatasa intestinal de ternera. La estructura de capuchón 5' se retiró del ARNm de longitud completa intacto con pirofosfatasa ácida de tabaco. Se ligó un oligo de ARN GeneRacer al extremo 5' del ARNm usando ARN ligasa T4 que proporciona un sitio de cebador 5' conocido para los cebadores de PCR GeneRacer después de transcribir el ARNm en ADNc. El ARNm ligado se transcribió de forma inversa con RT Superscript™III y el cebador aleatorio GeneRacer. El ADNc de primera hebra se amplificó usando el cebador 5' GeneRacer (homólogo al oligo de ARN GeneRacer) y un cebador 3' antisentido específico de la región constante (GAC TGA GGC ACC TCC AGA TGT TAA CTG) (SEC ID N° 21). Se realizaron amplificaciones de PCR de ensayo en un volumen de 50 µl con tampones recomendados por Invitrogen, usando 2,5 U de ADN polimerasa Taq (Invitrogen) con polimerasa con corrección de errores pfu al 10% (Stratagene) añadida. Después de una etapa de desnaturalización 2 min., se añadieron Taq y pfu y se realizó la amplificación en 3 etapas: cinco ciclos de 94°C durante 30 s, 72°C durante 60 s; 5 ciclos de 94°C durante 30 s, 72°C durante 60 s; 20 ciclos de 94°C durante 30 s, 65°C durante 30 s, 72°C durante 60 s, seguido de extensión de 10 min. a 72 °C. Se añadieron 2,5 U de Taq y se dejó proceder la extensión durante otros 10 min. para asegurar salientes-A 3' intactos. Los productos de PCR amplificados se clonaron en el vector pCR4-TOPO para secuenciación y se transformaron en células TOP10 competentes OneShot®. Se secuenciaron los insertos de ADN de 8 clones para cada cadena ligera de mAb usando los cebadores "M 13 directo" y "M 13 inverso" específicos del vector pCR4-TOPO, como se ha descrito para la cadena pesada.

Los productos de PCR purificados de cadena pesada y ligera se secuenciaron directamente en ambas direcciones usando un secuenciador de ADN ABI 377 PRISM® después de amplificación usando el sistema de secuenciación con terminador de colorante Perkin Elmer con ADN polimerasa AmpliTaq® y los mismos cebadores usados para la amplificación inicial por PCR o cebadores específicos del vector pCR4-TOPO, como se ha descrito para la cadena

ligera. Se secuenciaron las regiones de cadena pesada y ligera de HB12a y HB12b completamente en ambas hebras de ADN, con sentido y antisentido.

*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 et al., J Immunol 136:4470-9 (1986)); anticuerpos monoclonales de ratón específico a CD20 (Uchida et al., 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, AL).

La línea celular pre-B de ratón, 300.19 (Alt et al., Cell, 27:381-388 (1981)), transfectada con ADNc de hCD19 (Tedder e Isaacs, J. Immunol., 143:712-717 (1989)), o suspensiones de leucocitos de una única célula, se tiñeron en hielo usando concentraciones óptimas, predeterminadas, de cada anticuerpo durante 20-30 minutos de acuerdo con métodos establecidos (Zhou et al., Mol. Cell. Biol., 14:3884-3894 (1994)). Las células con las propiedades de dispersión de luz directa y lateral de los linfocitos se analizaron en citómetros de flujo FACSCAN® o FACSCALIBUR® (Becton Dickinson, San Jose, California). La tinción del fondo se determinó usando los anticuerpos de control no reactivos (CALTAG™ Laboratories, Burlingame, California) con marcos posicionados para excluir  $\geq 98\%$  de las células. Para cada muestra examinada, diez mil células con las propiedades de dispersión de luz directa y lateral de las células mononucleares se analizaron siempre que fue posible, con la intensidad de fluorescencia mostrada en una escala logarítmica de cuatro decenas.

*Ratones.* Se produjeron ratones transgénicos que expresaban (hCD19) y sus camadas de tipo silvestre (TS) como se ha descrito previamente (Zhou et al., Mol. Cell. Biol., 14:3884-3894 (1994)). Se generaron ratones TG-1 a partir de los fundadores originales h19-1 (C57BL/6 x B6/SJL), y se cruzaron en un fondo C57BL/6 durante al menos 7 generaciones. Se generaron ratones TG-2 a partir de los fundadores originales h19-4 (C57BL/6 x B6/SJL). Después de múltiples generaciones de retrocruzamiento, se obtuvieron ratones TG-1<sup>+/+</sup> cuyas células B expresaban densidad en superficie celular de CD19 humano en aproximadamente la misma densidad encontrada en células B humanas. Los ratones que expresan CD19 humano se han descrito adicionalmente y usado como modelo en varios estudios (Engel et al., Immunity, 3:39-50 (1995); Sato et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92:11558-11562 (1995); Sato et al., J. Immunol., 157:4371-4378 (1996); Tedder et al., Immunity, 6:107-118 (1997); Sato et al., J. Immunol., 158:4662-4669 (1997); Sato et al., J. Immunol., 159:3278-3287 (1997); Sato et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94:13158-13162 (1997); Inaoki et al., J. Exp. Med., 186:1923-1931 (1997); Fujimoto et al., J. Immunol., 162:7088-7094 (1999); Fujimoto et al., Immunity, 11:191-200 (1999); Satterthwaite et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97:6687-6692 (2000); Fujimoto et al., Immunity, 13:47-57 (2000); Sato et al., J. Immunol., 165:6635-6643 (2000); Zipfel et al., J. Immunol., 165:6872-6879 (2000); Qian et al., J. Immunol., 166:2412-2419 (2001); Hasegawa et al., J. Immunol., 167:2469-2478 (2001); Hasegawa et al., J. Immunol., 167:3190-3200 (2001); Fujimoto et al., J. Biol. Chem., 276:44820-44827 (2001); Fujimoto et al., J. Immunol., 168:5465-5476 (2002); Saito et al., J. Clin. Invest., 109:1453-1462 (2002); Yazawa et al., Blood, 102:1374-80 (2003); Shoham et al., J. Immunol., 171:4062-4072 (2003)). También se han descrito previamente ratones CD19-deficientes (CD19<sup>-/-</sup>) y sus camadas TS (Engel et al., Immunity, 3:39-50 (1995)). La expresión de CD19 humano en ratones transgénicos ha demostrado reducir la expresión endógena de CD19 de ratón (Sato et al., J. Immunol., 157:4371-4378 (1996); y Sato et al., J. Immunol., 158:4662-4669 (1997)) y también se han evaluado hipótesis respecto a esta disminución de la expresión endógena de CD19 de ratón (Shoham et al., J. Immunol., 171:4062-4072 (2003)). Las densidades de expresión de CD19 en ratones transgénicos que expresan CD19 human también se han evaluado (Sato et al., J. Immunol., 165:6635-6643 (2000)).

Se cruzaron ratones TG-1<sup>+/+</sup> con ratones deficientes en FcR (receptor de Fc) de cadena  $\gamma$  común (FcR $\gamma$ )<sup>-/-</sup> (FcR $\gamma$ <sup>-/-</sup>, B6.129P2-Fcerg1<sup>tm1</sup>) de Taconic Farms (Germantown, NY) para generar camadas hCD19<sup>+/+</sup> FcR $\gamma$ <sup>-/-</sup> y TS. También se describieron ratones hemigénicos para un transgén c-Myc (E $\mu$ -cMycTG, C57B1/6J-TgN(IghMyc); The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME) (Harris et al., J. Exp. Med., 167:353 (1988) y Adams et al., Nature, 318:533 (1985)). Se cruzaron ratones c-MycTG (fondo B6/129) con ratones hCD19TG-1<sup>+/+</sup> para generar descendencia hemigénica hCD19TG-1<sup>+/+</sup> cMycTG<sup>+/+</sup> determinada por exploración por PCR. Los ratones Rag1<sup>-/-</sup> (B6.129S7-Rag1<sup>tm1Mom</sup>/J) fueron de The Jackson Laboratory. Se generaron ratones deficientes en macrófagos mediante inyecciones en la vena de la cola de clodronato encapsulado en liposomas (0,1 ml/10 gramos de peso corporal; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) en ratones C57BL/6 en el día -2, 1 y 4 de acuerdo con métodos convencionales (Van Rooijen y Sanders, J. Immunol. Methods, 174:83-93 (1994)). Todos los ratones se alojaron en una instalación de con barrera libre de 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 patrón como se ha descrito (Engel et al., Immunity, 03:39 (1995)). Los niveles de autoanticuerpos IgM e IgG en suero contra ADNbc, ADNmc e histona se determinaron por ELISA usando placas de microtitulación recubiertas como se ha descrito (Sato et al., J. Immunol., 157:4371 (1996)) con ADN bicatenario (bc) de timo de ternera (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri), ADN hervido de timo de ternera (que contiene ADN monocatenario (mc)) o histona (Sigma-Aldrich).

*Inmunoterapia.* Los anticuerpos control de isotipo no reactivo, y anti-CD19 estériles (0,5-250 µg) en 200 µl de solución salina tamponada con fosfato (PBS) se inyectaron a través de las venas laterales de la cola. Todos los experimentos usaron 250 µg de anticuerpo salvo que se indique otra cosa. Los números de leucocitos en la sangre se cuantificaron mediante hemocitómetro después de lisis de glóbulos rojos, las frecuencias de células B B220<sup>+</sup> se determinaron mediante la tinción por inmunofluorescencia con análisis de citometría de flujo. Las dosis de anticuerpos en humanos y ratones se compararon usando la herramienta de Oncología para calcular la dosis ([www.fda.gov/cder/cancer/animalframe.htm](http://www.fda.gov/cder/cancer/animalframe.htm)).

*Inmunizaciones.* Los ratones TS de dos meses se inmunizaron i.p. con 50 µg de 2,4,6-trinitrofenilo (TNP) conjugado a lipopolisacárido (LPS) (Sigma, St. Louis, Missouri) o 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 de 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 en adyuvante incompleto de Freund. Se tomaron muestras de sangre de los ratones antes y después de las inmunizaciones, según se indica. Los títulos de anticuerpos específicos para DNP o TNP en muestras individuales de suero se midieron por duplicado usando placas ELISA recubiertas con DNP-BSA (CALBIOCHEM®- NOVABIOCHEM® Corp., La Jolla, CA) o TNP-BSA (Biosearch Technologies, San Rafael, CA) de acuerdo con métodos convencionales (Engel et al., Immunity, 3:39-50 (1995)). Los sueros de ratones inmunizados con TNP-LPS se diluyeron 1:400, diluyendo los sueros de ratones inmunizados con DNP-FICOLL® y DNP-BSA 1:1000 para el análisis ELISA.

*Estudios en tumor.* Se aisló y expandió *in vivo* tumor espontáneo de ganglio linfático de un ratón hCD19TG<sup>-1+/-</sup> c-mycTG<sup>+/-</sup>. Se administraron células tumorales (10<sup>-5</sup>/ratón) i.v. a ratones receptores Rag<sup>-/-</sup> en el día 0, con mAb FMC63 y de control de isotipo coincidente (250 µg/ml) dados i.v. en los días 1 y 7. Se aislaron leucocitos sanguíneos de los ratones receptores semanalmente con la cantidad de células CD19<sup>+</sup> B220<sup>+</sup> de ratón en circulación cuantificada por tinción inmunofluorescente con análisis de citometría de flujo.

*Análisis estadístico.* Todos los datos se muestran como las medias ± DTM. Se usó ensayo t de Student para determinar la significancia de las diferencias entre las medias de las muestras.

## 6.2. Ejemplo 1: Expresión de CD 19 humano en ratones transgénicos

Pueden usarse los ratones transgénicos hCD 19Tg descritos en este documento u otros animales transgénicos que expresen CD 19 humano para evaluar diferentes regímenes terapéuticos que comprenden anticuerpos anti-CD19 humanos, humanizados, o quiméricos, tales como variaciones en la concentración de dosificación, cantidad, o cronología. La eficacia en pacientes humanos de diferentes regímenes terapéuticos puede predecirse usando los dos indicadores descritos a continuación, es decir, reducción de células B en ciertos fluidos corporales y/o tejidos y la capacidad de un anticuerpo anti-CD19 humano o humanizado monoclonal de unirse a células B. Los regímenes de tratamiento que son eficaces en ratones transgénicos para CD19 humano pueden usarse con las composiciones y anticuerpos para su uso en los métodos de la invención para tratar neoplasias de células B en seres humanos.

Para determinar si CD19 humano se expresaba en células B de ratones transgénicos (hemicigóticos TG-1<sup>+/-</sup>) que expresan el transgén de CD19 humano, se extrajeron células B de la médula ósea, sangre, bazo y lavado peritoneal de estos ratones. Se evaluó la expresión de CD19 humano y CD19 de ratón en estas células poniendo en contacto las células con anticuerpos anti-CD19 monoclonales de ratón que se unen a CD19. La unión del anticuerpo a las células del linaje B se detectó usando tinción de inmunofluorescencia de dos colores con análisis de citometría de flujo.

Los resultados se muestran en la Fig. 1A en gráficos de la expresión detectada de CD19 murino (mCD19) (eje-x) representado frente a la expresión detectada de CD19 humano (hCD19) (eje-y) para médula ósea (BM), sangre, bazo y lavado peritoneal (PL). Las unidades del eje representan una escala log de cuatro decenas que empieza con 1 en la parte inferior izquierda. El anticuerpo anti-CD19 B4 que se une a CD19 humano (Beckman/Coulter) se usó para visualizar la expresión de CD19 humano y el anticuerpo anti-CD19 1D3 que se une a CD19 de ratón (PharMingen) se usó para visualizar la expresión de CD19 de ratón (también usado para las Fig. 1B y 1C). Aunque la expresión de CD19 humano aumenta de forma creciente durante el desarrollo de células B humanas, CD19 murino se expresa a altos niveles durante el desarrollo de células B de médula ósea de ratón. La Fig. 1A muestra que la expresión de CD19 humano es paralela a la expresión de CD19 de ratón en células B periféricas encontradas en la sangre, el bazo y lavado peritoneal (PL) lo que demuestra que el anticuerpo anti-hCD19 de ratón (que se une a CD19 humano) se une a las poblaciones de células B periféricas. Además, una pequeña población de células B derivadas de médula ósea (BM) expresa CD19 de ratón endógeno pero no CD19 humano (anticuerpo de ratón monoclonal anti-CD19 que se une a CD19 humano). Por tanto, las células B de médula ósea entran dentro de dos categorías en ratones hemicigóticos TG-1<sup>+/-</sup>, células del linaje B maduras que son hCD19<sup>+</sup>mCD19<sup>+</sup> y células del linaje B menos maduras que son solamente mCD19<sup>+</sup> (Fig. 1A). Estos resultados son coherentes con los hallazgos de Zhou et al. (Mol. Cell. Biol., 14:3884-3894 (1994)) que indicaron que la expresión de CD19 humano en estos ratones transgénicos se correlaciona con la maduración de células B. Todas las células B maduras en la sangre, bazo, y cavidad peritoneal eran tanto hCD19<sup>+</sup> como mCD19<sup>+</sup>.

Los niveles de expresión relativa de mCD19 y hCD19, evaluados midiendo la intensidad de fluorescencia media (anti-CD19 de ratón para hCD19 y anti-CD19 de ratón mCD19) respectivamente, se muestran en la Fig. 1B. Entre los ratones TG-1 homocigóticos para el transgén hCD19 (TG-1<sup>+/+</sup>), la expresión de hCD19 en células B transportadas en la sangre era comparable con la expresión de hCD19 en células B humanas. Para comparar las densidades relativas de expresión de hCD19 y mCD19 en líneas de ratón transgénicas TG-1<sup>+/+</sup>, TG-1<sup>+/-</sup>, y TG-2<sup>+/+</sup>, se extrajeron células B derivadas de la sangre y se ensayaron para la expresión de CD19 como se ha descrito anteriormente. Los resultados se muestran en la Fig. 1B en histogramas que muestran el porcentaje de expresión de CD19 humano para células B de sangre humana, células B sanguíneas TG-1<sup>+/+</sup>, TG-1<sup>+/-</sup>, y TG-2<sup>+/+</sup> de ratones hCD19TG (izquierda) y el porcentaje de expresión de CD19 de ratón para células B de sangre de ratón de tipo silvestre (TS), células B sanguíneas TG-1<sup>+/+</sup>, TG-1<sup>+/-</sup>, y TG-2<sup>+/+</sup> de ratones hCD19TG (derecha). Los valores (valores lineales de intensidad fluorescente media) representan las densidades relativas medias de la expresión de CD19 ( $\pm$ DTM) en comparación con células B sanguíneas de seres humanos o ratones de tipo silvestre (TS) (mostrado como 100%). Los resultados muestran que en ratones homocigóticos TG-1<sup>+/+</sup>, las células B sanguíneas expresaban hCD19 a densidades medidas por intensidades de fluorescencia media aproximadamente un 72% mayores que células B sanguíneas humanas. Las células B sanguíneas en ratones TG-1<sup>+/+</sup> expresaban hCD19 a densidades similares a células B sanguíneas humanas, mientras que las células B sanguíneas en ratones TG-2<sup>+/+</sup> expresaban hCD19 a densidades un 65% inferiores que células B sanguíneas humanas.

Se muestran comparaciones adicionales de las densidades relativas de la expresión de hCD19 y mCD19 en células B de tejidos de ratón TG-1<sup>+/+</sup> en la Fig. 1C en histogramas que muestran las intensidades de fluorescencia media (MFI $\pm$ DTM) de anticuerpo anti-CD19 que tñe células B de médula ósea, sangre, bazo, ganglio linfático, y PL para hCD19 (izquierda) y mCD19 (derecha). Los resultados demuestran que en ratones TG-1<sup>+/+</sup>, hCD19 se expresaba a niveles crecientes por células B220<sup>+</sup> en la médula ósea (63% de niveles en sangre humana) < sangre (100%) < bazo (121%) = ganglio linfático (120%) y < cavidad peritoneal (177%). La expresión de CD19 humano tuvo una pequeña influencia sobre la expresión de mCD19. Los niveles de ARNm para hCD19 y mCD19 no cambiaron.

Para determinar si anticuerpos de ratón anti-hCD19 (que se unen a CD19 humano) de los isotipos IgG1 (HB12a, HB12b, B4), IgG2a (FMC63) e IgG2b (HD237) reaccionan de forma diferente, se aislaron células B220<sup>+</sup> de sangre y bazo de ratones TG-1<sup>+/+</sup>. Las células aisladas se pusieron en contacto *in vitro* con los anticuerpos mencionados anteriormente anti-CD19 y se evaluaron para su capacidad de unirse a células B de ratón transgénico (hCD 19TG) que expresan CD19 humano usando tinción con anticuerpo monoclonal que se visualizó usando anticuerpos secundarios específicos de isotipo conjugados con PE con análisis de citometría de flujo.

Los resultados se muestran en la Fig. 1D en gráficos de la intensidad de fluorescencia (eje-x) frente a la cantidad relativa de células B (eje-y) para anticuerpos anti-CD19 IgG2b (isotipo murino), IgG2a (isotipo murino), e IgG1 (isotipo murino) a 5  $\mu$ g/ml. La intensidad de fluorescencia de células B220<sup>+</sup> teñidas con anticuerpo anti-CD19 se muestra como líneas continuas y la intensidad de fluorescencia del control de isotipo coincidente (CTL) se muestra como una línea discontinua. Cada anticuerpo alcanzó niveles saturantes de reactividad con células B de bazo a una concentración de 5  $\mu$ g/ml. Los resultados demuestran que la densidad de unión del anticuerpo anti-CD19 en células B220<sup>+</sup> de sangre y bazo de ratones TG-1<sup>+/+</sup> es uniforme para los isotipos de anticuerpo ensayados y para células B tanto de sangre como de bazo.

Para determinar si las intensidades de fluorescencia media eran independientes del isotipo de anticuerpo anti-CD19, se evaluó la actividad de unión de anticuerpos anti-CD19 individuales (a 5  $\mu$ g/ml) tiñendo una línea celular pre-B de ratón, 300.19, transfectada con un ADNc de hCD19 usando el mismo anticuerpo secundario anti-Ig de ratón. La tinción con anticuerpo (MFI $\pm$ DTM) se visualizó usando anticuerpo secundario de ratón específico de Ig conjugado con PE con análisis de citometría de flujo. Los resultados se muestran en la Fig. 1E en un histograma de unión de anticuerpo anti-CD19 (como se muestra por la intensidad de tinción, eje-y) a células 300.19 transfectadas con ADNc de hCD19, para anticuerpos anti-CD19 HB12a, HB12b, B4, FMC63, HD237 y un anticuerpo de control (CTL). Cada anticuerpo tiñó las células con intensidades características de fluorescencia media que fueron independientes del isotipo de anticuerpo anti-CD19, mostrando HB12b los niveles inferiores de tinción y demostrando HD237 los mayores. Por tanto, los resultados mostrados demuestran que las células 300.19 son un sistema *in vitro* modelo para la comparación de la capacidad de anticuerpos anti-CD19 de unirse a CD19 *in vitro*.

Por tanto, tomados en conjunto, los resultados mostrados en la Fig. 1 demuestran que ratones hCD 19TG y las células 300.19 representan sistemas modelo apropiados *in vitro* e *in vivo* para evaluar la capacidad de anticuerpos anti-hCD19 de unirse a células B cuando se expresa hCD19 sobre un intervalo de densidades.

Las Fig. 1A-D representan resultados obtenidos con  $\geq 3$  ratones de cada genotipo.

## 6.2. Ejemplo 2: Reducción por anticuerpos anti-CD19 de células B *in vivo*

Se evaluaron anticuerpos anti-CD19 de ratón (que se unen a CD19 humano) para su capacidad de reducir las células B de sangre, bazo, y ganglio linfático en hCD19TG (TG-1<sup>+/+</sup>) *in vivo*. Cada anticuerpo se dio a los ratones a 250 o 50  $\mu$ g/ratón, una única dosis aproximadamente 10 a 50 veces inferior que la dosis de 375 mg/m<sup>2</sup> dada cuatro



veces para terapia anti-CD20 en seres humanos (Maloney et al., J. Clin. Oncol., 15:3266-74(1997) y McLaughlin et al., 12:1763-9 (1998)).

Los resultados se muestran en la Fig. 2A en un diagrama de cantidad de células B 7 días después del tratamiento con CD19 o control de isotipo coincidente (CTL) con anticuerpos anti-CD19 HB12a, HB12b, o FMC63 o un control. Se proporcionan diagramas diferentes para ganglios linfáticos, tejido de bazo y de sangre para cada anticuerpo anti-CD19. El porcentaje de linfocitos en el marco reducidos a los 7 días mostrado en cada diagrama demuestra la reducción representativa de células B de sangre, bazo y ganglios linfáticos de ratones TG-1<sup>+/-</sup> determinada por tinción de inmunofluorescencia con análisis de citometría de flujo. La Fig. 2B muestra las cantidades medias ( $\pm$ DTM por ml) de células B sanguíneas B220<sup>+</sup> después de tratamiento con anticuerpos anti-CD19 (círculos cerrados) o de control de isotipo (círculos abiertos). El valor mostrado después de tiempo 0 representa datos obtenidos a 1 hora. La Fig. 2C y Fig. 2D muestran cantidades de células B en bazo y ganglio linfático ( $\pm$ DTM), respectivamente, después de tratamiento de ratones TG-1<sup>+/-</sup> con anticuerpo anti-CD19 (barras rellenas) o control (barras abiertas) a las dosis indicadas. En las Fig. 2B-D, se indican las diferencias significativas entre los resultados medio para ratones tratados con anticuerpo anti-CD19 o de control de isotipo ( $\geq 3$  ratones por dato puntual); \*p<0,05, \*\*p<0,01, en comparación con los controles.

Cada anticuerpo redujo la mayoría de las células B en circulación en una hora de tratamiento (Fig. 2B), con potentes efectos de reducción en las frecuencias de células B de bazo y ganglio linfático (Fig. 2A) y las cantidades (Fig. 2C-D) en el día siete. El anticuerpo HB12a redujo el 98% de las células B sanguíneas y el 90-95% de las células B esplénicas y de ganglio linfático en el día siete. Asimismo, los anticuerpos HB12b, B4, FMC63, y HD237 redujeron el 99%, 96%, 99%, y 97% de las células B sanguíneas, respectivamente. Los anticuerpos HB12b, B4, FMC63, y HD237 redujeron el 88-93%, 64-85%, 72-95%, y 88-90% de las células B esplénicas y de ganglio linfático, respectivamente. Las pocas células B periféricas restantes representaban principalmente células fenotípicamente inmaduras que eran emigrantes potenciales de la médula ósea. Ninguno de los anticuerpos anti-CD19 tuvo efectos significativos cuando se dio a ratones TS, y anticuerpos de control de isotipo coincidente en condiciones idénticas no afectaron a las cantidades de células B (Fig. 2A-D). Por tanto, los anticuerpos anti-hCD19 redujeron de forma eficaz las células B de la circulación, el bazo y los ganglios linfáticos de ratones hCD19TG en el día siete. Se proporciona un resumen de la reducción de células B en ratones TG-1<sup>+/-</sup> en la Tabla 1.

