

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 693 370**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

A61K 47/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.04.2014** **PCT/EP2014/058831**

87 Fecha y número de publicación internacional: **06.11.2014** **WO14177617**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.04.2014** **E 14721825 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.08.2018** **EP 2992015**

54 Título: **Politerapia de un anticuerpo CD20 afucosilado con un conjugado de anticuerpo CD22-fármaco**

30 Prioridad:

02.05.2013 US 201361818810 P

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

11.12.2018

73 Titular/es:

F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.0%)
Grenzacherstrasse 124
4070 Basel , CH

72 Inventor/es:

KLEIN, CHRISTIAN;
LANG, SABINE;
POLSON, ANDREW y
UMANA, PABLO

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 693 370 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

Politerapia de un anticuerpo CD20 afucosilado con un conjugado de anticuerpo CD22-fármaco

- 5 La presente invención se dirige a la politerapia de un anticuerpo CD20 afucosilado con un conjugado de anticuerpo CD22-fármaco para el tratamiento del cáncer.

Antecedentes de la invención**10 Anticuerpos afucosilados**

Las funciones efectoras mediadas por células de los anticuerpos monoclonales se pueden potenciar manipulando su componente oligosacárido, como se describe en Umaña, P. *et al.*, Nature Biotechnol. 17 (1999) 176-180; y el documento US 6.602.684. Los anticuerpos de tipo IgG1, los anticuerpos más comúnmente usados en la inmunoterapia contra el cáncer, son glucoproteínas que tienen un sitio de glucosilación unido por enlaces N conservado en la Asn297 de cada dominio CH2. Los dos oligosacáridos biantenarios complejos fijados a Asn297 están ocultos entre los dominios CH2, formando contactos extensivos con la cadena principal polipeptídica y su presencia es esencial para que el anticuerpo medie en funciones efectoras, tales como la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) (Lifely, M.R., *et al.*, Glycobiology 5 (1995) 813-822; Jefferis, R., *et al.*, Immunol Rev. 163 (1998) 59-76; Wright, A. y Morrison, S.L., Trends Biotechnol 15 (1997) 26-32). Umaña, P., *et al.*, Nature Biotechnol. 17 (1999) 176-180 y el documento WO 99/154342 mostraron que la sobreexpresión en células de ovario de hámster chino (CHO) de $\beta(1,4)$ -N-acetilglucosaminiltransferasa III ("GnTIII"), una glucosiltransferasa que cataliza la formación de oligosacáridos bisecados, aumenta significativamente la actividad ADCC *in vitro* de los anticuerpos. Las alteraciones en la composición de los hidratos de carbono de N297 o su eliminación también afectan a la unión a Fc que se une a Fc γ R y C1q (Umaña, P., *et al.*, Nature Biotechnol. 17 (1999) 176-180; Davies, J., *et al.*, Biotechnol Bioeng. 74 (2001) 288-294; Mimura, Y., *et al.*, J. Biol. Chem. 276 (2001) 45539-45547; Radaev, S., *et al.*, J. Biol. Chem. 276 (2001) 16478-16483; Shields, R.L., *et al.*, J. Biol. Chem. 276 (2001) 6591-6604; Shields, R.L., *et al.*, J. Biol. Chem. 277 (2002) 26733-26740; Simmons, L.C., *et al.*, J. Immunol. Methods 263 (2002) 133-147).

Se ha informado de estudios que analizan las actividades de los anticuerpos afucosilados y fucosilados, incluyendo anticuerpos anti-CD20 (por ejemplo, Iida, S., *et al.*, Clin. Cancer Res. 12 (2006) 2879-2887; Natsume, A., *et al.*, J. Immunol. Methods 306 (2005) 93-103; Satoh, M., *et al.*, Expert Opin. Biol. Ther. 6 (2006) 1161-1173; Kanda, Y., *et al.*, Biotechnol. Bioeng. 94 (2006) 680-688; Davies, J., *et al.*, Biotechnol. Bioeng. 74 (2001) 288-294.

Anticuerpos CD20 y anti-CD20

La molécula de CD20 (también llamado antígeno de diferenciación restringido a linfocitos B humanos o Bp35) es una proteína transmembranaria hidrófoba que se localiza en linfocitos B maduros y pre-B que se ha descrito ampliamente (Valentine, M.A., *et al.*, J. Biol. Chem. 264 (1989) 11282-11287; y Einfeld, D.A., *et al.*, EMBO J. 7 (1988) 711-717; Tedder, T.F., *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85 (1988) 208-212; Stamenkovic, I., *et al.*, J. Exp. Med. 167 (1988) 1975-1980; Tedder, T.F., *et al.*, J. Immunol. 142 (1989) 2560-2568). CD20 se expresa en más de un 90 % de los linfomas no Hodgkinianos (LNH) de linfocitos B (Anderson, K.C. *et al.*, Blood 63