Tabla 1

| Tejido     | subconjunto B <sup>a</sup> | mAb <sup>b</sup> de control | mAb CD19               | % de reducción |
|------------|----------------------------|-----------------------------|------------------------|----------------|
| BM:        | B220 <sup>+</sup>          | 3,41 $\pm$ 0,57 (11)        | 0,82 $\pm$ 0,13(11)    | 76**           |
|            | Pro-B                      | 0,75 $\pm$ 0,1 (5)          | 0,97 $\pm$ 0,22 (5)    | 0              |
|            | Pre-B                      | 1,74 $\pm$ 0,58 (5)         | 0,10 $\pm$ 0,01 (5)    | 94**           |
|            | inmaduro                   | 0,70 $\pm$ 0,16 (5)         | 0,04 $\pm$ 0,01 (5)    | 93**           |
|            | maduro                     | 0,86 $\pm$ 0,14 (5)         | 0,004 $\pm$ 0,0004 (5) | 99**           |
| Sangre:    | B220 <sup>+</sup>          | 0,822 $\pm$ 0,14 (11)       | 0,004 $\pm$ 0,0006     | 99**           |
| Bazo:      | B220 <sup>+</sup>          | 25,2 $\pm$ 2,2 (11)         | 1,7 $\pm$ 0,2 (11)     | 93**           |
| LN:        | B220 <sup>+</sup>          | 0,89 $\pm$ 0,11 (11)        | 0,06 $\pm$ 0,01 (11)   | 93**           |
| Peritoneo: | B220 <sup>+</sup>          | 1,16 $\pm$ 0,11 (11)        | 0,37 $\pm$ 0,03 (11)   | 68**           |
|            | B1a                        | 0,86 $\pm$ 0,12 (5)         | 0,31 $\pm$ 0,06 (5)    | 61**           |
|            | B2                         | 0,34 $\pm$ 0,06 (5)         | 0,08 $\pm$ 0,02 (5)    | 73**           |

B<sup>a</sup> los subconjuntos de células B fueron: pro-B (CD43<sup>+</sup>IgM<sup>+</sup>B220<sup>lo</sup>), pre-B (CD43<sup>+</sup>IgM<sup>+</sup>B220<sup>lo</sup>) de médula ósea (BM); B inmaduro (IgM<sup>+</sup>B220<sup>lo</sup>), B maduro (IgM<sup>+</sup>B220<sup>hi</sup>); B1a (CD5<sup>+</sup>B220<sup>lo</sup>), B2 (CD5<sup>+</sup>B220<sup>hi</sup>) peritoneal.

<sup>b</sup>Valores ( $\pm$ DTM) indican cantidades de células ( $\times 10^6$ ) presentes en ratones siete días después del tratamiento con anticuerpo (250  $\mu$ g). Los valores BM son para fémures bilaterales. Las cantidades en sangre son por/ml. Las cantidades LN son para ganglios inguinales y axilares bilaterales. Las cantidades de ratones se indican en paréntesis. Las diferencias significativas entre las medias se indican; \*p<0,05, \*\*p<0,01.

### 6.3.1. Reducción de células B en médula ósea

Se ensayaron anticuerpos anti-CD19 conocidos en ratones hCD19TG para determinar si dichos anticuerpos eran eficaces en la reducción de células B de diversos fluidos corporales y tejidos. Los ensayos descritos en este documento pueden usarse para determinar si otros anticuerpos anti-CD19, por ejemplo, anticuerpos anti-CD19 que se unen a partes específicas del antígeno CD19 humano, reducirán de forma eficaz las células B. los resultados usando anticuerpos anti-CD19 identificados como capaces para reducir las células B pueden correlacionarse con su uso en seres humanos. Pueden usarse anticuerpos con propiedades de los anticuerpos identificados en las composiciones y métodos de la invención para su uso en el tratamiento de neoplasias de células B en seres humanos. Las Fig. 3A-3C representan reducción de células B en médula ósea después de tratamiento con anticuerpo anti-CD19.

La Fig. 3A muestra gráficos de la intensidad de fluorescencia (eje-x) frente a la cantidad relativa de células B (eje-y) para la expresión de hCD19 y mCD19 por subpoblaciones de células B de médula ósea TG-1<sup>+/-</sup> evaluadas por tinción de inmunofluorescencia de cuatro colores con análisis de citometría de flujo de células con las propiedades de dispersión directa y lateral de linfocitos. Las células pro-B se definieron como CD43<sup>+</sup>IgM<sup>+</sup>B220<sup>lo</sup>, las células pre-B

fueron CD43<sup>hi</sup>IgM<sup>B220</sup><sup>lo</sup>, las células B inmaduras fueron IgM<sup>B220</sup><sup>lo</sup> y las células B maduras fueron IgM<sup>B220</sup><sup>hi</sup>. Los gráficos de barras (derecha) muestran valores medios relativos de MFI ( $\pm$ DTM) para la expresión de CD19 por cada subconjunto de células B ( $\geq 3$  ratones/dato puntual). Como en ratones hCD19TG (Fig. 1A), la expresión de CD19 es heterogénea en seres humanos según maduran las células B y salen de la médula ósea. Solamente una pequeña fracción de células pro-B (20%, CD43<sup>hi</sup>IgM<sup>B220</sup><sup>lo</sup>) expresó hCD19 en ratones TG-1<sup>+/-</sup>, mientras que la mayoría de las células pre-B fueron hCD19<sup>+</sup> y la mayoría de las células B maduras en la médula ósea expresó hCD19 a niveles relativamente altos. La mitad de las células pro-B (55%, IgM<sup>B220</sup><sup>+</sup>) expresó mCD19 en ratones TG-1<sup>+/-</sup>, mientras que mCD19 se expresó por la mayoría de las células pre-B y células B maduras en la médula ósea a niveles relativamente altos.

La Fig. 3B muestra la reducción de células hCD19<sup>+</sup> en ratones hCD19TG siete días después del tratamiento con anticuerpo FMC63 o de control de isotipo coincidente (250  $\mu$ g) evaluado por tinción de inmunofluorescencia de dos colores con análisis de citometría de flujo. Las cantidades representan la frecuencia relativa de células dentro de los marcos indicados. Los resultados representan aquellos obtenidos con tres parejas de camadas de cada genotipo de ratón. Después del tratamiento con anticuerpo anti-CD19, la inmensa mayoría de las células hCD19<sup>+</sup> en la médula ósea de ratones TG-1<sup>+/+</sup>, TG-1<sup>+/-</sup> y TG-2<sup>+/+</sup> se redujo por el anticuerpo FMC63 dado a 250  $\mu$ g/ratón.

La Fig. 3C muestra la reducción de células B B200<sup>+</sup> representativas siete días después del tratamiento con anticuerpo anti-CD19 o de control de isotipo coincidente (250  $\mu$ g) de ratones TG-1<sup>+/-</sup>. Los valores en el gráfico de barras representan la cantidad total ( $\pm$ DTM) de células B200<sup>+</sup> en los fémures bilaterales de ratones tratados con anticuerpo. Se indican las diferencias significativas entre medias de muestra ( $\geq 3$  ratones por grupo); \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ . Inesperadamente, también se redujo una gran fracción de células pre-B of mCD19<sup>+</sup> que expresaban hCD19 a niveles de bajos a indetectables de médula ósea. Coherente con esto, los anticuerpos FMC63, HB12a, HB12b, B4 y HD237 redujeron la mayoría de las células B200<sup>+</sup> de médula ósea.

La Fig. 3D muestra la reducción del subconjunto de células B de médula ósea representativos siete días después del tratamiento con anticuerpo FMC63 o de control de isotipo coincidente (250  $\mu$ g) de ratones TG-1<sup>+/-</sup> evaluados por tinción de inmunofluorescencia de tres colores. Las células pro-/pre-B IgM<sup>B220</sup><sup>lo</sup> se subdividieron adicionalmente en base a la expresión de CD43 (paneles inferiores). La Fig. 3E muestra la reducción representativa para células pre-B CD25<sup>+</sup>B220<sup>lo</sup> de médula ósea siete días después del tratamiento con anticuerpo FMC63 o de control de isotipo coincidente (250  $\mu$ g) de líneas de ratón hCD19TG evaluadas por tinción de inmunofluorescencia de dos colores. Los resultados son de experimentos realizados en diferentes días de modo que los marcos no fueron idénticos. Cuando se analizaron las subpoblaciones individuales de médula ósea, la mayoría de las células pro-B CD43<sup>hi</sup>IgM<sup>B220</sup><sup>lo</sup> (Fig. 3D) no se vieron afectadas por el tratamiento con anticuerpo FMC63 en ratones TG-1<sup>+/+</sup>, TG-1<sup>+/-</sup> o TG-2<sup>+/+</sup>, mientras que la mayoría de las células pre-B CD25<sup>+</sup>CD43<sup>lo</sup>IgM<sup>B220</sup><sup>lo</sup> (Fig. 3E) se redujo. La Fig. 3F muestra gráficos de barras que indican cantidades ( $\pm$ DTM) de células pro-B, pre-B, B inmaduras, y maduras en fémures bilaterales siete días después del tratamiento con anticuerpo FMC63 (barras cerradas) o de control (barras abiertas) de  $\geq 3$  parejas de camadas. Los resultados demuestran, que la mayoría de las células B inmaduras y maduras también se reducían de la médula ósea de ratones TG-1<sup>+/+</sup>, TG-1<sup>+/-</sup> y TG-2<sup>+/+</sup>. Por tanto, la mayoría de las células hCD19<sup>+</sup> se reducían de la médula ósea por tratamiento con anticuerpo anti-CD19, incluyendo células pre-B que expresaban hCD19 a niveles bajos.

### 6.3.2. Reducción de células B peritoneales

Las células B de la cavidad peritoneal en ratones TG-1<sup>+/-</sup> expresan hCD19 a niveles mayores que otras células B tisulares (Fig. 1A y Fig. 1C), principalmente debido a la presencia de células CD5<sup>+</sup>IgM<sup>hi</sup>B220<sup>lo</sup>-B1 que expresaban hCD19 a densidades aproximadamente un 25% mayores que el subconjunto CD5<sup>+</sup>IgM<sup>lo</sup>B220<sup>hi</sup> de células B convencionales (B2) (Fig. 4A). Las Fig. 4B-4C demuestran que las células B de la cavidad peritoneal son sensibles a tratamiento con anticuerpo anti-CD19.

La Fig. 4A muestra diagramas de la expresión de CD19 humano y de ratón (eje-x) frente a la cantidad relativa de células B de la cavidad peritoneal CD5<sup>+</sup>B220<sup>+</sup> B1a y CD5<sup>+</sup>B220<sup>hi</sup> B2 (convencionales) (eje-y). Se examinaron suspensiones de células individuales de linfocitos de la cavidad peritoneal por tinción de inmunofluorescencia de tres colores con análisis de citometría de flujo. Los gráficos de barras representan valores de MFI media ( $\pm$ DTM) para la expresión de CD19 por tres parejas de camadas de ratones TG-1<sup>+/-</sup>.

La Fig. 4B muestra la reducción de células B220<sup>+</sup> de la cavidad peritoneal de ratones TG-1<sup>+/-</sup> tratados con anticuerpos contra CD19 (HB12a, HB12b, y FMC63 a 250  $\mu$ g; B4 y HD237 a 50  $\mu$ g) o anticuerpo de control (250  $\mu$ g). Los números representan las frecuencias relativas de células B220<sup>+</sup> dentro de los marcos indicados en el día siete. Los valores del gráfico de barras representan la cantidad total ( $\pm$ DTM) de células B220<sup>+</sup> dentro del peritoneo de ratones tratados con anticuerpo ( $\geq 3$  ratones por grupo). Se indican las diferencias significativas entre las medias de muestra; \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ . Los resultados demuestran que el tratamiento con anticuerpo anti-CD19 a 250  $\mu$ g/ratón reducía una parte significativa de las células B peritoneales B220<sup>+</sup> en el día siete. Los resultados mostrados en la Fig. 4B se explican en parte por la reducción de células tanto B1 como B2 convencionales. Cuando se expresaba hCD19 a las mayores densidades en ratones TG-1<sup>+/+</sup>, la mayoría de las células B1 y B2 se reducía. Sin embargo, la reducción mediada por CD19 de células B1 y B2 fue menos eficaz en ratones TG-1<sup>+/-</sup> y TG-2<sup>+/-</sup> donde los niveles de

hCD19 son inferiores. Por tanto, el tratamiento con anticuerpo contra CD19 reducía las células B1 y B2 peritoneales dependiendo de su densidad de expresión de CD19 evaluado usando intensidad de fluorescencia media, aunque las células B peritoneales eran más resistentes a la reducción mediada por anticuerpo anti-CD19 que las células B de bazo y ganglio linfático.

La Fig. 4C muestra reducción representativa de células B CD5<sup>+</sup>B220<sup>+</sup> B1a y CD5<sup>+</sup>B220<sup>hi</sup> B2 siete días después del tratamiento con anticuerpo anti-CD19 o anticuerpo de control de ratones hCD19TG. Los números representan las frecuencias relativas de cada subconjunto de células B dentro de los marcos indicados. Los valores del gráfico de barras representan la cantidad total ( $\pm$ DTM) de cada subconjunto celular dentro del peritoneo de ratones tratados con anticuerpo ( $\geq 3$  ratones por grupo). Se indican las diferencias significativas entre las medias de muestra; \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ .

### 6.3.3. Distintos anticuerpos anti-CD19 median la eliminación de células B

Para determinar si los anticuerpos anti-CD19 HB12a y HB12b son distintos de los anticuerpos anti-CD19 conocidos, se analizó la secuencia de aminoácidos de cada región variable de anticuerpo anti-CD19 usada en este documento (Fig. 5A y 5B, 6A y 6B, 7A y 7B).

La Fig. 5A representa las secuencias de nucleótidos (SEC ID N° 1) y de aminoácidos predicha (SEC ID N° 2) para secuencias de unión de cadena pesada V<sub>H</sub>-D-J<sub>H</sub> del anticuerpo anti-CD19 HB12a. Las secuencias que solapan con el cebador de PCR 5' se indican por doble subrayado y pueden variar de la secuencia real de ADN ya que se usaron cebadores redundantes. Los límites de unión aproximados entre las secuencias V, D, y J se designan en las secuencias por barras verticales (|). Los nucleótidos en letras minúsculas indican cualquier adición de nucleótido en los límites de unión o sitios potenciales para hipermutación somática. El resto aminoterminal del anticuerpo (E) está marcado como resto 1.

La Fig. 5B representa las secuencias de nucleótidos (SEC ID N° 3) y de aminoácidos predicha (SEC ID N° 4) para secuencias de unión de cadena pesada V<sub>H</sub>-D-J<sub>H</sub> del anticuerpo anti-CD19 HB12b. Las secuencias que solapan con el cebador de PCR 5' se indican por doble subrayado y pueden variar de la secuencia real de ADN ya que se usaron cebadores redundantes. Los límites de unión aproximados entre las secuencias V, D, y J se designan en las secuencias por barras verticales (|). Los nucleótidos en letras minúsculas indican cualquier adición de nucleótido en los límites de unión o sitios potenciales para hipermutación somática. El resto aminoterminal del anticuerpo (E) está marcado como resto 1.

La Fig. 6A representa la secuencia de nucleótidos (SEC ID N° 15) y de aminoácidos predicha (SEC ID N° 16) para secuencias de unión de cadena ligera V<sub>K</sub>-J<sub>K</sub> del anticuerpo anti-CD19 HB12a. La Fig. 6B representa las secuencias de nucleótidos (SEC ID N° 17) y de aminoácidos predicha (SEC ID N° 18) para las secuencias de unión de cadena ligera V-J del anticuerpo anti-CD19 HB12b. El aminoácido aminoterminal de la proteína secretada madura deducida por análisis de secuencia de aminoácidos está numerado como número 1. Las secuencias que solapan con el cebador de PCR 3' se indican por doble subrayado. Los límites de unión predichos para las regiones V-J-C están indicados (/) representando los nucleótidos de la región J sitios potenciales para hipermutación somática en negrita.

Las Fig. 7A y 7B representan la alineación de secuencia de aminoácidos de anticuerpos publicados anti-CD19 de ratón. La Fig. 7A muestra una alineación de secuencia para secuencias de unión de cadena pesada V<sub>H</sub>-D-J<sub>H</sub> incluyendo una secuencia consenso (SEC ID N° 5), HB12a (SEC ID N° 2), 4G7 (SEC ID N° 6), HB12b (SEC ID N° 4), HD37 (SEC ID N° 7), B43 (SEC ID N° 8), y FMC63 (SEC ID N° 9). La numeración y designación de aminoácidos de los orígenes de las secuencias codificantes para cada región de anticuerpo V, D, y J son de acuerdo con métodos convencionales (Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, U.S. Government Printing Office, Bethesda, MD (1991)) donde las posiciones de aminoácido 1-94 y las regiones determinantes de complementariedad CDR1 y 2 están codificadas por un gen V<sub>H</sub>. Los guiones indican un hueco insertado en la secuencia para maximizar la alineación de secuencias similares de aminoácidos. Los puntos indican identidad entre cada anticuerpo anti-CD19 y la secuencia consenso de aminoácidos para todos los anticuerpos. Las regiones CDR están resaltadas por motivos de claridad. La Fig. 7B muestra el análisis de secuencia de aminoácidos de cadena ligera V<sub>K</sub> de anticuerpos anti-CD19. Las secuencias consenso (SEC ID N° 10), HB12a (SEC ID N° 16); HB12b (SEC ID N° 18); HD37 (SEC ID N° 11), B43 (SEC ID N° 12), FMC63 (SEC ID N° 13), y 4G7 (SEC ID N° 14) están alineadas. La numeración y designación de aminoácidos de los orígenes de la secuencia codificante para cada anticuerpo anti-CD19 es de acuerdo con métodos convencionales (Kabat et al., (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, U.S. Government Printing Office, Bethesda, MD). El aminoácido detrás del sitio de escisión de la secuencia señal predicha está numerado 1. Los guiones indican un hueco insertado en la secuencia para maximizar la alineación de secuencias similares de aminoácidos. Las regiones CDR están resaltadas (recuadro) por motivos de claridad.

Como cada anticuerpo anti-CD19 examinado en este estudio redujo cantidades significativas de células B *in vivo*, la secuencia de aminoácidos de cada región variable de anticuerpo anti-CD19 se evaluó para determinar si estos anticuerpos diferían en secuencia y se unían potencialmente a diferentes epítomos CD19. Los anticuerpos se unen a antígenos diana a través de interacciones moleculares que están mediadas por aminoácidos específicos dentro de

las regiones variables de cada molécula de anticuerpo. Por tanto, las complejas interacciones entre antígenos proteicos y los anticuerpos que se unen a epítomos específicos en estos antígenos son casi únicas para cada anticuerpo y su secuencia específica de aminoácidos. Este nivel de complejidad en las interacciones de antígeno y anticuerpo es un reflejo de un diverso repertorio de anticuerpos para la mayoría de antígenos proteicos. Aunque las interacciones de los anticuerpos con los antígenos diana están principalmente mediadas por aminoácidos dentro de las regiones determinantes de complementariedad (CDR) de moléculas de anticuerpo, también son críticos los aminoácidos flanqueantes para la actividad de unión a antígeno. Por tanto, anticuerpos estructuralmente similares probablemente se unen a los mismos antígenos o región de una molécula diana, mientras que anticuerpos estructuralmente distintos con diferentes regiones V y CDR probablemente interaccionan con diferentes regiones de antígenos a través de diferentes interacciones moleculares.

Como los anticuerpos que interaccionan con y se unen a la misma región molecular (o epítomo) de un antígeno diana son estructuralmente similares por definición, se compararon las secuencias de aminoácidos de HB12a, HB12b, FMC63 y otros anticuerpos anti-CD19 incluyendo los anticuerpos HD37 (Kipriyanov et al., J. Immunol. Methods, 196:51-62(1996); Le Gall et al., FEBS Letters, 453:164-168 (1999)), 2G7 (Meeker et al., Hybridoma, 3:305-320 (1984); Brandl et al., Exp. Hematol., 27:1264-1270 (1999)), y B43 (Bejcek et al., Cancer Res., 55:2346-2351 (1995)). Las cadenas pesadas de los anticuerpos anti-CD19 se generaron a través de diferentes combinaciones de segmentos génicos V(D)J con las regiones V derivadas de los segmentos génicos V1S39, V1S56, V1S136, o V2S1, regiones D derivadas de segmentos génicos FL16.1, y regiones J derivadas de segmentos génicos J2 o J4 (Tabla 2). Las regiones variable de cadena pesada y ligera publicadas de los anticuerpos B43 y HD37 eran casi idénticas en secuencia de aminoácidos (Fig. 7A-B). Este nivel de conservación refleja el hecho de que cada uno de estos anticuerpos también es remarcadamente similar a nivel nucleotídico, teniendo uniones V<sub>H</sub>(D)<sub>H</sub> y V<sub>L</sub>J<sub>L</sub> idénticas, con las mayores diferencias justificadas por el uso de cebadores redundantes para amplificar por PCR cada secuencia de ADNc. Esto indica que los anticuerpos HD37 y B43 comparten un origen común, sino idéntico, y por lo tanto se unen a epítomos idénticos en la proteína CD19. Los anticuerpos HB12a y 4G7 también eran distintos de otros anticuerpos anti-CD19. Aunque las regiones de cadena pesada de los anticuerpos HB12a y 4G7 son similares y probablemente han derivado de los mismos segmentos génicos V<sub>H</sub>(D)<sub>H</sub> de la línea germinal, se usaron diferentes límites de unión para el ensamblaje D-J<sub>H</sub> (Fig. 7A). El anticuerpo HB12b utilizó un segmento génico V<sub>H</sub> distinto (Tabla 2) y obtuvo secuencias CDR3 netamente diferentes (Fig. 7A) de los otros anticuerpos anti-CD19. El anticuerpo FMC63 también obtuvo una secuencia de aminoácidos muy distinta de los otros anticuerpos anti-CD19.

Tabla 2

|       | Cadena pesada  |        |    |                           | Cadena ligera |           |              |
|-------|----------------|--------|----|---------------------------|---------------|-----------|--------------|
|       | V <sup>a</sup> | D      | J  | Nº de acceso <sup>b</sup> | V             | J         | Nº de acceso |
| HB12a | V1S136 (12,8)  | FL16.1 | J2 |                           | V1-133*<br>01 | J2*<br>01 |              |
| HB12b | V1S56 (27,14)  | FL16.1 | J2 |                           | V3-2*01       | 01        |              |
| 4G7   | V1S136 (10,8)  | F16.1  | J2 | AJ555622                  | V2-137        | J5        | AJ555479     |
| B43   | V1S39 (37,17)  | FL16.1 | J4 | S78322                    | V3-4          | J1        | S78338       |
| HD37  | V1S39 (34,16)  | FL16.1 | J4 | X99230                    | V3-4          | J1        | X99232       |
| FMC63 | V2S1 (20,16)   | FL16.1 | J4 | Y14283                    | V10-96        | J2        | Y14284       |

N.D., no determinado.

<sup>a</sup>Los números entre paréntesis indican el número de diferencias de nucleótidos entre el gen que codifica el anticuerpo contra CD19 y la secuencia más homóloga de la línea germinal identificada en bases de datos actuales, excluyendo regiones solapantes con los cebadores de PCR.

<sup>b</sup>Números de acceso a GENBANK<sup>®</sup> para secuencias génicas.

Como se muestra en la Fig. 7B, los anticuerpos HB12a, HB12b, FMC63, 4G7, y HD37/B43 utilizan cada uno distintos genes de cadena ligera (Fig. 7B). Se generaron cadenas ligeras a partir de múltiples segmentos génicos V y J. La ausencia de homogeneidad entre estas seis secuencias de cadena H y L de anticuerpos anti-CD19 sugiere que estos anticuerpos se unen a varios sitios distintos en CD19 humano. Una comparación de secuencias de aminoácidos de cadenas pesada y ligera emparejadas indica adicionalmente que la mayoría de estos anticuerpos anti-CD19 son estructuralmente distintos y por lo tanto se unirán a CD19 humano a través de diferentes interacciones moleculares. Por tanto, la capacidad de los anticuerpos anti-CD19 de reducir las células B *in vivo* no está restringida a una cantidad limitada de anticuerpos que se unen a CD19 en sitios idénticos, sino que es una propiedad general de los anticuerpos anti-CD19 como una clase.

#### 6.3.4. La densidad de CD19 influye en la eficacia de la reducción de células B inducida por anticuerpo contra CD19

Para determinar si la capacidad de un anticuerpo anti-CD19 de reducir células B es dependiente de la densidad de CD19, se administraron los anticuerpos anti-CD19 HB 12b y FMC63 a ratones que tenían niveles variables de expresión de CD19. Los resultados demuestran que la densidad de CD19 humano en células B y el isotipo de anticuerpo pueden influir en la reducción de células B en presencia de un anticuerpo anti-CD19. Puede usarse el mismo ensayo para determinar si otros anticuerpos anti-CD19 pueden reducir de forma eficaz las células B y los resultados pueden correlacionarse con el tratamiento de pacientes humanos con niveles variables de expresión de

CD19. Por tanto, los métodos para examinar la presencia de CD19 y la densidad en sujetos humanos descritos en la sección 5.5.3 pueden usarse para identificar pacientes o poblaciones de pacientes para los cuales ciertos anticuerpos anti-CD19 pueden reducir las células B y/o determinar dosificaciones adecuadas.

Los resultados presentados anteriormente indican que aunque los cinco anticuerpos anti-CD19 ensayados eran similarmente eficaces en ratones TG-1<sup>+/-</sup> cuando se usaban a 250 ó 50 µg, el grado de reducción de células B para células B de sangre, médula ósea y bazo parecía correlacionarse con el isotipo de anticuerpo, IgG2a>IgG1>IgG2b (Figs. 2A-2D). Por tanto, la eficacia de los anticuerpos HB12b (IgG1) y FMC63 (IgG2a) se comparó en ratones homocigóticos TG-1<sup>+/+</sup>, heterocigóticos TG-1<sup>+/-</sup> y homocigóticos TG-2<sup>+/+</sup> que expresan CD19 a diferentes densidades (Fig. 1A-E).

Para determinar si la densidad de CD19 influye en la eficacia de la reducción de células B inducida por anticuerpo anti-CD19 se examinó la reducción representativa de células B en sangre y bazo en ratones hCD 19TG después de tratamiento con anticuerpo HB 12b (Fig. 8A) o FMC63 (Fig. 8B) (7 días, 250 µg/ratón). Los números indican el porcentaje de linfocitos B220<sup>+</sup> del marco. Los gráficos de barras indican las cantidades (±DTM) de células B en sangre (por ml) o bazo (cantidad total) después de tratamiento con anticuerpos anti-CD19 (barras cerradas) o anticuerpos de control de isotipo (barras abiertas). Se indican las diferencias significativas entre los resultados medios para ratones tratados con anticuerpo anti-CD19 o anticuerpo de control de isotipo (≥3 ratones por dato puntual); \*p<0,05, \*\*p<0,01.

Los resultados presentados en las Fig. 8A-8D demuestran que la densidad de CD19 influye en la eficacia de reducción de células B por anticuerpos anti-CD19 *in vivo*. La expresión de CD19 de bajo nivel en ratones TG-2<sup>+/+</sup> tuvo una influencia marcada sobre la reducción de células B en circulación o tejido por el anticuerpo HB12b en el día siete (Fig. 8A). Las diferencias en la expresión de CD19 por ratones TG-1<sup>+/+</sup>, TG-1<sup>+/-</sup> y TG-2<sup>+/+</sup> también influyó en la reducción de células B en circulación y tejido por el anticuerpo FMC63 pero no alteró significativamente la reducción de células B en circulación (Fig. 8B).

Para verificar adicionalmente que la densidad de CD19 es un factor importante en la reducción de células B mediada por mAb contra CD19, se compararon directamente las tasas relativas de reducción de células B CD19TG-1<sup>+/+</sup> y CD19TG-2<sup>+/+</sup>. Se marcaron de forma diferencial esplenocitos de ratones CD19TG-1<sup>+/+</sup> y CD19TG-2<sup>+/+</sup> con CFSE marcando esplenocitos no fraccionados de ratones hCD19TG-1<sup>+/+</sup> y hCD19TG-2<sup>+/+</sup> que se marcaron con Vybrant™ CFDA SE (CFSE; Molecular Probes) 0,1 y 0,01 µM, respectivamente, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se determinó la frecuencia relativa de células B220<sup>+</sup> entre los esplenocitos marcados con CFSE por tinción de inmunofluorescencia con análisis de citometría de flujo. Posteriormente, se inyectaron cantidades iguales de esplenocitos B220<sup>+</sup> hCD19TG-1<sup>+/+</sup> y hCD19TG-2<sup>+/+</sup> marcados con CFSE (2,5x10<sup>5</sup>) en la cavidad peritoneal de tres ratones B6 de tipo silvestre. Después de 1 hora, se dio a los ratones FMC63 o mAb de control (250 µg, i.p.). Después de 24 horas, se recuperaron los linfocitos marcados con las frecuencias relativas de células B220<sup>+</sup> y B220<sup>-</sup> marcadas con CFSE evaluadas por citometría de flujo. Los marcos en cada histograma en la Fig. 8C indican las frecuencias de células B220<sup>+</sup> dentro de las poblaciones de esplenocitos CD19TG-1<sup>+/+</sup> (CFSE<sup>high</sup>) y CD19TG-2<sup>+/+</sup> (CFSE<sup>low</sup>). El gráfico de barras indica la cantidad de población celular marcada con CFSE presente en ratones tratados con mAb anti-CD19 respecto a ratones tratados con mAb de control. Los resultados representan esplenocitos hCD19TG-1<sup>+/+</sup> (barras rellenas) y esplenocitos hCD19TG-2<sup>+/+</sup> (barras abiertas) transferidos a ≥3 ratones de tipo silvestre receptores, con diferencias significativas entre medias de muestra (±DTM) indicadas; \*\*p<0,01.

La eliminación de células B se evaluó 24 horas después del tratamiento con mAb anti-CD19 o de control de ratones individuales. Se redujeron las células B CD19TG-1<sup>+/+</sup> B220<sup>+</sup> a tasas significativas más rápidas (p<0,01) que células B CD19TG-2<sup>+/+</sup> en ratones tratados con mAb anti-CD19 en comparación con ratones tratados con mAb de control (Fig. 8C). Además, la frecuencia relativa de células B CD19TG-1<sup>+/+</sup> B220<sup>+</sup> respecto a células B CD19TG-2<sup>+/+</sup> B220<sup>+</sup> en ratones tratados con mAb anti-CD19 fue significativamente inferior (p<0,01) que la proporción de células B CD19TG-1<sup>+/+</sup> B220<sup>+</sup> respecto a células B CD19TG-2<sup>+/+</sup> B220<sup>+</sup> en ratones tratados con mAb de control. Asimismo, las cantidades de células B B220<sup>-</sup> marcadas con CFSE CD19TG-1<sup>+/+</sup> y CD19TG-2<sup>+/+</sup> en ratones tratados con mAb anti-CD19 o de control también fueron comparables. Por tanto, las células B CD19TG-1<sup>+/+</sup> B que expresan CD19 a alta densidad se redujeron a una tasa más rápida que las células B CD19TG-2<sup>+/+</sup> que expresan CD 19 a una baja densidad.

La Fig. 8D muestra la intensidad de fluorescencia de células B220<sup>+</sup> teñidas con anticuerpos contra CD19 (líneas gruesas), CD20 (líneas delgadas) o de control de isotipo coincidente (CTL, líneas discontinuas) (5 µg/ml), usando la tinción de anticuerpo visualizada un anticuerpo secundario específico de isotipo conjugado con PE con análisis de citometría de flujo. Los resultados representan aquellos obtenidos en 4 experimentos. Los resultados muestran las densidades relativas de unión de anticuerpo anti-hCD19 y anti-mCD20 en células B de bazo B220<sup>+</sup> de ratones TG-1<sup>+/-</sup>. La densidad de unión de anticuerpo anti-mCD20 fue un 10-64% tan alta como la unión de anticuerpo anti-CD 19 independientemente del isotipo de anticuerpo que se usó para cada anticuerpo (Fig. 8D). Aunque la expresión de mCD20 fue generalmente inferior que la expresión de hCD19, los niveles de expresión de hCD19 en ratones TG-1<sup>+/-</sup> aún fueron comparables con los niveles de expresión de hCD19 encontrados en células B humanas (Fig. 1B). Por tanto, los anticuerpos anti-CD19 redujeron de forma eficaz las células B TG-2<sup>+/+</sup> que expresaban hCD19 a densidades relativamente bajas (Fig. 1B), aunque un alto nivel de expresión de CD19 por células B TG-1<sup>+/+</sup> y TG-1<sup>+/-</sup>

ofuscó las diferencias relativas en la eficacia en anticuerpos IgG2a e IgG1. Aunque existe una correlación inversa directa entre las cantidades de células B y la densidad de expresión de hCD19 en ratones transgénicos TG-1 y TG-2, la densidad de hCD19 es un factor importante que contribuye a la reducción de células B. Los niveles de anticuerpo anti-CD19 se saturaron cuando se administraba a 250 µg/ratón (véase, también, niveles de saturación en la Fig. 12). Por tanto, los niveles de anticuerpo anti-CD19 libre estaban en exceso independientemente de la cantidad de células B.

#### 6.4. Ejemplo 3: La reducción de células B tisulares es FcγR-dependiente

Los siguientes ensayos se usaron para determinar si la reducción de células B por un anticuerpo anti-CD19 era dependiente de la expresión de FcγR. A través de un proceso de mestizaje de hCD19tg con ratones que carecen de expresión de ciertos FcγR, se generaron ratones que expresaban hCD19 y carecían de expresión de ciertos FcγR. Dichos ratones se usaron en ensayos para evaluar la capacidad de anticuerpos anti-CD19 de reducir las células B a través de vías que implican la expresión de FcγR, por ejemplo, ADCC. Por tanto, los anticuerpos anti-CD19 identificados en estos ensayos pueden usarse para diseñar por ingeniería anticuerpos anti-CD19 quiméricos, humanos o humanizados usando las técnicas descritas anteriormente en la Sección 5.1. Dichos anticuerpos pueden usarse a su vez en las composiciones y para su uso en los métodos de la invención para el tratamiento de neoplasias de células B en seres humanos.

El sistema inmune innato media la reducción de células B después de tratamiento con anticuerpo anti-CD20 a través de procesos dependientes de FcγR. Las células efectoras de ratón expresan cuatro clases diferentes de FcγR para IgG, las moléculas FcγRI de alta afinidad (CD64), y FcγRII de baja afinidad (CD32), FcγRIII (CD16), y FcγRIV. FcγRI, FcγRIII y FcγRIV son complejos hetero-oligoméricos en que las cadenas α de unión a ligando respectivo se asocian con una cadena γ común (FcRγ). La expresión de cadena FcRγ es necesaria para el ensamblaje de FcγR y para la activación por FcγR de funciones efectoras, incluyendo fagocitosis por macrófagos. Como los ratones FcRγ<sup>-/-</sup> carecen de moléculas FcγRI de alta afinidad (CD64) y FcγRIII de baja afinidad (CD16) y FcγRIV, se usaron ratones FcRγ<sup>-/-</sup> que expresan hCD19 para evaluar el papel de FcγR en la reducción de células B tisulares después de tratamiento con anticuerpo anti-CD19. La Fig. 9A muestra la reducción representativa de células B de sangre y bazo siete días después de tratamiento con anticuerpo anti-CD19 o de control de isotipo de camadas FcRγ<sup>+/-</sup> o FcRγ<sup>-/-</sup>. Los números indican el porcentaje de linfocitos B220<sup>+</sup> dentro de los marcos indicados. La Fig. 9B muestra la reducción de células B de sangre y tejido siete días después de tratamiento con anticuerpos de camadas FcRγ<sup>+/-</sup> en el día cero. Para la sangre, el valor mostrado después de tiempo cero representa datos obtenidos a 1 hora. Los gráficos de barras representan cantidades medias (±DTM) de células B B220<sup>+</sup> después de tratamiento con anticuerpo anti-CD19 (barras rellenas) o de control de isotipo (barras abiertas) de ratones (≥ 3 ratones por grupo). Se indican las diferencias significativas entre los resultados medios para ratones tratados con anticuerpo anti-CD19 o de control de; \*p<0,05, \*\*p<0,01. Los resultados presentados en las Fig. 9A y 9B demuestran que la reducción de células B después de tratamiento con anticuerpo anti-CD19 es FcRγ-dependiente. No hubo cambios significativos en las cantidades de células B en médula ósea, sangre, bazo, ganglio linfático y cavidad peritoneal en ratones FcRγ<sup>-/-</sup> después de tratamiento con anticuerpo FMC63 en comparación con camadas FcRγ<sup>-/-</sup> tratadas con un anticuerpo de control IgG2a. En contraste, el tratamiento con anticuerpo anti-CD19 redujo la mayoría de las células B en camadas FcRγ<sup>+/-</sup>. Por tanto, el tratamiento con anticuerpo anti-CD19 reduce principalmente células B de sangre y tejido a través de vías que requieren expresión de FcγRI y FcγRIII.

La Fig. 9C muestra cantidades representativas de células B en ratones hCD19TG-1<sup>+/-</sup> con reducción de monocitos. Los ratones se trataron con liposomas de clodronato en el día -2, 1 y 4, y se les dio mAb FMC63 (n=9), de control de isotipo (n=6), o CD20 (n=3) (250 µg) en el día 0. Los ratones tratados con liposomas de PBS y anticuerpo anti-CD19 FMC63 (n=3) sirvieron como controles. La reducción representativa de células B de sangre y bazo se muestra 7 días después del tratamiento con anticuerpo con el porcentaje indicado de linfocitos dentro de los marcos indicados.

La Fig. 9D muestra la reducción de células B de sangre y tejido 7 días después del tratamiento con anticuerpo como en (C). Los gráficos de barras representan cantidades medias (±DTM) de células B B220<sup>+</sup> después del tratamiento con anticuerpo de ratones (≥ 3 ratones por grupo). Para la sangre, los valores indican cantidades de células B en circulación en ratones tratados con PBS con anticuerpo anti-CD19 FMC63 (triángulos cerrados), o ratones con reducción de monocitos tratados con anticuerpo de control (círculos abiertos), anticuerpo contra CD20 (cuadrados cerrados), o anticuerpo anti-CD19 FMC63 (círculos cerrados). Se indican las diferencias significativas entre los resultados medios para ratones tratados con mAb de control de isotipo y otros grupos; \*p<0,05, \*\*p<0,01.

Los resultados presentados en la Fig. 9 muestran que la reducción de células B después de tratamiento con anticuerpo anti-CD19 es dependiente de FcRγ y monocitos. Los ratones convertidos en deficientes en macrófagos por tratamiento con clodronato encapsulado en liposomas no redujeron significativamente las células B en circulación 1 días después de tratamiento con anticuerpo anti-CD19 FMC63, anti-CD20 (MB20-11) o de control, aunque el tratamiento con anticuerpo FMC63 eliminó las células B en circulación en ratones tratados con liposomas cargados con PBS (Fig. 9C-D). Después de 4-7 días, las cantidades de células B en circulación se redujeron significativamente por tratamiento con anticuerpo FMC63 y anti-CD20, con tratamiento con anticuerpo anti-CD19 que

tiene efectos más drásticos sobre las cantidades de células B en ratones tratados con clodronato. Asimismo, el tratamiento con anticuerpo anti-CD19 y anti-CD20 disminuyó las cantidades de células B220<sup>+</sup> en médula ósea en un 55% en ratones tratados con clodronato en el día 7 respecto a camadas tratadas con anticuerpo de control, mientras que el tratamiento con anticuerpo anti-CD19 disminuyó las cantidades de células B220<sup>+</sup> en médula ósea en un 88% en ratones tratados con PBS. El tratamiento con anticuerpo anti-CD19 disminuyó las cantidades de células B de bazo en un 52% en ratones tratados con clodronato en el día 7 respecto a camadas tratadas con anticuerpo de control, mientras que el anticuerpo anti-CD20 redujo las células B mínimamente, y el tratamiento con anticuerpo anti-CD19 disminuyó las cantidades de células B de bazo en un 89% en ratones tratados con PBS. El tratamiento tanto con anticuerpo anti-CD19 como anticuerpo anti-CD20 disminuyó las cantidades de células B en ganglio linfático en un 48-53% en ratones tratados con clodronato en el día siete respecto a camadas tratadas con anticuerpo de control, mientras que el tratamiento con anticuerpo anti-CD19 disminuyó las cantidades de células B en ganglio linfático en un 93% en ratones tratados con PBS. En la sangre, el bazo y los ganglios linfáticos, el tratamiento con anticuerpo anti-CD19 fue significativamente menos eficaz en ratones tratados con clodronato que en camadas tratadas con PBS ( $p < 0,01$ ). Estos hallazgos implican a los macrófagos como células efectoras principales para la reducción de células B CD19<sup>+</sup> y CD20<sup>+</sup> *in vivo*, e indican que la terapia con anticuerpo anti-CD19 puede ser más eficaz que la terapia con anticuerpo anti-CD20 cuando están reducidas las cantidades o la función de los monocitos.

#### 6.4. Ejemplo 4: La reducción de células B inducida por anticuerpo anti-CD19 es duradera

Para evaluar la eficacia y duración de la reducción de células B, a los ratones hCD19TG se les administró una única inyección de dosis baja de 250 µg de anticuerpo anti-CD19. Las Fig. 10A-10C demuestran la duración y respuesta a dosis de la reducción de células B después de tratamiento con anticuerpo anti-CD19. La Fig. 10A muestra las cantidades de células B de sangre B220<sup>+</sup> y células T Thy-1<sup>+</sup> después de tratamiento con anticuerpo FMC63 o de control de isotipo de ratones TG-1<sup>+/-</sup> en el día cero. Los valores representan resultados medios ( $\pm$ DTM) de seis ratones en cada grupo. Los resultados demuestran que las células B en circulación se reducían durante 13 semanas con una recuperación gradual de las células B transportadas en la sangre sobre las siguientes 13 semanas. La representación de células T Thy-1<sup>+</sup> no estuvo alterada como resultado del tratamiento anti-CD19.

Las Fig. 10B-10C muestran la reducción representativa de células B tisulares en los ratones mostrados en la Fig. 10A a las 11, 16, y 30 semanas después de tratamiento con anticuerpo. Los números indican el porcentaje de linfocitos B220<sup>+</sup> dentro de los marcos indicados. Los resultados de la Fig. 10B muestran que la médula ósea, la sangre, el bazo, el ganglio linfático, y la cavidad peritoneal estaban esencialmente desprovistos de células B 11 semanas después del tratamiento con anticuerpo (se indican las diferencias significativas entre las medias de muestra; \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ ). Después de la primera aparición de células B en circulación, las cantidades de células B en circulación tardaron >10 semanas adicionales en alcanzar el intervalo normal. En la semana 16 después del tratamiento con anticuerpo, las cantidades de células B en sangre, bazo, LN y PL habían comenzado a recuperarse mientras que el compartimiento de células B en BM no fue significativamente diferente de los controles no tratados como se muestra en la Fig. 10C. En la semana 30, todos los tejidos estaban repoblados con células B a niveles comparable a los de controles normales.

La Fig. 10D muestra las respuestas a dosis de anticuerpo anti-CD19 para la reducción de células B de sangre, médula ósea y bazo. Los ratones se trataron con anticuerpos anti-CD19 en el día cero con la representación de células B tisulares evaluada en el día siete. Los resultados representan los obtenidos con tres ratones en cada grupo para cada dosis de anticuerpo. Las dosis de anticuerpo de control fueron de 250 µg. Se indican las diferencias significativas entre las medias de muestra; \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ . Una única dosis de anticuerpo FMC63 tan baja como 2 µg/ratón redujo cantidades significativas de células B en circulación, mientras que fueron necesarios 10 µg del anticuerpo HB12b para reducir significativamente las cantidades de células B en circulación (Fig. 10D). La reducción significativa de células B en médula ósea y bazo en el día siete requirió dosis de anticuerpo 5 veces mayores de 10-50 µg/ratón. Por tanto, el tratamiento con anticuerpo contra CD19 a dosis relativamente bajas puede reducir la mayoría de las células B en circulación y tejido durante periodos significativos de tiempo.

##### 6.5.1. CD19 persiste en la superficie de células B después de la administración de anticuerpo anti-CD19

Se evaluó si la internalización de CD19 influía en la reducción de células B *in vivo* comparando la expresión en superficie celular de CD19 después de tratamiento con anticuerpo HB12a, HB12b y FMC63 (250 µg).

Las Fig. 11A-11C muestran la expresión en superficie celular de CD19 y la eliminación de células B en ratones TG-1<sup>+/-</sup> tratados con anticuerpo HB12a (Fig. 11A), HB12b (Fig. 11B), FMC63 (Fig. 11C) o de control de isotipo coincidente (250 µg) *in vivo*. A tiempo cero (antes de la administración de anti-CD19), y a las 1, 4, y 24 horas después del tratamiento con anticuerpo, se recogieron y evaluaron células B de bazo para la unión de anticuerpo a CD19 (línea gruesa) y de control (línea delgada) tratando las células con anticuerpo secundario específico de isotipo *in vitro* con análisis de citometría de flujo. Las células B aisladas también se trataron *in vitro* con concentraciones saturantes de cada anticuerpo contra CD19 más anticuerpo secundario específico de isotipo *in vitro* con análisis de citometría de flujo para visualizar la expresión total en superficie celular de CD19. Cada punto temporal representa resultados con un ratón. Los resultados presentados en las Fig. 11A-11C demuestran que CD19 de superficie celular

no se elimina de la superficie celular después de la unión del anticuerpo *in vivo* y muestran que la mayoría de las células B de bazo expresaban niveles altos uniformes de hCD19 de superficie celular durante hasta 24 horas después del tratamiento con anticuerpo aunque un subconjunto de células B expresaba niveles reducidos de hCD19 a 1 hora después del tratamiento con anticuerpo FMC63 (Fig. 11C). Los resultados mostrados en las Fig. 11A-11C también demuestran que la cantidad de CD19 sobre la superficie de células B es constante, lo que indica que se mantiene la capacidad de las células B de mediar la ADCC.

Los resultados demuestran que CD19 mostraba sorprendentemente niveles de internalización inferiores de lo esperado después de la administración de anticuerpos anti-CD19. En particular, los resultados demuestran que CD19 persiste inesperadamente sobre la superficie celular después de la unión de un anticuerpo anti-CD19, por tanto, la célula B permanece accesible para la actividad ADCC. Estos resultados demuestran, en parte, porqué los anticuerpos anti-CD19 y regímenes de tratamiento de la invención son eficaces en tratar neoplasias de células B.

Las Fig. 12A-12C documentan el grado de reducción de células B y la capacidad de los anticuerpos anti-hCD19 de unirse a hCD19 y por tanto de inhibir la unión de otros anticuerpos anti-hCD19. Los resultados de la Fig. 12A demuestran que una única administración de FMC63 (250  $\mu$ g) a ratones TG-1<sup>+/-</sup> provoca reducción significativa de células B tanto de sangre como de bazo en 1 hora de administración de anticuerpo. En este experimento, se recogieron y evaluaron células de sangre y bazo para las frecuencias de células B antes de la administración de anticuerpo anti-CD19 o en diversos momentos después de ello (1, 4, o 24 horas). Las muestras de sangre se tiñeron con anti-Thy1.2 y anti-B220 para identificar las células B en el cuadrante derecho inferior. Las células de bazo se tiñeron con anticuerpos anti-IgM y anti-B220 para identificar las células B dentro del marco indicado. Cada punto temporal representa los resultados con un ratón. Inesperadamente, se eliminaron las células B de sangre más rápidamente que las células B esplénicas.

La reducción de células B descrita en la Fig. 12A sugirió que el anticuerpo administrado saturaba rápidamente los sitios disponibles de unión a anticuerpo en hCD19 en una hora de administración. Para confirmar esta observación, los ratones se trataron con anticuerpo FMC63 (anticuerpo de unión a hCD19) o de control de isotipo. En diversos momentos después de ello se tiñeron células B de sangre y bazo con el anticuerpo B4 conjugado con fluorocromo para identificar los sitios de unión a anticuerpo no ocupados en la superficie de células B mCD19<sup>+</sup> o mCD20<sup>+</sup>. Se indican las frecuencias de células dentro de los cuadrantes derecho inferior y superior. Cada punto temporal representa los resultados obtenidos de un ratón. Los resultados indican que el tratamiento con FMC63 provocó una reducción progresiva de células que albergan hCD19 sobre el curso del experimento siendo las células B sanguíneas reducidas más rápidamente que las de bazo. Las células B que permanecían en cada punto temporal pudieron identificarse por su expresión de mCD19 o mCD20, pero no se tiñeron por B4 lo que sugiere que el FMC63 administrado se unía a las células B restantes. Este hallazgo confirma la capacidad de FMC63 de unirse y reducir las células B *in vivo*. Además, FMC63 evita la unión de B4 lo que sugiere que estos anticuerpos reconocen epítomos solapantes en hCD19. Los resultados de la Fig. 12C confirman que el tratamiento con anticuerpo HB12b (250  $\mu$ g) también satura los sitios de unión a anticuerpo en hCD19 en 1 hora de administración y provoca la reducción de células B hCD19 positivas. Inesperadamente, el anticuerpo HB12b no inhibió completamente la unión del anticuerpo B4 lo que sugiere que a diferencia de FMC63, HB12b reconoce un epítomo en hCD19 que es distinto del reconocido por B4. Los resultados mostrados en las Fig. 12B-12C demuestran que la mayoría de los anticuerpos anti-CD19 inhiben la unión de la mayoría de los demás anticuerpos anti-CD19, lo que indica que la mayoría de los anticuerpos anti-CD19 se unen a regiones o epítomos similares, los mismos, o solapantes en la proteína CD19. Como alternativa, estas observaciones también puede resultar del tamaño relativamente pequeño del dominio extracelular de CD19 en comparación con el tamaño de las moléculas de anticuerpo.

#### 6.6. Ejemplo 5: El tratamiento con anticuerpo anti-CD19 anula la inmunidad humoral y la autoinmunidad

Los ensayos descritos en este ejemplo pueden usarse para determinar si un anticuerpo anti-CD19 es capaz de eliminar o atenuar las respuestas inmunes. Los anticuerpos anti-CD19 identificados en estos ensayos pueden usarse para diseñar por ingeniería anticuerpos anti-CD19 quiméricos, humanos o humanizados usando las técnicas descritas anteriormente en la Sección 5.1. Dichos anticuerpos pueden usarse, a su vez, en las composiciones y para su uso en los métodos de la invención para el tratamiento de neoplasias de células B en seres humanos.

Se evaluó el efecto de la reducción de células B inducida por anticuerpo anti-CD19 sobre los niveles séricos de anticuerpos dando a ratones hCD19TG<sup>+/-</sup> una única inyección de anticuerpo anti-CD19. La Fig. 13A muestra que el tratamiento con anticuerpo contra CD19 reduce los niveles séricos de inmunoglobulina en ratones TG-1<sup>+/-</sup>. Se trataron camadas de dos meses de edad con una única inyección de anticuerpo FMC63 (círculos cerrados) o de control (círculos abiertos) (250  $\mu$ g) en el día 0. Se determinaron los niveles de anticuerpo por ELISA, con valores medios ( $\pm$ DTM) mostrados para cada grupo de  $\geq 5$  ratones. Las diferencias entre los ratones tratados con mAb contra CD19 o de control fueron significativas; \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ . Los resultados muestran que después de 1 a 2 semanas, los niveles séricos de anticuerpo IgM, IgG2b, IgG3, e IgA estaban significativamente reducidos, y permanecían reducidos durante al menos 10 semanas (Fig. 13A). Los niveles séricos de IgG1 e IgG2a estaban significativamente por debajo de lo normal a las 6 y 4 semanas después del tratamiento.



Como los ratones hCD19TG<sup>+/-</sup> producen autoanticuerpos detectables después de 2 meses de edad (Sato et al., J. Immunol, 157:4371(1996)), se evaluó la unión de autoanticuerpos séricos a ADNmc, ADNbc e histonas. La Fig. 13B muestra que el tratamiento con anticuerpo anti-CD19 reduce los niveles de autoanticuerpos anti-ADNbc, anti-ADNmc y anti-histona después de tratamiento con anticuerpo anti-CD19. Los resultados muestran que el tratamiento con anticuerpo anti-CD19 reducía significativamente los niveles séricos de autoanticuerpos IgM después de 2 semanas y evitaba la generación de autoanticuerpos IgG de isotipo cambiado durante hasta 10 semanas (Fig. 13B). Por tanto, la reducción de células B redujo sustancialmente las respuestas agudas y a largo plazo de anticuerpos y atenuó el cambio de clase de respuestas inmunes normales y patogénicas.

Se evaluó la influencia de la reducción de células B en respuestas de anticuerpos tipo 1 (TI-1) y tipo 2 (TI-2) independientes de células T inmunizando ratones hCD19TG<sup>+/-</sup> con TNP-LPS o DNP-Ficoll (en el día cero), 7 días después de tratamiento con anticuerpo anti-CD19 (FMC63) o anticuerpo de control. No se observaron respuestas significativas de anticuerpos IgM, IgG, e IgA específicos de hapteno en ratones tratados con anticuerpo anti-CD19 inmunizados con cualquier antígeno (Fig. 14A y 14B). También se evaluaron las respuestas de anticuerpos contra el Ag dependiente de células T (TD), DNP-KLH, usando ratones tratados con anticuerpo anti-CD19 7 días antes de la inmunización (Fig. 14B). La Fig. 14C muestra que ratones inmunizados con DNP-KLH tratados con anticuerpo anti-CD19 mostraban inmunidad humoral reducida. Las camadas se trataron con anticuerpo FMC63 (círculos cerrados) o de control (círculos abiertos) (250 µg) siete días antes de las inmunizaciones primarias en el día cero, con suero obtenido en el día indicado. Para inmunizaciones con DNP-KLH, todos los ratones se expusieron con 100 µg de DNP-KLH en el día 21. Todos los valores son unidades de DO ELISA medias (±DTM) obtenidas usando sueros de cinco ratones de cada grupo. Las diferencias entre los ratones tratados con anticuerpo anti-CD19 o de control fueron significativas; \*p<0,05, \*\*p<0,01. Los resultados muestran que las camadas tratadas con anticuerpo de control generaban respuestas primarias de anticuerpo IgM 7 días después de inmunización con DNP-KLH y respuestas secundarias después de la exposición a antígeno en el día 21 (Fig. 14C). Sin embargo, no se detectaron respuestas significativas de anticuerpos IgM, IgG o IgA específicos de hapteno en ratones tratados con mAb contra CD19 inmunizados o re-expuestos con antígenos. Para evaluar el efecto de la reducción de células B sobre las respuestas secundarias de anticuerpo, los ratones también se inmunizaron con DNP-KLH y se trataron con anticuerpo anti-CD19 14 días después (flechas) (Fig. 14D). En el día 21, las respuestas de anticuerpos séricos IgM, IgG, y IgA anti-DNP habían disminuido en ratones tratados con mAb contra CD19 hasta niveles por debajo de los de ratones inmunizados tratados con mAb de control. Sin embargo, la re-exposición de ratones tratados con mAb de control con DNP-KLH en el día 21 indujo respuestas secundarias significativas de anticuerpo, mientras que los ratones tratados con mAb contra CD19 no produjeron anticuerpos anti-DNP después de re-exposición a DNP-KLH. Por tanto, la reducción de células B inducida por mAb contra CD19 redujo sustancialmente las respuestas tanto primarias como secundarias de anticuerpo y evitó el cambio de clase durante respuestas inmunes humorales.

#### 6.7. Ejemplo 6: Tratamiento con anticuerpo anti-CD19 junto con tratamiento con anticuerpo anti-CD20

Puede usarse el ensayo descrito en este documento para determinar si otras terapias de combinación o conjugado, por ejemplo, anticuerpos anti-CD19 en combinación con quimioterapia, terapia con toxinas o radioterapia, tienen efectos beneficiosos, tales como reducción aditiva o más que aditiva de células B. Los resultados de las terapias de combinación ensayadas en modelos animales pueden correlacionarse con seres humanos por medios bien conocidos en la técnica.

Los anticuerpos anti-CD20 son eficaces en reducir las células B humanas y de ratón *in vivo*. Por lo tanto, se evaluó el beneficio de tratamiento simultáneo con anticuerpos anti-CD19 (FMC63) y anti-CD20 (MB20-11) para determinar si esto potenciaba la eliminación de células B. Los ratones se trataron con dosis subóptimas de 2 µg de cada anticuerpo individualmente, o una combinación de ambos anticuerpos a 1 µg, o con dosis combinadas de 2 µg. La Fig. 15 muestra los resultados de ratones TG-1<sup>+/-</sup> tratados con anticuerpos de control (250 µg), FMC63 (CD19, 2 µg), MB20-11 (CD20, 2 µg), FMC63+MB20-11 (1 µg cada uno), o FMC63+MB20-11 (2 µg cada uno) en el día cero. Se midieron las cantidades de células B en sangre a tiempo cero, una hora, y en los días uno, cuatro y siete. Las cantidades de células B tisulares se determinaron en el día siete. Los valores representan la media (±DTM) de grupos de tres ratones. Los resultados mostrados en la Fig. 15 demuestran que las terapias simultáneas con anticuerpo anti-CD 19 y anti-CD20 son beneficiosas. La reducción de células B en ratones tratados con una combinación de ambos anticuerpos a 1 µg fue intermedia o similar a la reducción observada después del tratamiento de los ratones con 2 µg de cada anticuerpo individual (Fig. 15). Sin embargo, el tratamiento simultáneo de los ratones con ambos anticuerpos a 2 µg condujo a significativamente más reducción de células B que lo observado con cualquier anticuerpo solo. Por tanto, las terapias combinadas de anticuerpo anti-CD 19 y anti-CD20 tuvieron efectos beneficiosos que potenciaron la reducción de células B. Esto probablemente resulta de la acumulación de moléculas de anticuerpo más terapéuticamente eficaces sobre la superficie de células B individuales.

#### 6.8. Ejemplo 7: La administración subcutánea (s.c.) de anticuerpo anti-CD19 es terapéuticamente eficaz

Puede usarse el ensayo descrito en este documento para determinar si una vía subcutánea de administración de un anticuerpo anti-CD19 puede reducir de forma eficaz las células B. Los resultados de la eficacia de diferentes vías de

administración ensayadas en modelos animales pueden correlacionarse con seres humanos por medios bien conocidos en la técnica.

Como el anticuerpo anti-CD19 dado i.v. reduce de forma eficaz las células B en circulación y tejido, se evaluó si el anticuerpo anti-CD19 dado s.c. o i.p. reducía las células B a un grado equivalente. Se trataron ratones de tipo silvestre con el anticuerpo FMC63 a 250 µg por vía subcutánea (s.c.), intraperitoneal (i.p.) o i.v. Los valores representan las cantidades medias ( $\pm$ DTM) de células B de sangre (por ml), médula ósea, bazo, ganglio linfático, y cavidad peritoneal B220+ en el día siete ( $n \geq 3$ ) evaluado por citometría de flujo. Se indican las diferencias significativas entre los resultados medios para cada grupo de ratones; \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  en comparación con el control. Los resultados en la Fig. 16 demuestran que la administración subcutánea (s.c.), intraperitoneal (i.p.) e i.v. de anticuerpo contra CD19 reduce de forma eficaz las células B en circulación y tejido *in vivo*. La inmensa mayoría de las células B en circulación y tejido se redujeron en ratones a los que se dio anticuerpos anti-CD19 como dosis de 250 µg i.v., i.p., o s.c. (Fig. 16). Inesperadamente, dar el anticuerpo anti-CD19 i.p. no redujo las células B peritoneales significativamente mejor que el tratamiento i.v. Por consiguiente, puede usarse un anticuerpo anti-CD19 para reducir de forma eficaz células B tanto en circulación como en tejido cuando se da como inyecciones s.c. de  $\leq 64$  mg. Como los anticuerpos anti-CD19 son eficaces por debajo de dosis i.v. de 10 µg (Fig. 10D) probablemente son eficaces dosis s.c. incluso inferiores de anticuerpo.

#### 6.9. Ejemplo 8: El tratamiento con anticuerpo anti-CD19 anula el crecimiento tumoral *in vivo*

El linfoma de Burkitt, una neoplasia de células B en seres humanos, se caracteriza por translocaciones del proto-oncogén *c-myc* a regiones promotoras del gen de Ig, que conducen a sobre-expresión aberrante de *c-Myc*. Asimismo, los ratones transgénicos E $\mu$ -*cMyc* (*cMycTG*), en que el proto-oncogén *c-myc* está bajo el control del potenciador de la cadena pesada de Ig, desarrollan linfomas agresivos derivados de células B en una edad temprana, tienen una tasa de mortalidad de aproximadamente el 90% a las 20 semanas de edad, y tienen una edad media de supervivencia de aproximadamente 12 semanas (Harris et al., J. Exp. Med. 167:353 (1988) y Adams et al., Nature 318:533(1985)). Los tumores de ratones *c-MycTG* no están restringidos a una fase de desarrollo específica de células B, sino que se presentan de forma predominante con reordenamientos génicos de Ig y fenotipos característicos de células pre-B o B inmaduras (Adams et al., Nature 318:533(1985)). Para evaluar la eficacia de la inmunoterapia dirigida a CD19 *in vivo*, se cruzaron ratones *hCD19TG-1<sup>+/+</sup>* y *cMycTG* para generar ratones *hCD19TG-1<sup>+/+</sup> cMycTG<sup>+/+</sup>* que desarrollaron linfomas agresivos derivados de células B a una edad temprana. Se aislaron las células tumorales derivadas de un ratón, se expandieron *in vitro*, y se caracterizaron fenotípicamente como linfoblastos *hCD19<sup>+</sup>* y *CD19<sup>+</sup>* de ratón *CD20<sup>-</sup> CD43<sup>-</sup> IgM<sup>+</sup> IgD<sup>-</sup> B220<sup>+</sup>*, que son típicos de los tumores de células pre-B/B inmaduras que se desarrollan en ratones *c-mycTG<sup>+/+</sup>* (Harris et al., J. Exp. Med. 167:353 (1988) y Adams et al., Nature 318:533 (1985)). Se trasplantaron i.v. células tumorales ( $10^5$ ) de ratones *hCD19TG-1<sup>+/+</sup> c-mycTG<sup>+</sup>* en 20 ratones *Rag<sup>-/-</sup>* en el día 0. Se trataron cantidades iguales de ratones seleccionados aleatoriamente con anticuerpo FMC63 (círculos rellenos) o de control (círculos abiertos) (250 µg) en los días 1 y 7. La Fig. 17A muestra las cantidades de células tumorales en circulación ( $\pm$ DTM) cuantificadas por citometría de flujo sobre un periodo de 6 semanas y la Fig. 17B muestra el porcentaje de supervivencia de los ratones sobre un periodo de 7 semanas. Cada valor indica el porcentaje de ratones viable en cada día que se examinaron. Los resultados de la Fig. 17 demuestran que el tratamiento con anticuerpo anti-CD19 previene el crecimiento de linfoma *hCD19<sup>+</sup>* *in vivo*. El trasplante de estas células tumorales en veinte ratones *Rag<sup>-/-</sup>* provocó la aparición de linfoblastos de ratón *CD19<sup>+</sup>* y *B220<sup>+</sup>* en circulación a las 2 semanas en diez receptores seleccionados aleatoriamente que se trataron con un *mAb* de control, con muerte a las 3,5 semanas. Por el contrario, el tratamiento de diez ratones con anticuerpo anti-CD19 (día 1 y 7) después de trasplante del tumor evitó la aparición de células tumorales en circulación en los 10 receptores durante hasta 7 semanas. Un ratón tratado con anticuerpo anti-CD19 murió durante la recogida de sangre, pero nunca presentó células tumorales en circulación. Por tanto, el tratamiento con anticuerpo anti-CD19 puede ofrecer una terapia eficaz para tratar a pacientes con neoplasias de linaje de células B, especialmente aquellos con tumores que no expresan CD20 o expresan CD20 a bajos niveles.

#### LISTADO DE SECUENCIAS

<110> MedImmune, Inc.

<120> ANTICUERPOS ANTI-CD19 Y USOS EN ONCOLOGÍA

<130> 11605-005-228

<140>

<141>

<150> 60/653.587

<151> 15-02-2005

<150> 60/702.063

<151> 22-07-2005

<160> 21

<170> FastSEQ para Windows Versión 4.0

<210> 1

<211> 373

<212> ADN

<213> Murino

<220>

<223> Secuencia de unión de cadena pesada VH-D-JH del anticuerpo anti-CD19 (humano) de ratón HB12a

<400> 1

```
gaattcgagg tgcagctgca ggagtctgga cctgagctgg taaagcctgg ggcttcagtg 60
aagatgtcct gcaaggcttc tggatacaca ttcactagct atgttatgca ctgggtgaag 120
cagaagcctg ggcagggcct tgagtggatt ggatatttta atccttaca tgatgttact 180
gattactatg agaagttcaa aggcaaggcc aactgactt cagacaaatc ctccagcaca 240
gectacatgg cgctcagcag cctgacctct gaggactctg cggctctatta ctgtgcaaga 300
gggacctatt actacggtag tagctacccc ttgactact ggggccaagg caccactctc 360
acagtctcct cag 373
```

<210> 2

<211> 124

<212> PRT

<213> Murino

<220>

<223> Secuencia de unión de cadena pesada VH-D-JH del anticuerpo anti-CD19 (humano) de ratón HB12a

<400> 2

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

<210> 3

<211> 370

<212> ADN

<213> Murino

<220>

<223> Secuencia de unión de cadena pesada VH-D-JH del anticuerpo anti-CD19 (humano) de ratón HB12b

<400> 3

```
gaattcgagg tgcagctgca ggagtctgga cctgagctgg tgaagcctgg ggcttcagtg 60
aagatttcct gcaaaagcttc tggctacgca ttcagtagct cttggatgaa ctgggtgata 120
cagaggcctg gacagggtct tgagtggatt ggacggattt atcctggaga tggagatact 180
aactacaatg ggaagttcaa gggcaaggcc aactgactg cagacaaatc ctccagtaca 240
gectacatgc agctcagcag cctgacctct gtggactctg cggctctattt ctgtgcaaga 300
tcaggattta ttactacggt tttagacttt gactactggg gccacggcac cactctcaca 360
gtctctctcag 370
```

<210> 4  
 <211> 123  
 <212> PRT  
 <213> Murino

<220>  
 <223> Secuencia de unión de cadena pesada VH-D-JH del anticuerpo anti-CD19 (humano) de ratón HB12b

<400> 4

```

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

<210> 5  
 <211> 124  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Secuencia consenso de VH-D-JH de unión de cadena pesada del anticuerpo anti-CD19 (humano) de ratón

<400> 5

```

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

<210> 6  
 <211> 121  
 <212> PRT  
 <213> Murino

<220>  
 <223> VH-D-JH de unión de cadena pesada del anticuerpo anti-CD19 (humano) de ratón 4G7

<400> 6

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

<210> 7

<211> 124

<212> PRT

<213> Murino

<220>

<223> VH-D-JH de unión de cadena pesada del anticuerpo anti-CD19 (humano) de ratón HD37

<400> 7

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

<210> 8

<211> 124

<212> PRT

<213> Murino

<220>

<223> VH-D-JH de unión de cadena pesada del anticuerpo anti-CD19 (humano) de ratón B43

<400> 8

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

<210> 9

<211> 121

<212> PRT

<213> Murino

<220>

<223> VH-D-JH de unión de cadena pesada del anticuerpo anti-CD19 (humano) de ratón FMC63

<400> 9

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

<210> 10

<211> 114

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia consenso de V-kappa de cadena ligera del anticuerpo anti-CD19 (humano) de ratón

<400> 10

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

<210> 11  
 <211> 112  
 <212> PRT  
 <213> Murino

<220>  
 <223> Cadena ligera V-kappa del anticuerpo anti-CD19 (humano) de ratón HD37

<400> 11

```

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

<210> 12  
 <211> 114  
 <212> PRT  
 <213> Murino

<220>  
 <223> Cadena ligera V-kappa del anticuerpo anti-CD19 (humano) de ratón B43

<400> 12

```

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

Arg Ser

<210> 13  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> Murino

<220>  
 <223> Cadena ligera V-kappa del anticuerpo anti-CD19 (humano) de ratón FMC63

<400> 13

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

<210> 14  
 <211> 115  
 <212> PRT  
 <213> Murino

<220>  
 <223> Cadena ligera V-kappa del anticuerpo anti-CD19 (humano) de ratón 4G7

<400> 14

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

<210> 15  
 <211> 494  
 <212> ADN  
 <213> Murino

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (57)..(494)  
 <223> Cadena ligera del anticuerpo anti-CD19 (humano) de ratón HB12a

<400> 15



```

catggactga aggagtagaa aactgatcac tctcctatgt ttatttcctc aaaatg atg 59
                                     Met
                                     1

agt cct gcc cag ttc ctg ttt ctg tta gtg ctc tgg att cag gaa acc 107
Ser Pro Ala Gln Phe Leu Phe Leu Leu Val Leu Trp Ile Gln Glu Thr
      5                      10                      15

aac ggt gat gtt ggg atg acc cag act cca ctc act ttg tgg gtc acc 155
Asn Gly Asp Val Gly Met Thr Gln Thr Pro Leu Thr Leu Ser Val Thr
      20                      25                      30

att gga caa cca gcc tct ttc tct tgc aag tca agt cag agc ctc tta 203
Ile Gly Gln Pro Ala Ser Phe Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu
      35                      40                      45

tat agt aat gga aaa acc tat ttg aat tgg tta tta cag agg cca ggc 251
Tyr Ser Asn Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Arg Pro Gly
      50                      55                      60                      65

cag tct cca aag cgc cta atc cat ctg gtg tct aaa ctg gac tct gga 299
Gln Ser Pro Lys Arg Leu Ile His Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly
      70                      75                      80

gtc cct gac agg ttc act ggc agt gga tca gga aca gat ttt aca ctg 347
Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu
      85                      90                      95

aaa atc ggc aga gtg gag gct gag gat ttg gga gtt tat tac tgc gtg 395
Lys Ile Gly Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Val
      100                      105                      110

caa ggt aca cat ttt ccg tac acg ttc gga ggg ggg acc aaa cta gaa 443
Gln Gly Thr His Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu
      115                      120                      125

ata aaa cgg gct gat gct gca cca act gta tcc atc ttc cca cca tcc 491
Ile Lys Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser
      130                      135                      140                      145

agt
Ser
                                     494

```

5 <210> 16  
 <211> 146  
 <212> PRT  
 <213> Murino

10 <220>  
 <223> Cadena ligera prevista del anticuerpo anti-CD19 humano de ratón HB12a

<400> 16

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

<210> 17

<211> 485

5 <212> ADN

<213> Murino

<220>

<221> CDS

10 <222> (48)..(485)

<223> Cadena ligera del anticuerpo anti-CD19 (humano) de ratón HB12b

<400> 17

```

catggactga aggagtagaa aagcattctc tcttcagtt ctcagag atg gag aaa 56
                                     Met Glu Lys
                                     1

gac aca ctc ctg cta tgg gtc ctg ctt ctc tgg gtt cca ggt tcc aca 104
Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro Gly Ser Thr
   5                10                15

ggt gac att gtg ctg acg cag tct cca acc tct ttg gct gtg tct cta 152
Gly Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Thr Ser Leu Ala Val Ser Leu
  20                25                30                35

ggg cag agg gcc acc atc tcc tgc aga gcc agc gaa agt gtt gat act 200
Gly Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Thr
                40                45                50

ttt ggc att agt ttt atg aac tgg ttc caa cag aaa cca gga cag cca 248
Phe Gly Ile Ser Phe Met Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro
                55                60                65

ccc aaa ctc ctc atc cat gct gca tcc aat caa gga tcc ggg gtc cct 296
Pro Lys Leu Leu Ile His Ala Ala Ser Asn Gln Gly Ser Gly Val Pro
                70                75                80

gcc agg ttt agt ggt agt ggg tct ggg acg gac ttc agc ctc aac atc 344
Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Ser Leu Asn Ile
   85                90                95

cat cct atg gag gag gat gat agt gca atg tat ttc tgt cag caa agt 392
His Pro Met Glu Glu Asp Asp Ser Ala Met Tyr Phe Cys Gln Gln Ser
  100                105                110                115

aag gag gtt cca ttc acg ttc ggc tgc ggg aca aag ttg gaa ata aaa 440
Lys Glu Val Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
                120                125                130

cgg gct gat gct gca cca act gta tcc atc ttc cca cca tcc agt 485
Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser
                135                140                145

```

<210> 18  
 <211> 146  
 <212> PRT  
 <213> Murino

<220>  
 <223> Cadena ligera del anticuerpo anti-CD19 (humano) de ratón HB12b

<400> 18

```

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

```

## ES 2 550 621 T3

5 <210> 19  
 <211> 31  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Cebador promiscuo de VH 5' con sentido (MsVHE)  
 10 <400> 19  
 gggaattcga ggtgcagctg caggagtctg g 31  
 <210> 20  
 <211> 31  
 <212> ADN  
 15 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Cebador antisentido complementario a la región codificante C (cebador C 1)  
 20 <400> 20  
 gaggctcagg tcactgtcac tggctcaggg a 31  
 <210> 21  
 <211> 27  
 25 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Cebador 3' antisentido específico de la región constante  
 30 <400> 21  
 gactgaggca cctccagatg ttaactg 27

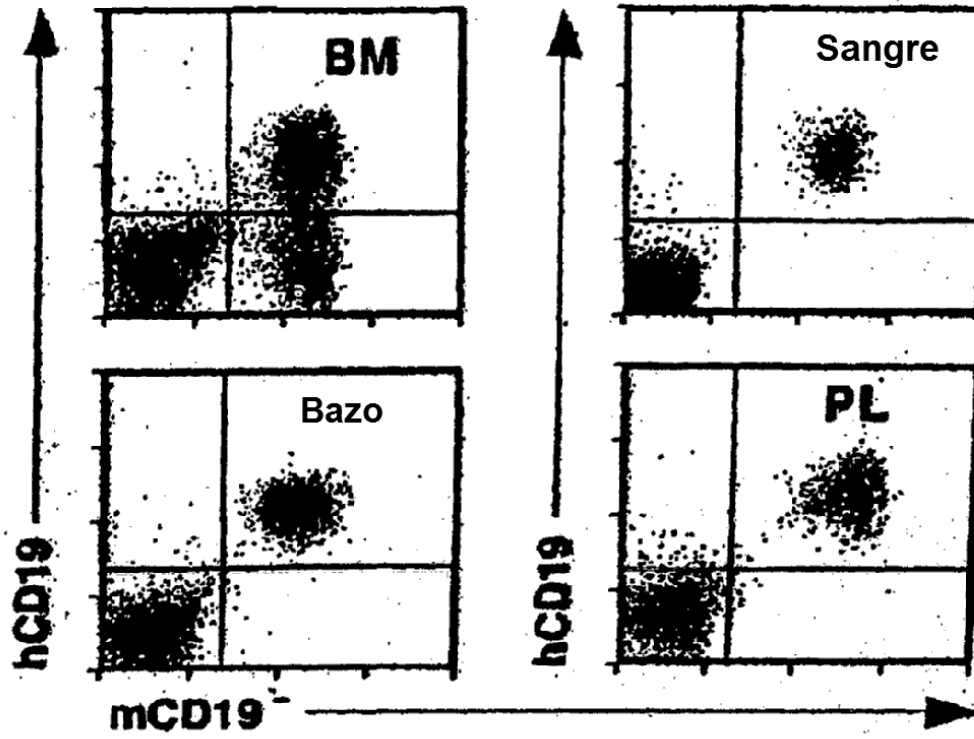
## REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo monoclonal anti-CD19 quimerizado, o humanizado que (a) es del isotipo humano IgG1 o IgG3, o (b) media la citotoxicidad humana celular dependiente de anticuerpo (ADCC), en un vehículo farmacéuticamente aceptable, en la que el anticuerpo comprende las secuencias expuestas como los aminoácidos 33 a 37, los aminoácidos 51 a 68 y los aminoácidos 101 a 115 de la SEC ID N° 2 y las secuencias expuestas como los aminoácidos 43 a 58, los aminoácidos 74 a 80 y los aminoácidos 113 a 121 de la SEC ID N° 16, o las secuencias expuestas como los aminoácidos 33 a 37, los aminoácidos 51 a 68 y los aminoácidos 101 a 114 de la SEC ID N° 4 y las secuencias expuestas como los aminoácidos 44 a 58, los aminoácidos 74 a 80 y los aminoácidos 113 a 121 de la SEC ID N° 18, en la que se introduce una sustitución de aminoácido en una o más de dichas secuencias y en la que el anticuerpo es capaz de reducir las células B que expresan CD19 de la médula ósea.
2. La composición farmacéutica de la reivindicación 1, en la que una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo monoclonal anti-CD19 quimerizado del isotipo humano IgG1 o IgG3 es menor de aproximadamente 1 mg/kg de peso corporal del paciente.
3. La composición farmacéutica de la reivindicación 1, en la que una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo monoclonal anti-CD19 quimerizado del isotipo humano IgG1 o IgG3 es mayor de aproximadamente 2 mg/kg de peso corporal del paciente.
4. La composición de la reivindicación 1, en la que el anticuerpo anti-CD19 que media la ADCC es del isotipo humano IgG1, o IgG3.
5. La composición farmacéutica de cualquier reivindicación precedente, en la que el anticuerpo anti-CD19 tiene una vida media de al menos 4 a 7 días.
6. La composición farmacéutica de cualquier reivindicación precedente, en la que la composición comprende una dosis de 1500 mg/m<sup>2</sup> o menos del anticuerpo anti-CD19 y en la que el anticuerpo anti-CD19 se administra por vía parenteral, intraperitoneal, intramuscular, intravenosa o subcutánea.
7. La composición farmacéutica de la reivindicación 6, en la que la composición comprende una dosis de 375 mg/m<sup>2</sup> o menos del anticuerpo anti-CD19 y en la que el anticuerpo anti-CD19 se administra por vía parenteral, intraperitoneal, intramuscular, intravenosa o subcutánea.
8. La composición farmacéutica de la reivindicación 7, en la que la composición comprende una dosis de 1,5 mg/m<sup>2</sup> o menos del anticuerpo anti-CD19 y en la que el anticuerpo anti-CD19 se administra por vía parenteral, intraperitoneal, intramuscular, intravenosa o subcutánea.
9. La composición farmacéutica de la reivindicación 8, en la que la composición comprende una dosis de 0,5 ug/m<sup>2</sup> o menos del anticuerpo anti-CD19 y en la que el anticuerpo anti-CD19 se administra por vía parenteral, intraperitoneal, intramuscular, intravenosa o subcutánea.
10. La composición farmacéutica de cualquier reivindicación precedente, en la que el anticuerpo anti-CD19 está marcado de forma detectable, es un anticuerpo desnudo, está conjugado con un compuesto terapéutico, está conjugado con un agente citotóxico, o está conjugado con un agente de diagnóstico.
11. La composición farmacéutica de cualquier reivindicación precedente, en la que el anticuerpo anti-CD19 es biespecífico.
12. La composición farmacéutica de la reivindicación 11, en la que el anticuerpo anti-CD19 biespecífico tiene especificidad por la unión a células efectoras.
13. La composición farmacéutica de cualquier reivindicación precedente, en la que la función ADCC del anticuerpo anti-CD19 se evalúa midiendo la capacidad del anticuerpo anti-CD19 de mediar la lisis de células diana por células efectoras *in vitro*.
14. La composición farmacéutica de cualquier reivindicación precedente, en la que el anticuerpo anti-CD19 comprende una cadena pesada que consiste en una secuencia que tiene al menos un 90% de identidad con la SEC ID N° 2 o SEC ID N° 4.
15. La composición farmacéutica de cualquier reivindicación precedente, en la que el anticuerpo anti-CD19 comprende la cadena ligera que consiste en una secuencia que tiene al menos un 95% de identidad con la SEC ID N° 16 o SEC ID N° 18.

16. Un anticuerpo monoclonal anti-CD19 humanizado que (a) es del isotipo humano IgG1 o IgG3, o (b) media la citotoxicidad humana celular dependiente de anticuerpo (ADCC), en el que el anticuerpo comprende las secuencias expuestas como los aminoácidos 33 a 37, 51 a 68 y 101 a 115 de la SEC ID N° 2 y las secuencias expuestas como los aminoácidos 43 a 58, 74 a 80 y 113 a 121 de la SEC ID N° 16, o las secuencias expuestas como los aminoácidos 33 a 37, 51 a 68 y 101 a 114 de la SEC ID N° 4 y las secuencias expuestas como los aminoácidos 44 a 58, 74 a 80 y 113 a 121 de la SEC ID N° 18, en el que se introduce una sustitución de aminoácido en una o más de dichas secuencias, para su uso en el tratamiento de una neoplasia de células B en un paciente humano, en el que el anticuerpo es capaz de reducir las células B que expresan CD19 de la médula ósea.
17. El anticuerpo para su uso de acuerdo con la reivindicación 16, en el que el anticuerpo anti-CD19 comprende una cadena pesada que consiste en una secuencia que tiene al menos un 90% de identidad con la SEC ID N° 2 o SEC ID N° 4.
18. El anticuerpo para su uso de acuerdo con la reivindicación 16 o 17, en el que el anticuerpo comprende la cadena ligera que consiste en una secuencia que tiene al menos un 95% de identidad con la SEC ID N° 16 o SEC ID N° 18.
19. El anticuerpo para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 16 a 18, en el que el anticuerpo es capaz de reducir las células B en circulación.
20. El anticuerpo para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 16 a 19, en el que la neoplasia de células B es leucemia linfoblástica aguda, linfoma de células del manto, leucemia linfoblástica aguda de células pre-B, o linfoma linfoblástico de células B precursoras.
21. El anticuerpo para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 16 a 20, en el que el anticuerpo anti-CD19 que media la ADCC es del isotipo humano IgG1 o IgG3.
22. El anticuerpo para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 16 a 20, en el que la neoplasia de células B se trata antes de la administración del anticuerpo anti-CD19.
23. El anticuerpo para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 16 a 20, en el que la neoplasia de células B se trata con una terapia diferente a una terapia con anticuerpo anti-CD19 posterior a la administración del anticuerpo anti-CD19.
24. El anticuerpo para su uso de acuerdo con la reivindicación 22 o reivindicación 23, en el que el tratamiento para la neoplasia es quimioterapia, radioinmunoterapia, terapia con toxinas, terapia con enzimas activadoras de profármacos, terapia de anticuerpos, terapia de potenciación de monocitos o macrófagos, terapia inmunorreguladora, terapia con estatina de neovascularización tumoral, terapia con caliceamicina; terapia quirúrgica, o cualquier combinación de las mismas.
25. Un anticuerpo monoclonal anti-CD19 que media la citotoxicidad humana celular dependiente de anticuerpo (ADCC) que comprende las secuencias expuestas como los aminoácidos 33 a 37, los aminoácidos 51 a 68 y los aminoácidos 101 a 115 de la SEC ID N° 2 y las secuencias expuestas como los aminoácidos 43 a 58, los aminoácidos 74 a 80 y los aminoácidos 113 a 121 de la SEC ID N° 16, o las secuencias expuestas como los aminoácidos 33 a 37, los aminoácidos 51 a 68 y los aminoácidos 101 a 114 de la SEC ID N° 4 y las secuencias expuestas como los aminoácidos 44 a 58, los aminoácidos 74 a 80 y los aminoácidos 113 a 121 de la SEC ID N° 18, en el que se introduce una sustitución de aminoácido en una o más de dichas secuencias y en el que el anticuerpo es capaz de reducir las células B que expresan CD19 de la médula ósea para su uso en un régimen para (a) tratar una enfermedad en fase temprana resultante de una neoplasia de células B en un paciente humano, o (b) tratar una neoplasia de células B en un sujeto humano en el que el sujeto humano no ha recibido previamente tratamiento para la neoplasia, la neoplasia de células B es CD19 positiva o el ser humano tiene un recuento de monocitos de al menos 1 por dl, en el que el régimen administrado reduce las células B en circulación.
26. El anticuerpo para su uso de acuerdo con la reivindicación 25, en el que el anticuerpo comprende una cadena pesada que consiste en una secuencia que tiene al menos un 90% de identidad con la SEC ID N° 2 o SEC ID N° 4.
27. El anticuerpo para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 25 a 26, en el que el anticuerpo anti-CD19 comprende la cadena ligera que consiste en una secuencia que tiene al menos un 95% de identidad con la SEC ID N° 16 o SEC ID N° 18.
28. El anticuerpo para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 25 a 27, en el que posteriormente se administra una terapia diferente a una terapia con anticuerpo anti-CD19 al ser humano.
29. El anticuerpo para su uso de acuerdo con la reivindicación 28, en el que la terapia es quimioterapia, radioterapia, terapia basada en toxinas, terapia basada en agentes radioquímicos o terapia quirúrgica.

30. El anticuerpo para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 25 a 29, en el que el régimen comprende la administración del anticuerpo como un único agente terapéutico, en combinación con otro agente terapéutico, o en combinación con un agente que reduce los efectos secundarios tóxicos.
- 5 31. El anticuerpo para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 25 a 30, en el que el régimen comprende la administración repetida del anticuerpo.
32. El anticuerpo para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 25 a 30, en el que el anticuerpo anti-CD19 tiene una vida media que es de al menos 4 a 7 días.
- 10 33. El anticuerpo para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 25 a 32, en el que el anticuerpo anti-CD19 es un anticuerpo de isotipo humano IgG1 o IgG3.
- 15 34. El anticuerpo para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 25 a 33, en el que el anticuerpo anti-CD19 es un anticuerpo humanizado.
35. El anticuerpo para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 16 a 34, en el que la neoplasia de células B es un linfoma no Hodgkin de subtipo de células B (NHL) incluyendo NHL de grado bajo/folicular, NHL linfocítico pequeño (SL), NHL de grado intermedio/folicular, NHL difuso de grado intermedio, NHL inmunoblástico de grado alto, NHL linfoblástico de grado alto, NHL de células no escindidas pequeñas de grado alto y NHL de enfermedad voluminosa; linfoma de Burkitt; mieloma múltiple; leucemia linfoblástica aguda de pre-B y otras neoplasias que derivan precursores tempranos de células B; leucemia linfocítica aguda común; leucemia linfocítica crónica; leucemia de células capilares; leucemia linfoblástica nula-aguda; macroglobulinemia de Waldenstrom; y leucemia pro-linfocítica; enfermedad de cadena ligera; plasmacitoma; mieloma osteosclerótico; leucemia de células plasmáticas; gammapatía monoclonal de importancia indeterminada (MGUS); mieloma múltiple asintomático (SMM); mieloma múltiple indolente (IMM); o linfoma de Hodgkin.
- 20 36. El anticuerpo para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 25 a 35, en el que el régimen comprende adicionalmente administrar un compuesto que potencia la función de monocitos o macrófagos.
- 30 37. El anticuerpo para su uso de acuerdo con la reivindicación 28, en el que el ser humano está inmunocomprometido.
- 35 38. El anticuerpo para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 16 a 35, en el que el anticuerpo anti-CD19 se administra por vía parenteral, intraperitoneal, o intramuscular.
39. El anticuerpo para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 16 a 35, en el que el anticuerpo anti-CD19 se administra por vía intravenosa o subcutánea.
- 40 40. El anticuerpo para su uso de acuerdo con la reivindicación 39, en el que el anticuerpo anti-CD19 se administra por vía subcutánea en una dosis de 37,5 mg/m<sup>2</sup> o menos.
- 45 41. El anticuerpo para su uso de acuerdo con la reivindicación 40, en el que el anticuerpo anti-CD19 se administra en una dosis de 1,5 mg/m<sup>2</sup> o menos.
42. El anticuerpo para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 25 a 41, en el que el régimen comprende más de una administración del anticuerpo anti-CD19 al ser humano.
- 50 43. El anticuerpo para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 25 a 42, en el que el régimen comprende adicionalmente administrar un anticuerpo anti-CD20, un anticuerpo anti-CD22, un anticuerpo anti-CD52, o cualquier combinación de los mismos.

**FIG. 1A**



**FIG. 1B**

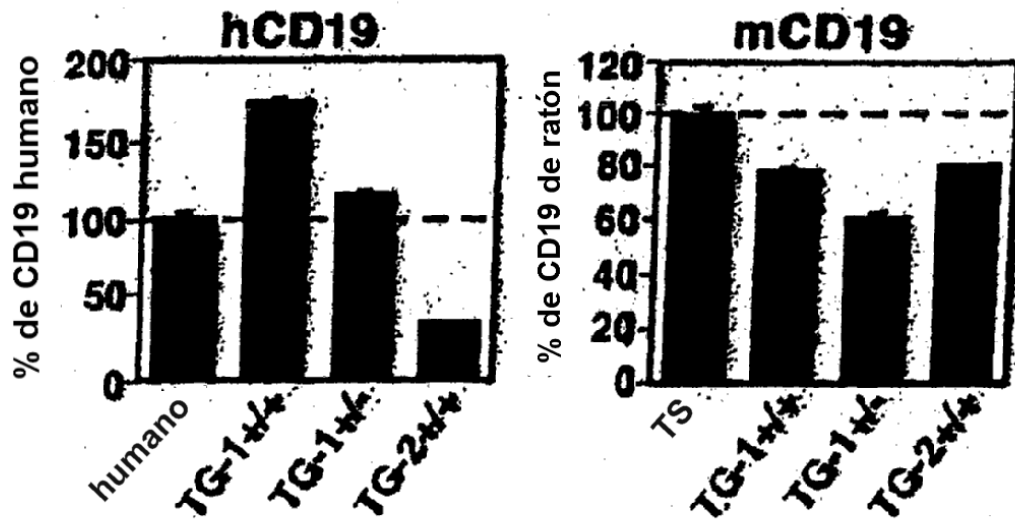




FIG. 1C

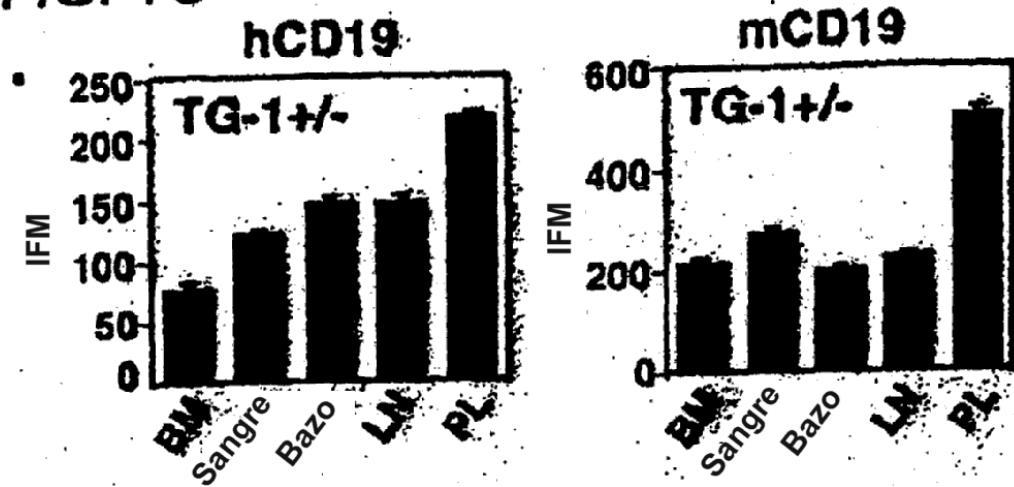
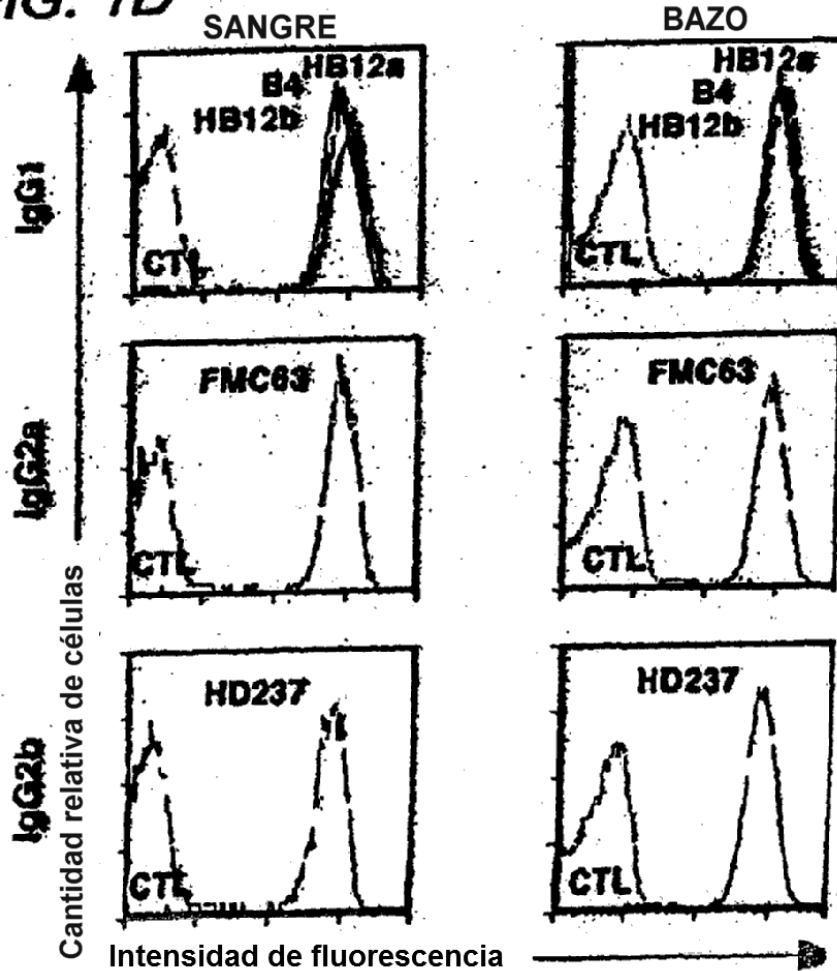
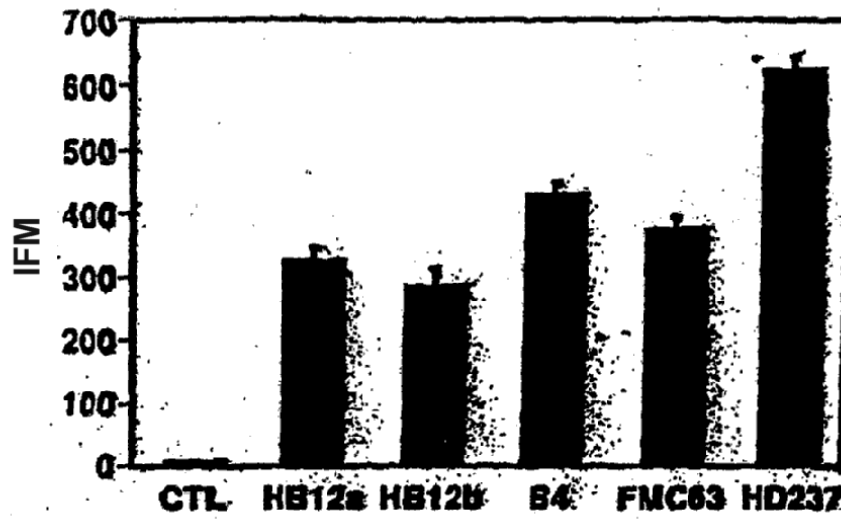


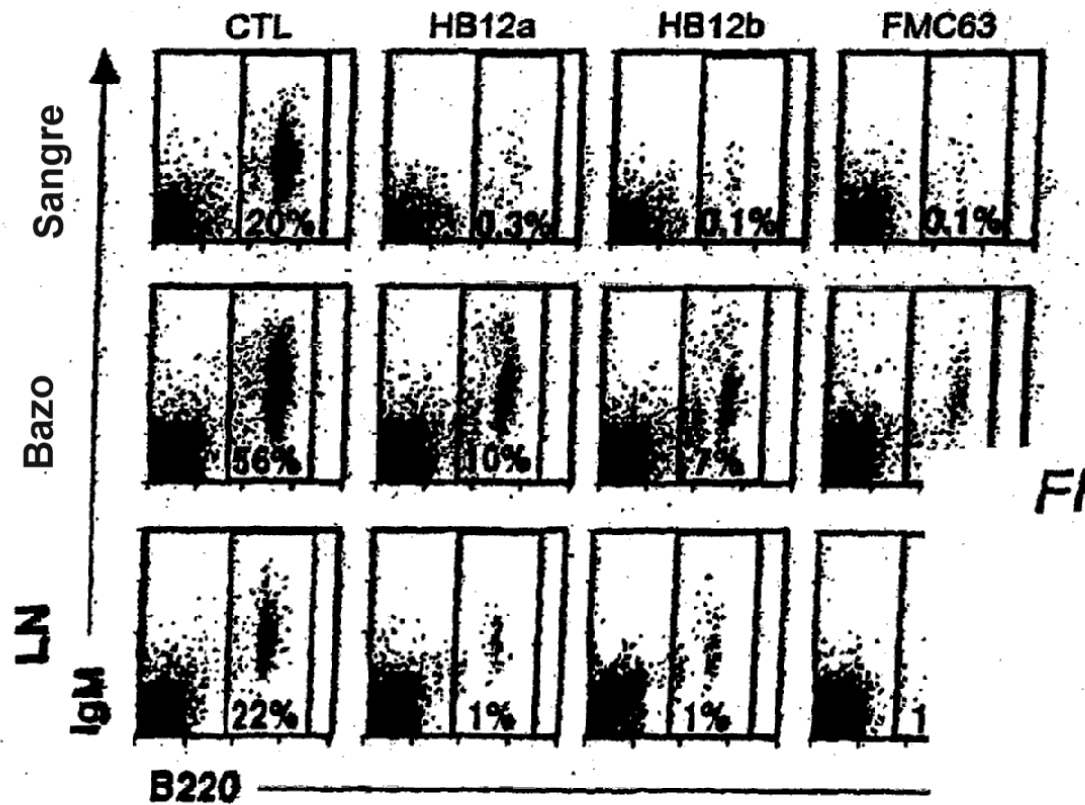
FIG. 1D



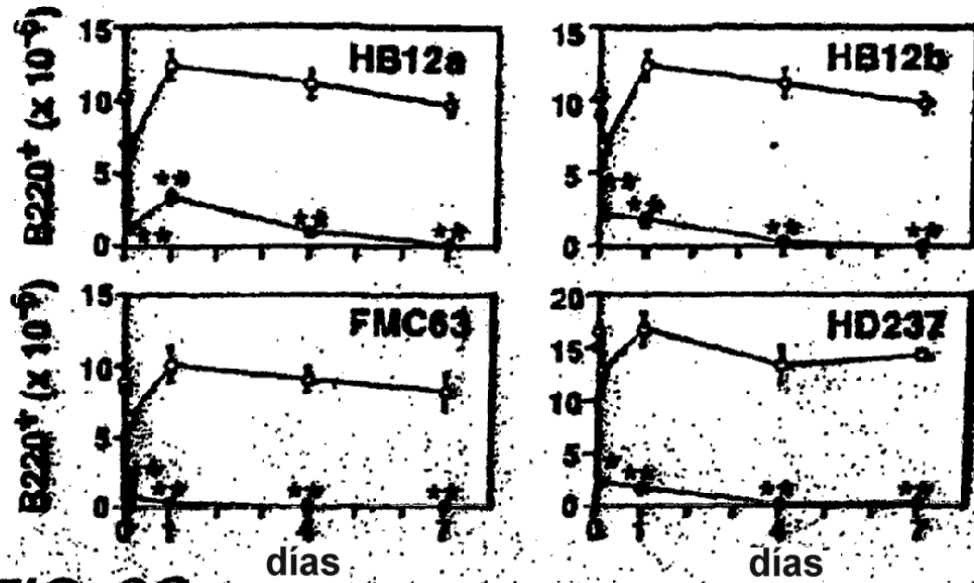
**FIG. 1E**



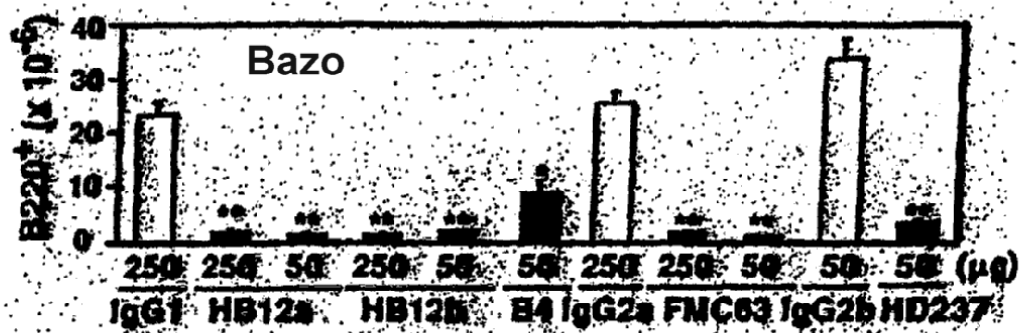
**FIG. 2A**



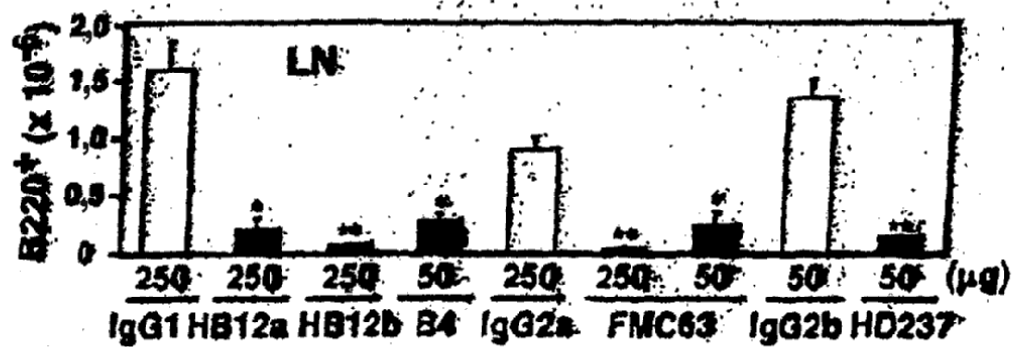
**FIG. 2B**



**FIG. 2C**



**FIG. 2D**



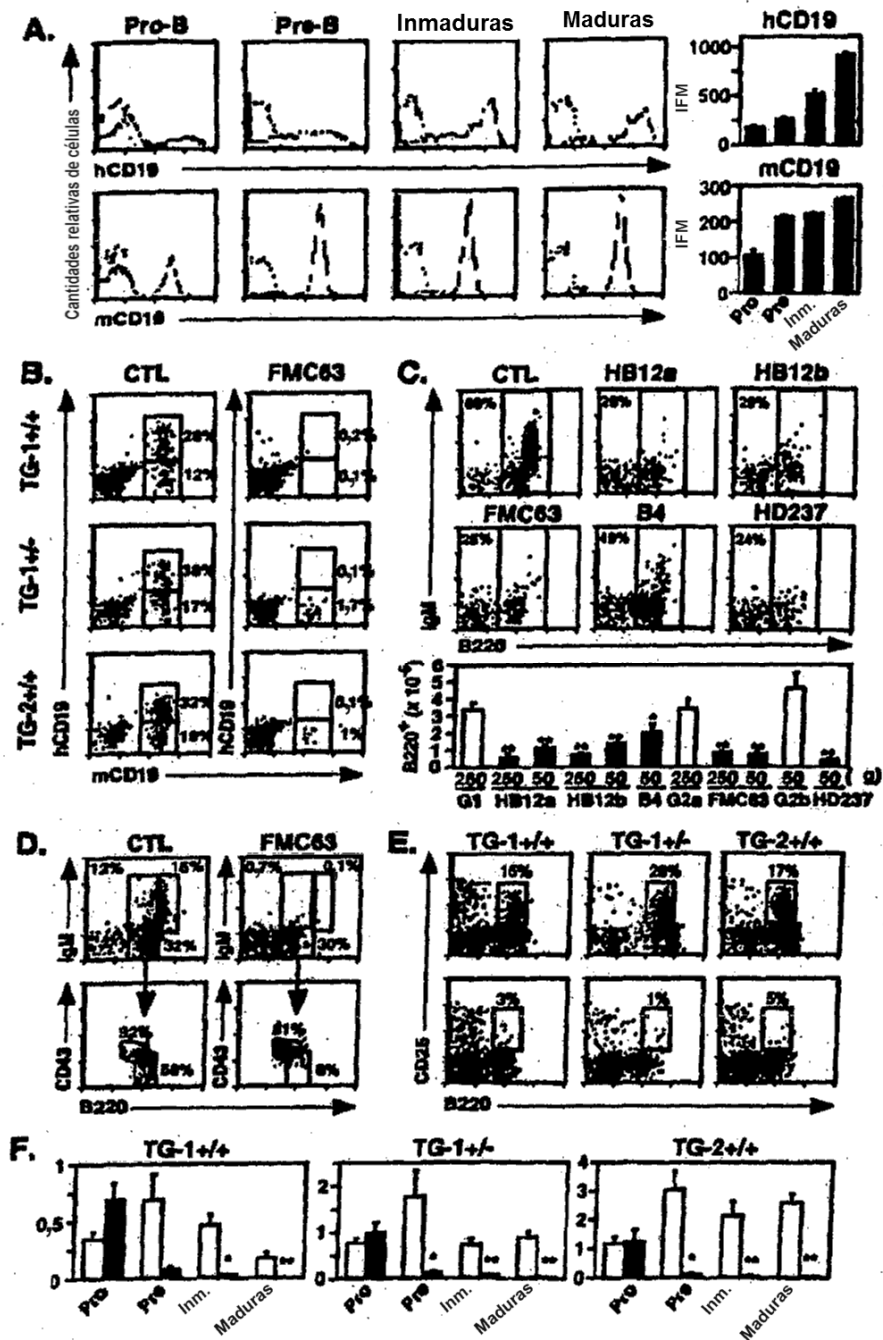
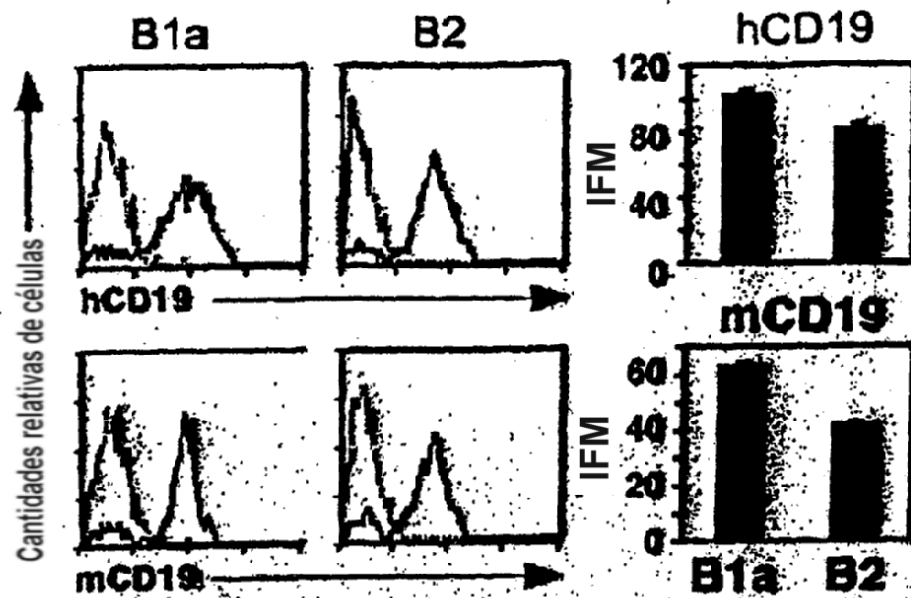


Figura 3

**FIG. 4A**



**FIG. 4B**

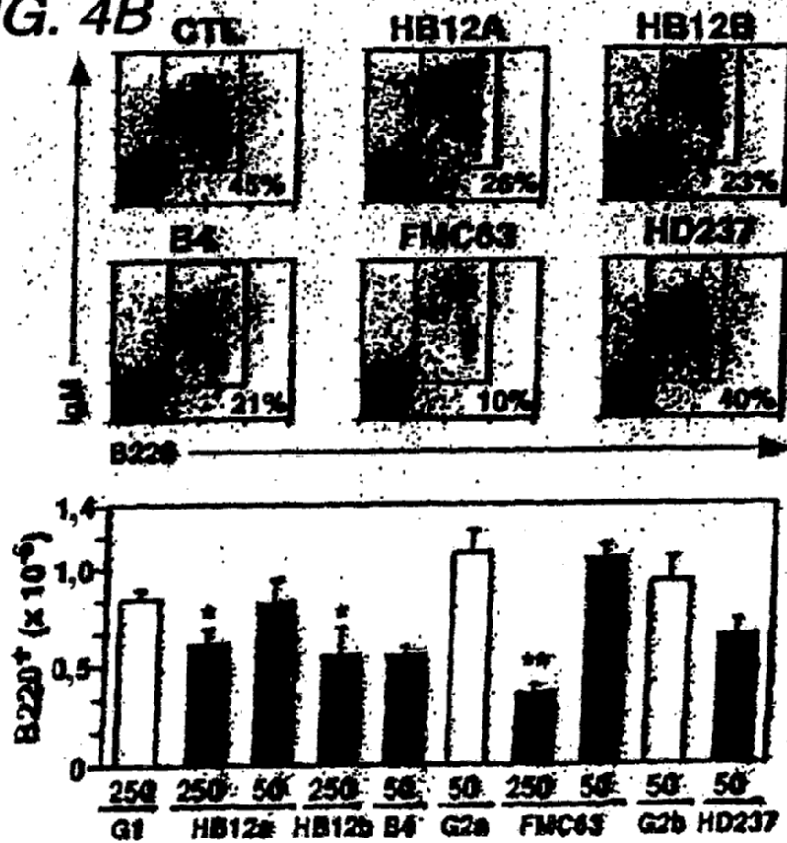


FIG. 4C

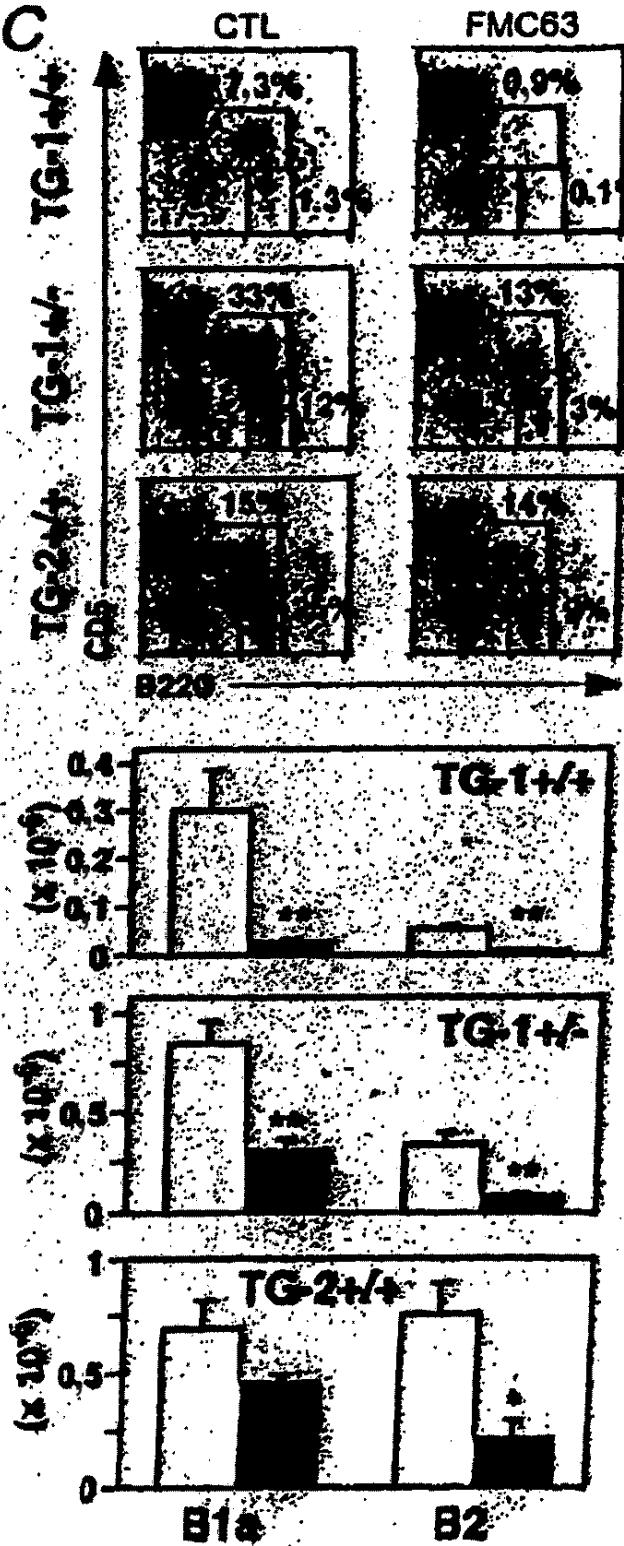


FIG. 5A

HB12a HC

```

      1      10      18
E F E V Q L Q E S G P E L V K P G A S V
GAA TTC GAG CTG CAG CTG CAG GAG TCT GGA CCT GAG CTG GTA AAG CCT GGG GCT TCA GTG 60

      21      30      38
K M S C K A S G Y T F T S Y V M H W V K
AAG ATG TCC TGC AAG GCT TCT GGA TAC ACA TTC ACT AGC TAT GTT ATG CAC TGG GTG AAG 120

      41      50      58
Q K P G Q G L E W I G Y F N P Y N D G T
CAG AAG CCT GGG CAG GGC CTT GAG TGG ATT GGA TAT TTT AAT CCT TAC AAT GAT GGT ACT 180

      61      70      78
D Y Y E K F K G K A T L T S D K S S S T
GAT TAC TAT GAG AAG TTC AAA GGC AAG GCC ACA CTG ACT TCA GAC AAA TCC TCC AGC ACA 240

      81      90      98
A Y M A L S S L T S E D S A V Y Y C A R
GCC TAC ATG GCG CTC AGC AGC CTG ACC TCT GAG GAC TCT GCG GTC TAT TAC TGT GCA AGA 300

      101      110      118
G T Y Y Y G S S Y P F D Y W G Q G T T L
GGG ACC TAT TAC TAC GGT AGT AGC T AC CCC TTT GAC TAC TGG GGC CAA GGC ACC ACT CTC 360

      122
T V S S
ACA GTC TCC TCA G 373

```

FIG. 5B

HB12b HC

```

      1      10      18
E F E V Q L Q E S G P E L V K P G A S V
EAA TTC GAG GTG CAG CTG CAG GAG TCT GGA CCT GAG CTG GTG AAG CCT GGG GCC TCA GTG 60

      21      30      38
K I S C K A S G Y A F S S W M N W V I
AAG ATT TCC TGC AAA GCT TCT GGC TAC GCA TTC AGT AGC TCT TGG ATG AAC TGG GTG ATA 120

      41      50      58
Q R P G Q G L E W I G R I Y P G D G D T
CAG AGG CCT GGA CAG GGT CTT GAG TGG ATT GGA CGG ATT TAT CCT GGA GAT GGA GAT ACT 180

      61      70      78
N Y N Q K P K G K A T L T A D K S S S T
AAC TAC AAT GGG AAG TTC AAG GGC AAG GCC ACA CTG ACT GCA GAC AAA TCC TCC AGT ACA 240

      81      90      98
A Y M Q L S S L T S V D S A V Y F C A R
GCC TAC ATG CAG CTC AGC AGC CTG ACC TCT GTG GAC TCT GCG GTC TAT TTC TGT GCA AGA 300

      101      110      118
S G F I T T V L D F D Y W G H G T T L T
TCA GGA TTT ATT ACT ACG GTT TTA G AC TTT GAC TAC TGG GGC CAG GGC ACC ACT CTC ACA 360

      121
V S S
GTC TCC TCA G 370

```



HB12a LC

CATGGACTGAAAGGAGTAGAAAACCTGATCACTCTCCTATATGTTATTTCTCAGAAATG 56

M S P A Q P L F L L V L W I Q E T N G  
 ATG AGT CCT GCC CAG TTC CTG TTT CTG TTA GTG CTC TGG ATT CAG GAA ACC AAC GGT 113

10 20  
 D V G N T Q T P L T L S V T I G Q P A S  
 GAT GTT GGG ATG ACC CAG ACT CCA CTC ACT TTG TCG GTC ACC ATT GGA CAA CCA GCC TCT 173

30 40  
 F S C K S S Q S L L Y S N G K T Y L N W  
 TTC TCT TGC AAG TCA AGT CAG AOC CTC TTA TAT AGT AAT GGA AAA ACC TAT TTG AAT TGG 233

50 60  
 L L Q R P G Q S P K R L I H L V S K L D  
 TTA TTA CAG AGG CCA GGC CAG TCT CCA AAG CCG CTA ATC CAT CTG GTG TCT AAA CTG GAC 293

70 80  
 S G V P D R P T G S G S G T D F T L K I  
 TCT GGA GTC CCT GAC AGG TTC ACT GGC AGT GGA TCA GGA ACA GAT TTT ACA CTG AAA ATC 353

90 100  
 G R V E A E D L G V Y Y C V Q G T H P P  
 GGC AGA GTG CAG GCT GAG GAT TTG GGA GTT TAT TAC TGC GTG CAA GGT ACA CAT TTT CCG 413

110 120  
 Y T F G G G T K L E I K R A D A A P T V  
 TA/C ACG TTC GGA GGG GGG ACC AAG CTA GAA ATA AAA C/GG GCT GAT GCT GCA CCA ACT GTA 473

121 127  
 S I F P P S S  
 TCC ATC TTC CCA CCA TCC AGT 494

FIG. 6A

HE12b LC

CATGGACTGAAGGAGTAGAAAAAGCATTCTCTCTTCCAGTTCTCAGAG 47  
 M E E D T L L L W V L L L W V F G S T G  
 ATG GAG AAA GAC ACA CTC CTG CTA TGG GTC CTG CTT CTC TGG GTT CCA GGT TCC ACA GGT 107  
 1 10 20  
 D I V L T Q S F T S L A V S L G Q R A T  
 GAC ATT GTG CTG ACG CAG TCT CCA ACC TCT TTG GCT GTG TCT CTA GGG CAG AGG GCC ACC 167  
 21 30 40  
 I S C R A S E S V D T F G I S F M N W F  
 ATC TCC TGC AGA CCC AGC GAA AGT GTT GAT ACT TTT GGC ATT AGT TTT ATG AAC TGG TTC 227  
 41 50 60  
 Q Q E P G Q P P K L L I H A A S N Q G S  
 CAA CAG AAA CCA GGA CAG CCA CCC AAA CTC CTC ATC CAT GCT CCA TCC AAT CAA GGA TCC 287  
 61 70 80  
 G V P A R F S G S G S G T D F S L N I H  
 GGG GTC CCT GCC AGG TTT AGT GGT AGT GGG TCT GGG ACG GAC TTC AGC CTC AAC ATC CAT 347  
 81 90 100  
 P M E E D D S A N Y F C Q Q S E E V P F  
 CCT ATG GAG GAG GAT GAT AGT GCA ATG TAT TTC TGT CAG CAA AGT AAG GAG GTT CCA TT C 407  
 101 110 120  
 T P Q S G T K L E I K R A D A A P T V S  
 ACG TTC GGC TCG GGG ACA AAG TTG GAA ATA AAA CGG GCT GAT GCT GCA CCA ACT GTA TCC 467  
 121 126  
 I F P P S S  
 ATC TTC CCA CCA TCC AGT 485

FIG. 6B

FIG. 7A

|        | 1  | 10 | 20 | 30 | 40   | 50 | 60   | 70 | 80 |
|--------|----|----|----|----|------|----|------|----|----|
| Conse. |    |    |    | 30 | CDR1 |    | CDR2 |    |    |
| HB12a  | EV | Q  | E  | S  | G    | P  | E    | L  | V  |
| 4G7    | Q  | Q  | Q  | Q  | Q    | Q  | Q    | Q  | Q  |
| HB12b  | Q  | Q  | Q  | Q  | Q    | Q  | Q    | Q  | Q  |
| HD37   | Q  | Q  | Q  | Q  | Q    | Q  | Q    | Q  | Q  |
| B43    | Q  | Q  | Q  | Q  | Q    | Q  | Q    | Q  | Q  |
| FMC63  | Q  | Q  | Q  | Q  | Q    | Q  | Q    | Q  | Q  |

|        | 90 | 100 | CDR3 |
|--------|----|-----|------|
| Conse. |    |     |      |
| HB12a  | AL | S   | L    |
| 4G7    | Q  | Q   | Q    |
| HB12b  | Q  | Q   | Q    |
| HD37   | Q  | Q   | Q    |
| B43    | Q  | Q   | Q    |
| FMC63  | Q  | Q   | Q    |

Secuencia de cadena ligera

|        | 1                                                              | 10          | 20     | CDR1 | 30       | 40    | 50        | CDR2     | 60           |
|--------|----------------------------------------------------------------|-------------|--------|------|----------|-------|-----------|----------|--------------|
| Conse. | DIVNTQTPASLAVSLGORATISCKASQSVDT-NQDSYLNWYQORPGQPPKLLIYDASNLVSG |             |        |      |          |       |           |          |              |
| HB12a  | .VG.                                                           | .LT.S.TI.   | .P.SF. | .S.  | .LL.S.   | .KFL. | .LL.      | .S.      | .R..HLV.F.D. |
| 4G7    |                                                                | .AAP.IP.TP. | ESVS.  | .RS. | .E.LLNS. | .NF.  | .Y.FL.    | .S.Q.    | .RM..A.      |
| B43    | EL.L.                                                          | .S.         |        |      |          |       |           |          |              |
| HD37   | .LL.                                                           |             |        |      |          |       |           |          |              |
| HB12b  | .L.                                                            | .S.T.       |        | .R.  | .EL.     | .T.P. | .I.FME.F. | .K.      | .HA..QG.     |
| FMC63  | .Q.                                                            | .TS..SA.    | .D.V.  | .R.  | .DI---   | .SK.  |           | .K.DGTU. | .HT.A.H.     |

|        | 70                                                    | 80         | 90     | CDR3   | 100        | 110   |                |
|--------|-------------------------------------------------------|------------|--------|--------|------------|-------|----------------|
| Conse. | VPDRFSGSGSGTDFTLNIHPVEKEDAATYYCQOSTEDFTYFGGGTKLEIKRAD |            |        |        |            |       | (SEC ID N°:10) |
| HB12a  | .T.                                                   | .K.GR.     | .A.    | .LGV.  | .V.G.HF.   |       | (SEC ID N°:16) |
| 4G7    |                                                       | .A..R.SR.  | .A.    | .VGV.  | .M.HC.Y.F. | .A.   | (SEC ID N°:14) |
| B43    | I.P.                                                  |            | .V.    | .H.    | .WJ.       |       | (SEC ID N°:12) |
| HD37   | I.P.                                                  |            | .V.    | .H.    | .WJ.       |       | (SEC ID N°:11) |
| HB12b  | .A.                                                   | .S.        | .M.ED. | S.M.F. | .K.V.FS.   | .S.   | (SEC ID N°:18) |
| FMC63  | .S.                                                   | .YS.T.SNL. | .Q.    | .I.    | .F..GNTL.  | .T--- | (SEC ID N°:13) |

FIG. 7B

FIG. 8A

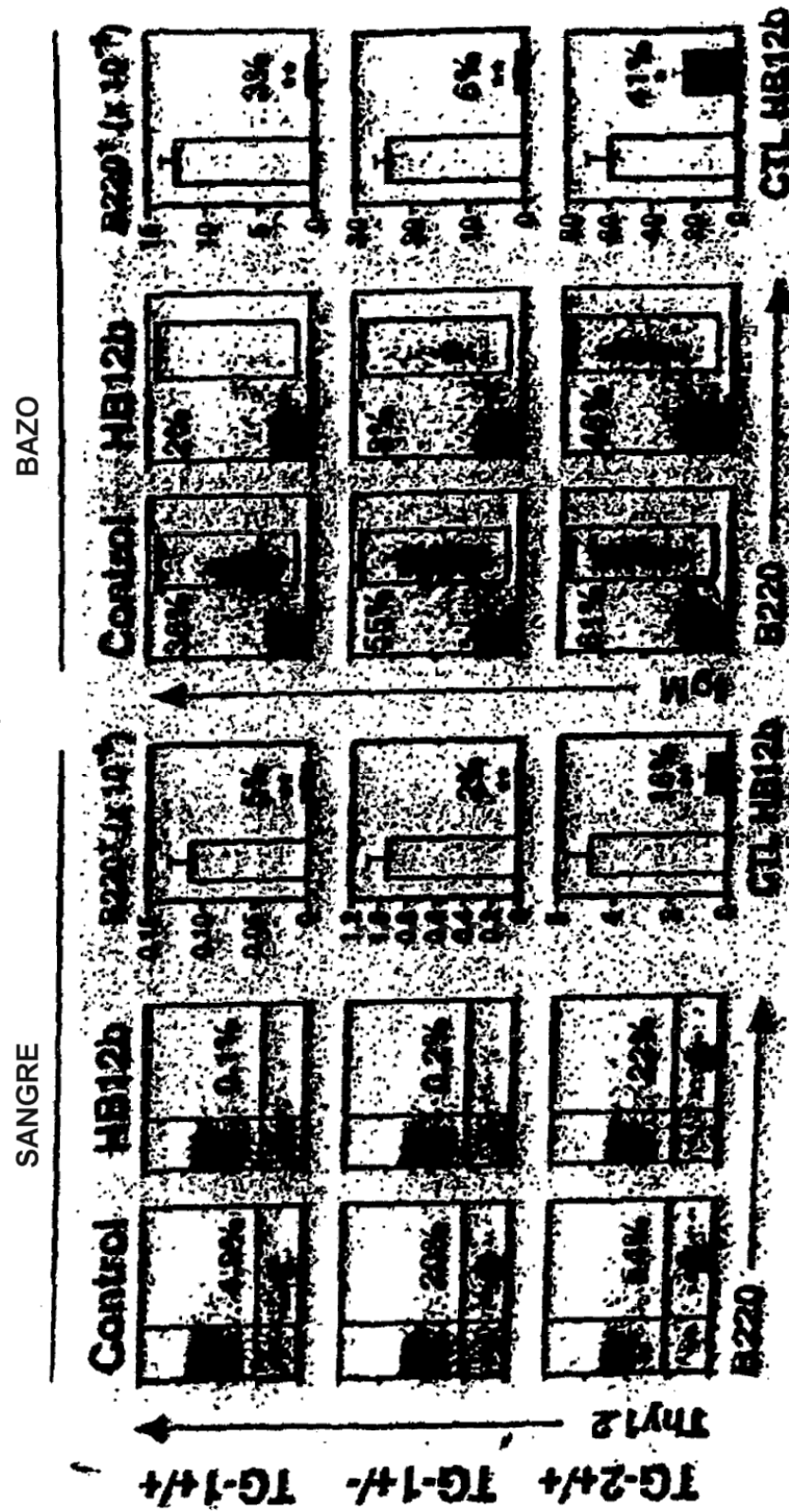
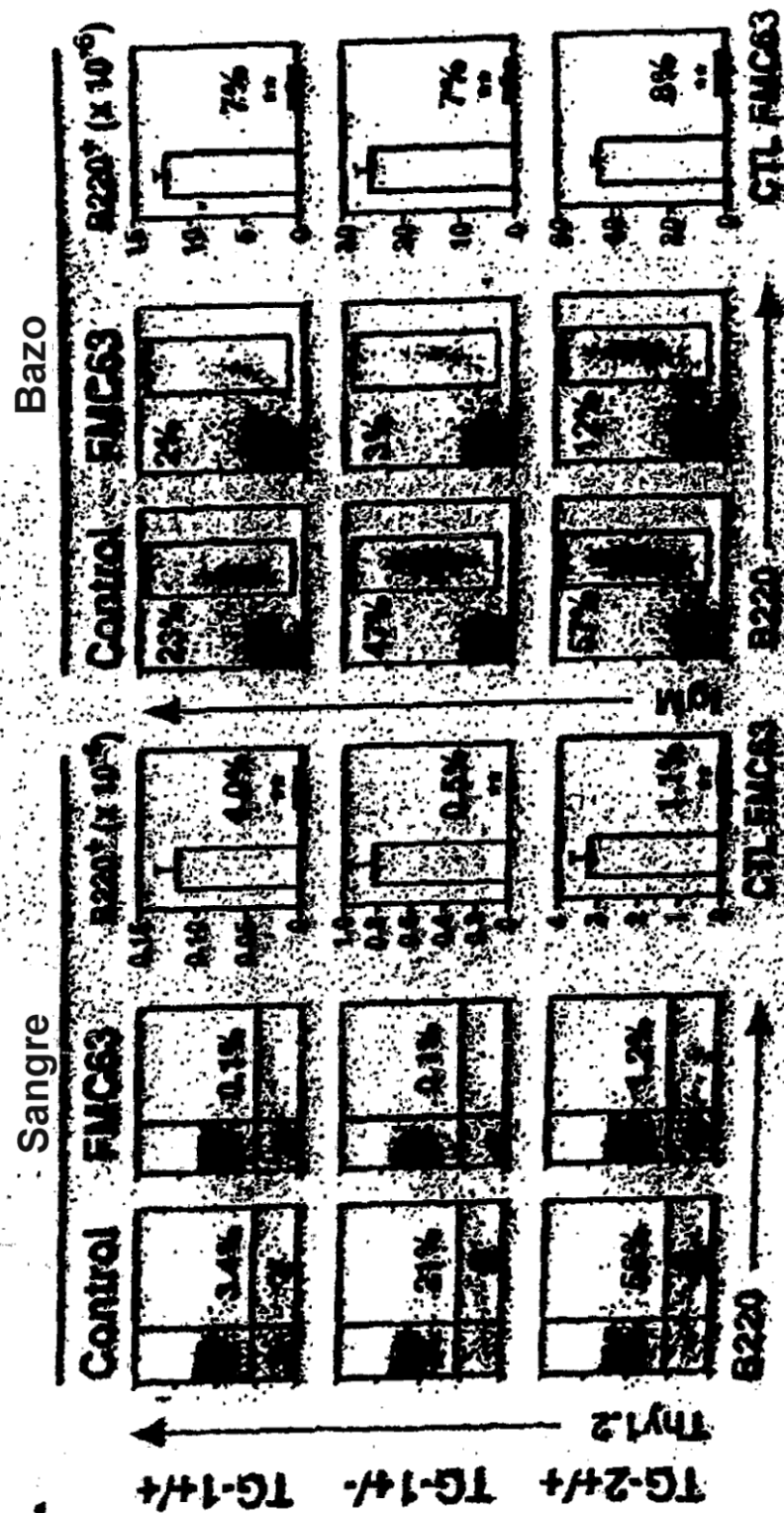


FIG. 8B



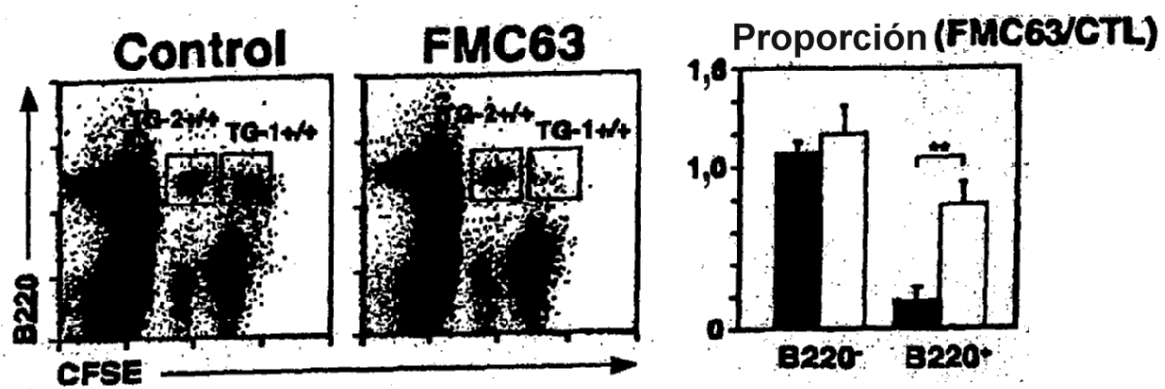
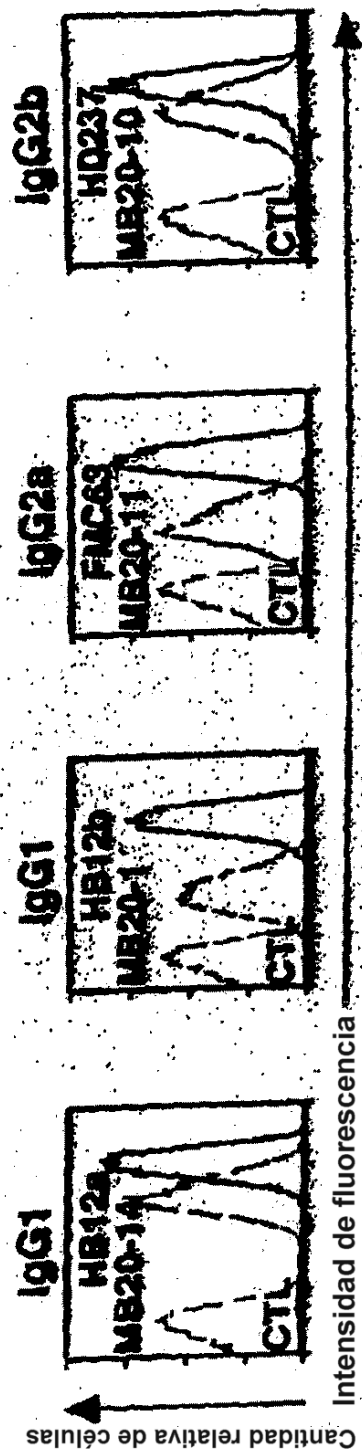


FIG. 8C

FIG. 8D





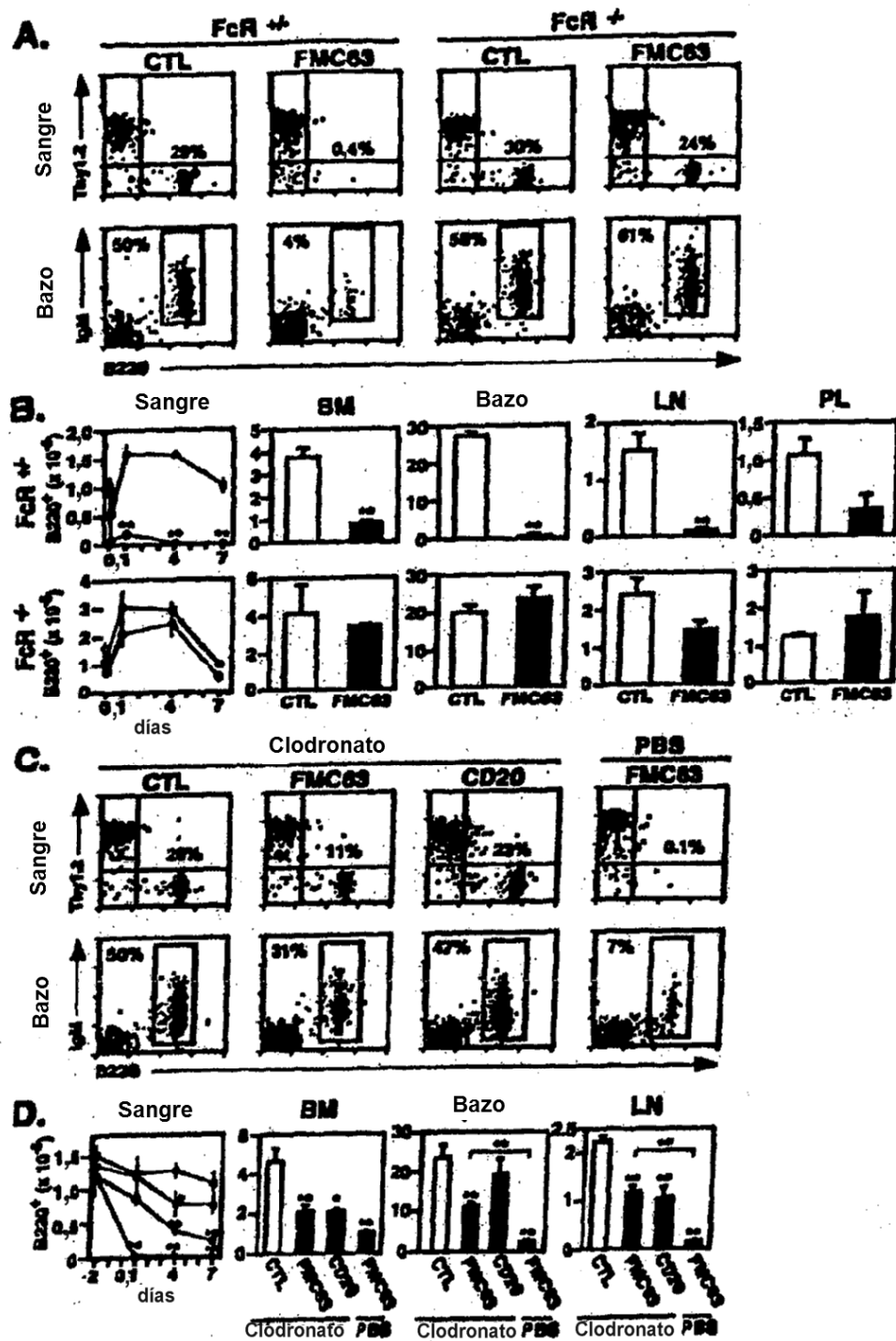


Figura 9

**FIG. 10A**

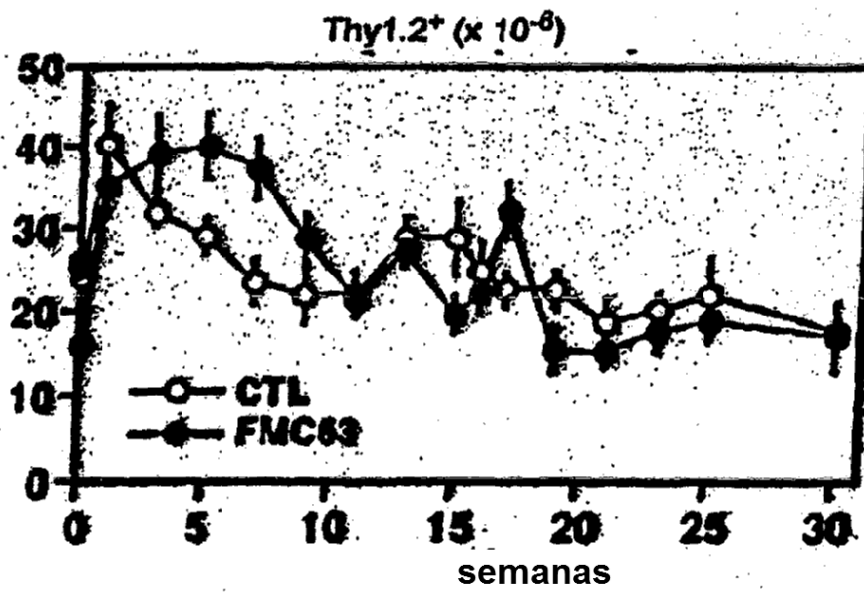
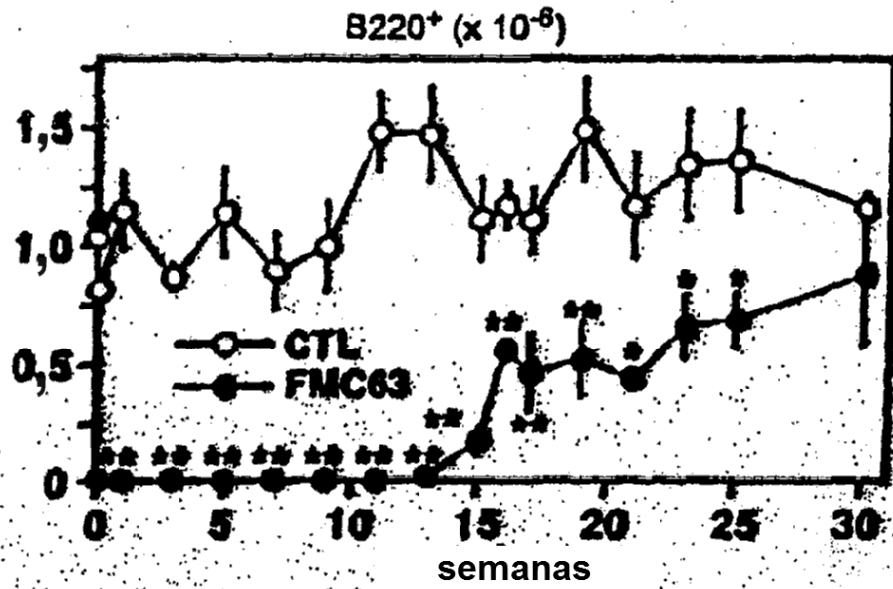


FIG. 10B

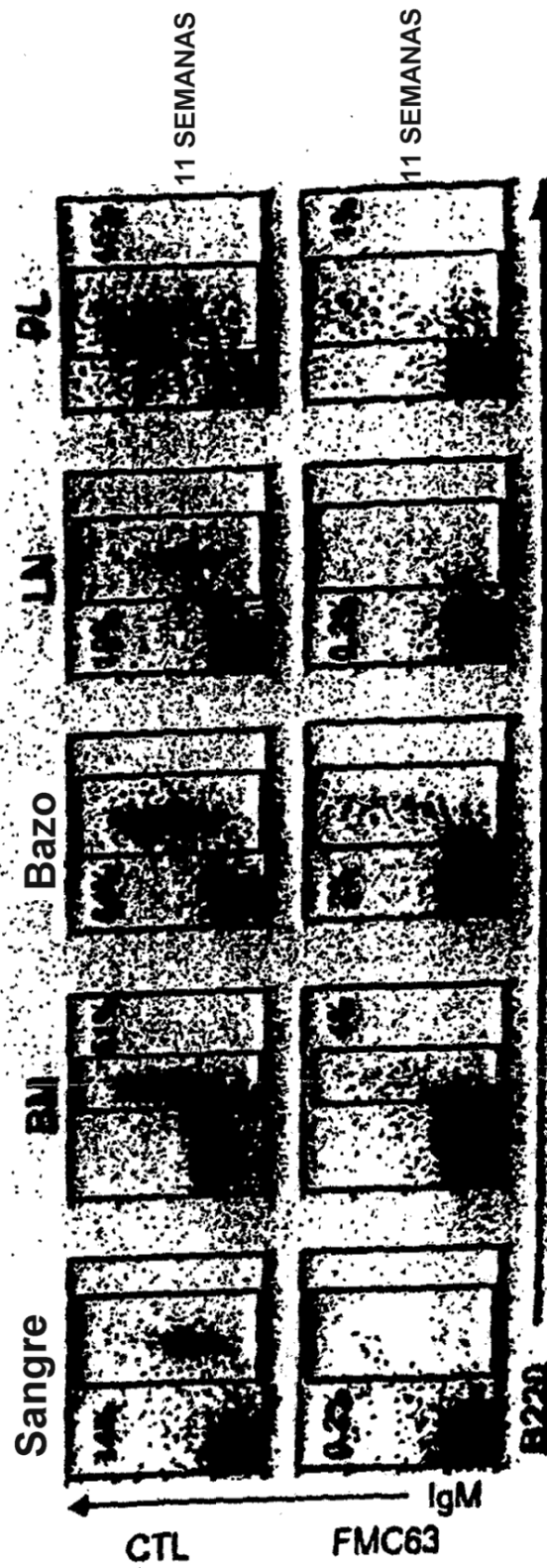


FIG. 10C

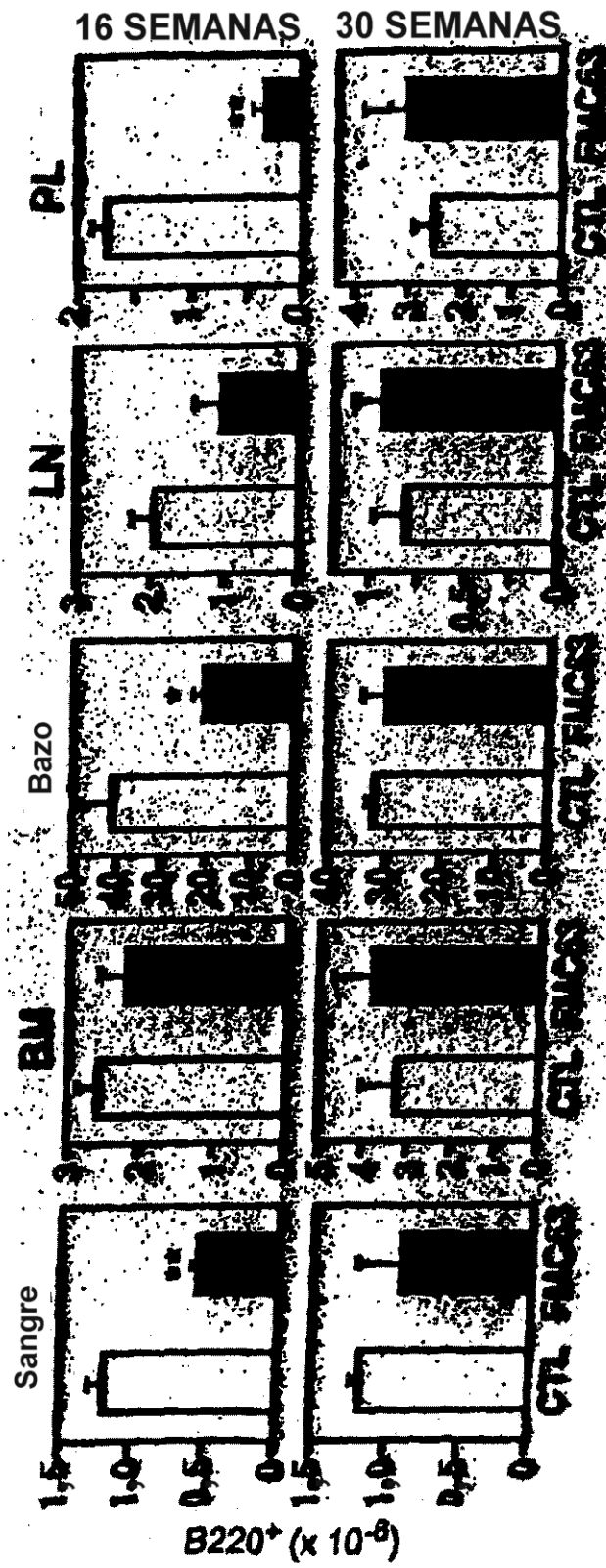


FIG. 10D

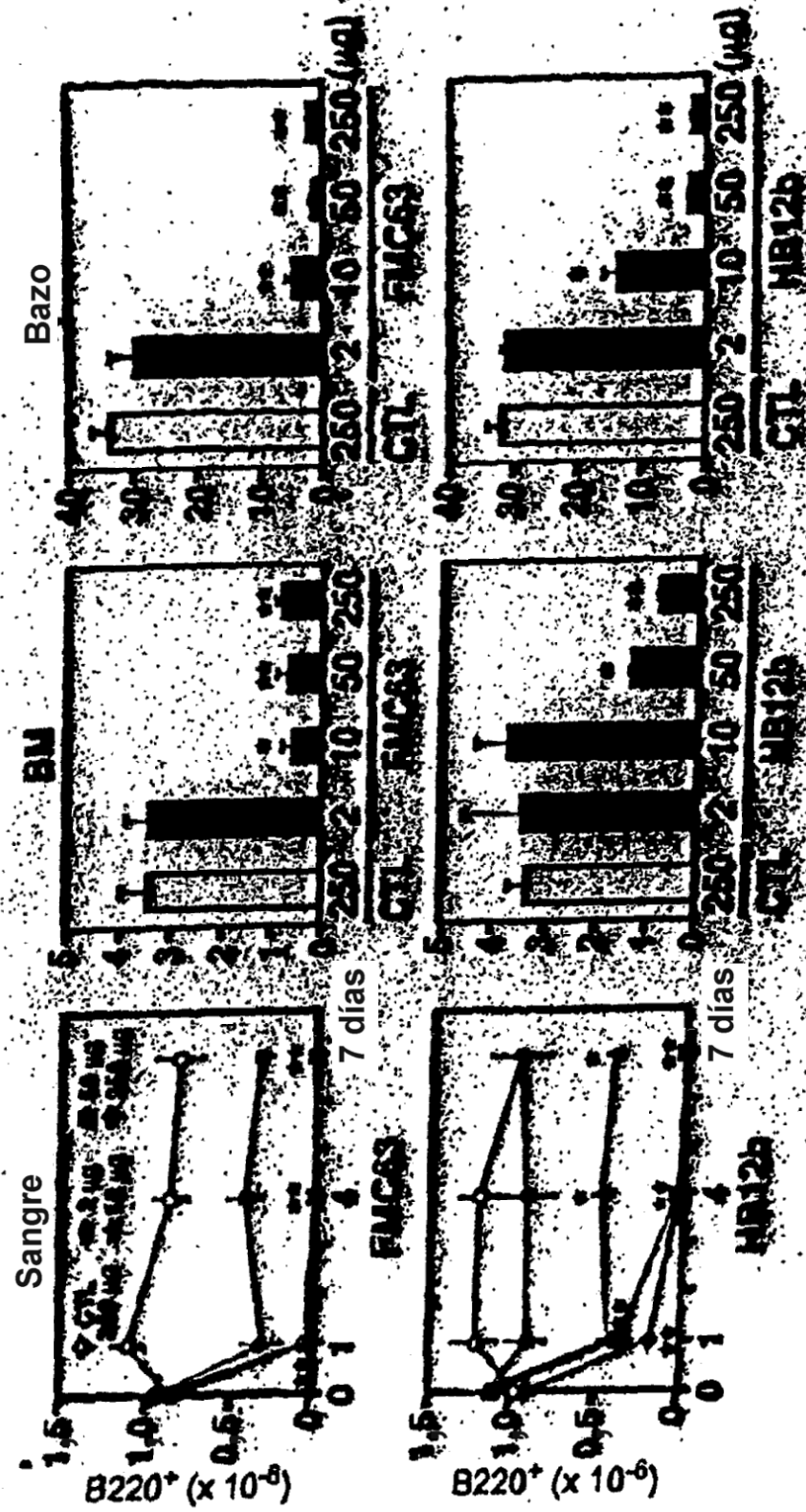


FIG. 11A

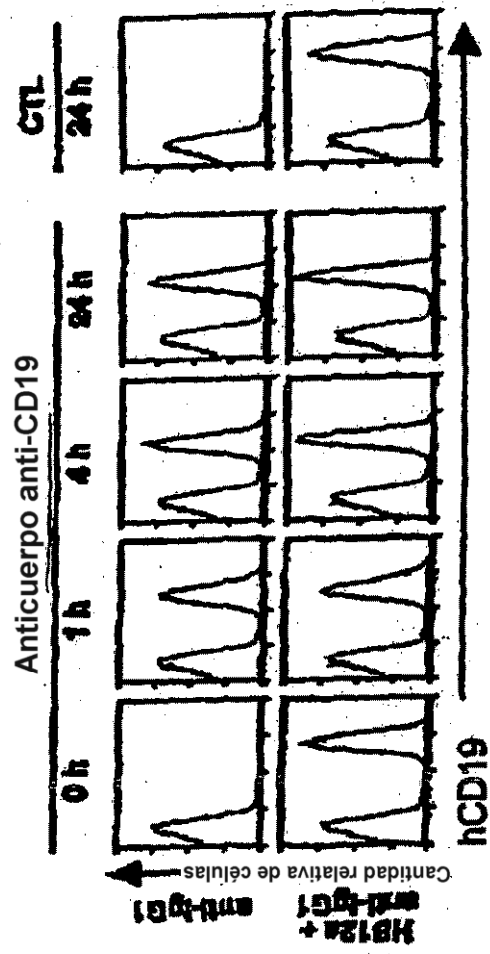


FIG. 11B

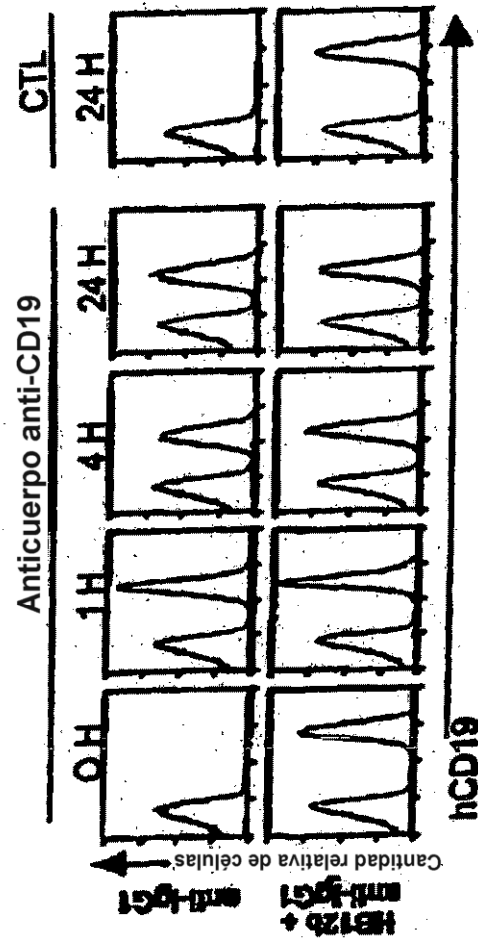
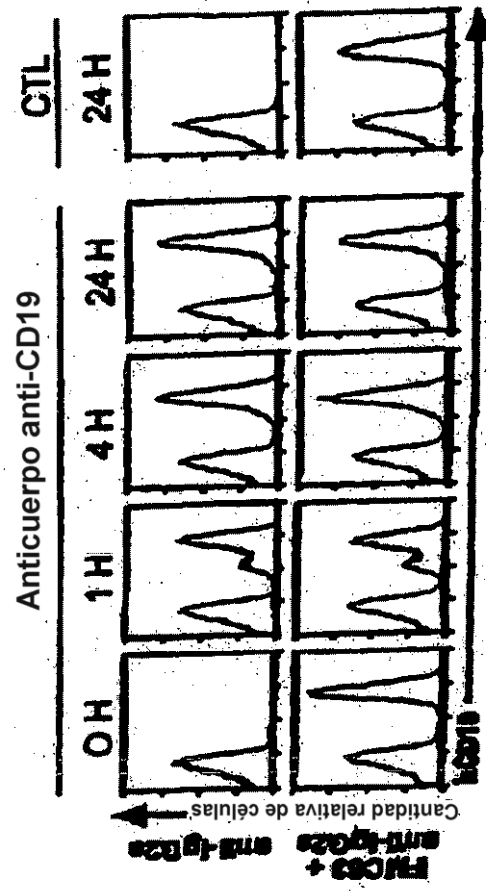


FIG. 11C





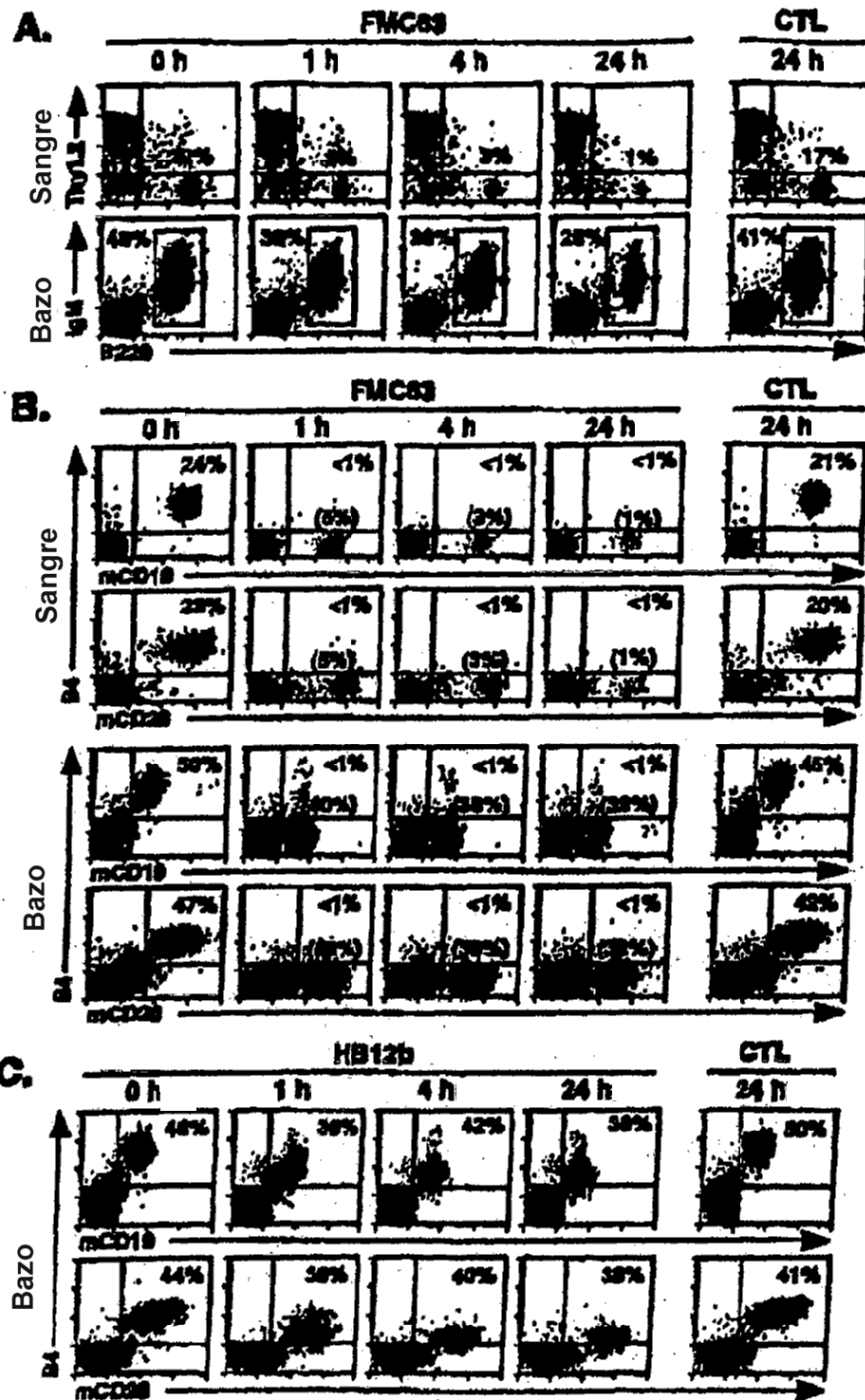
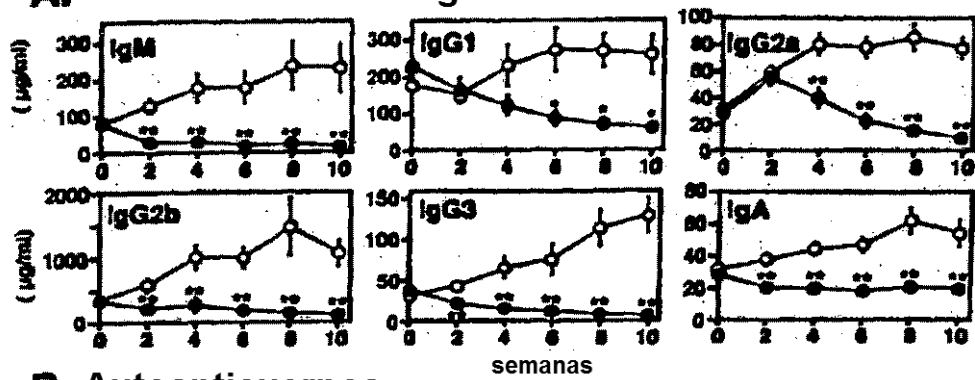


Figura 12

### A. Niveles séricos de Ig



### B. Autoanticuerpos

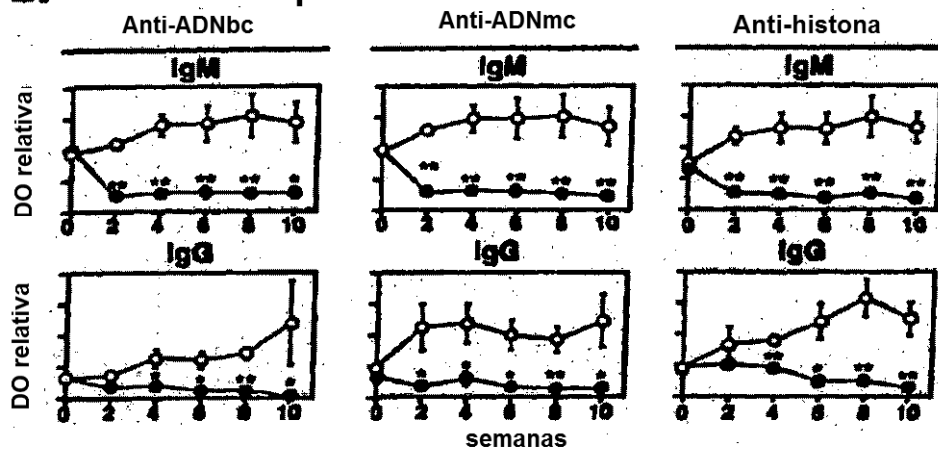


Figura 13

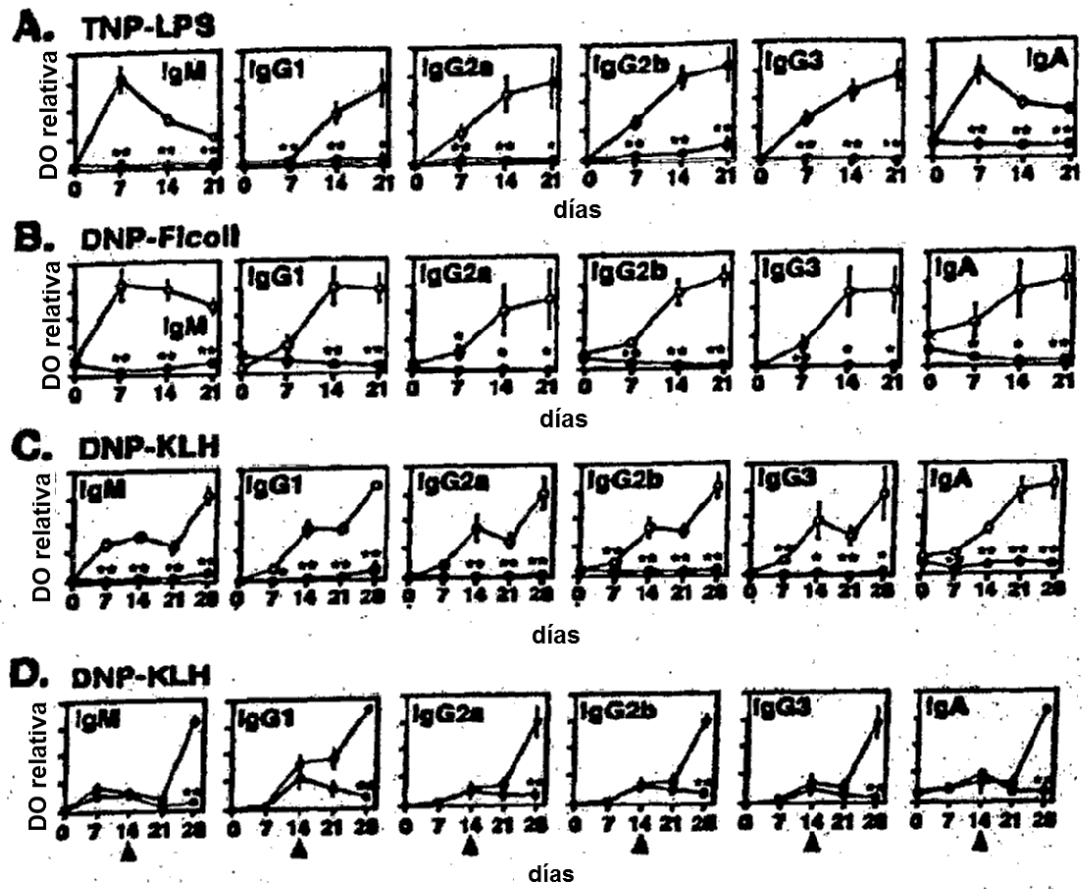
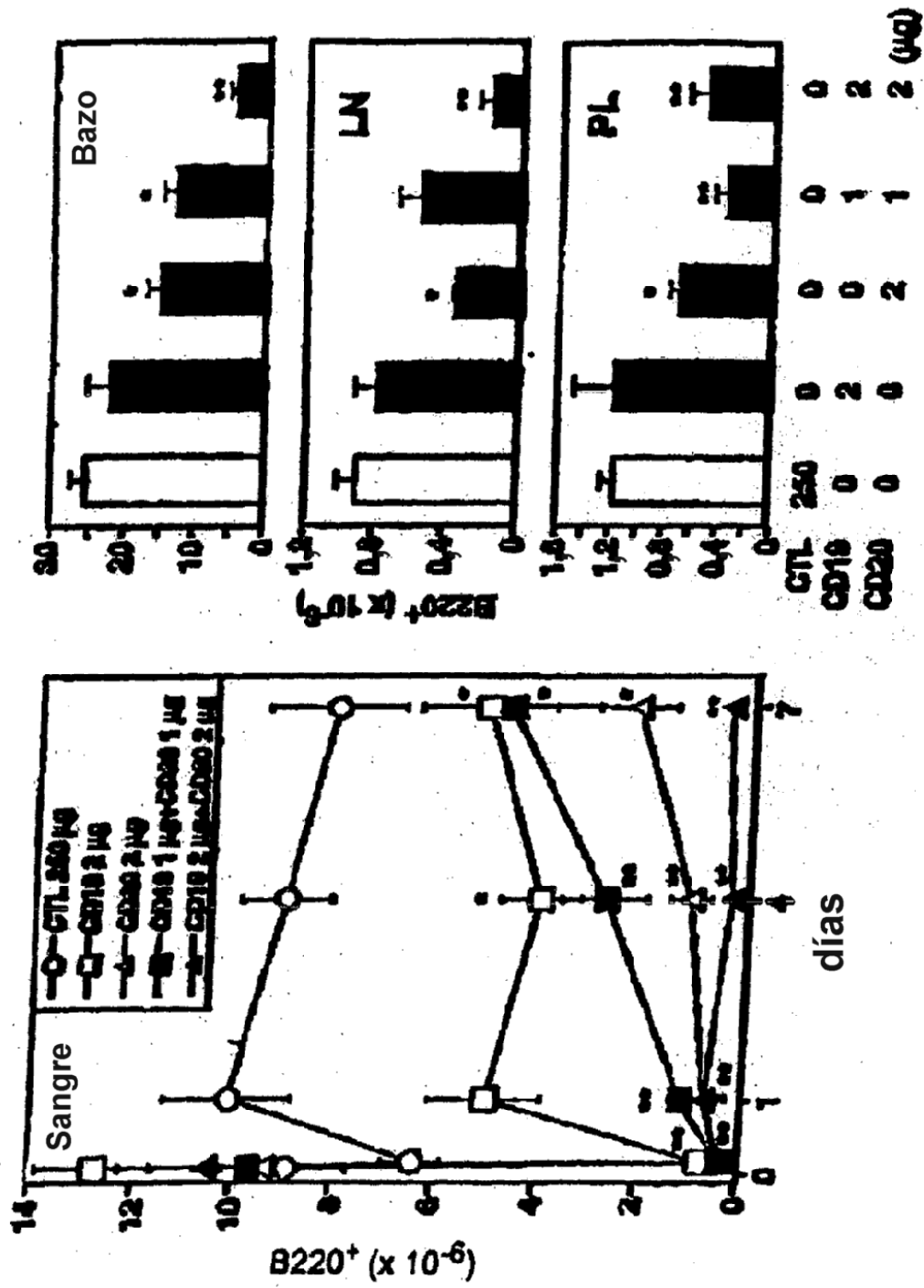


Figura 14

FIG. 15



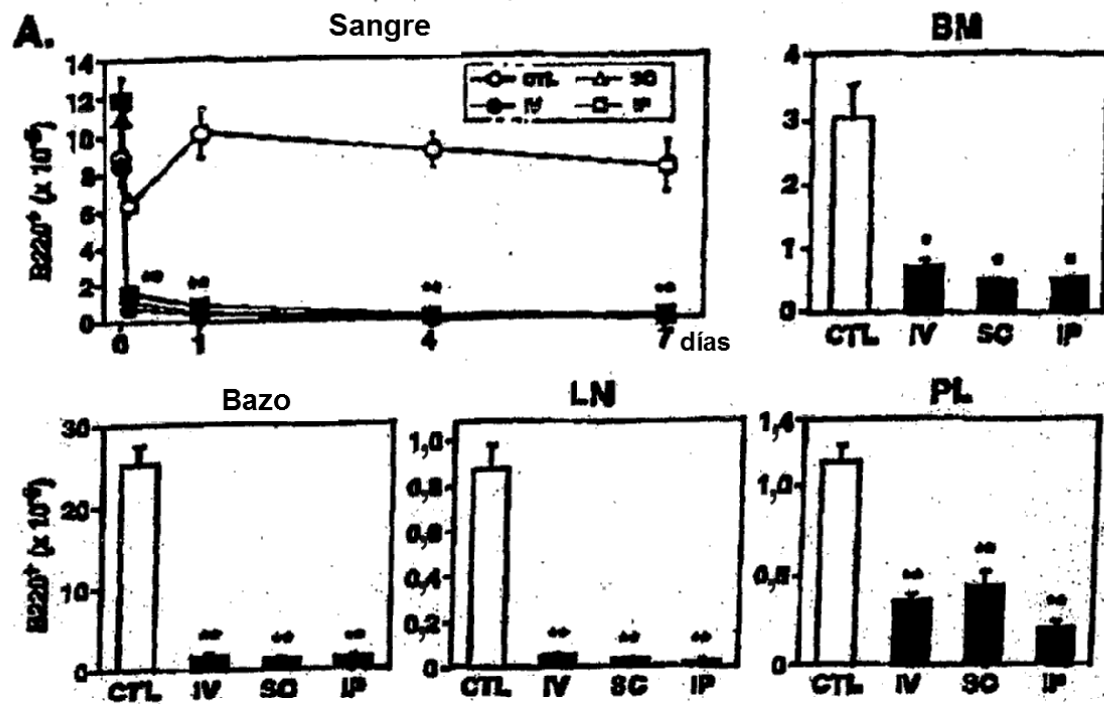


Figura 16

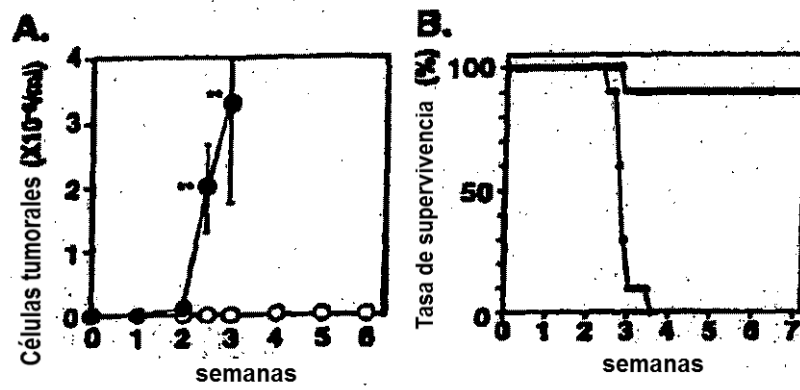


Figura 17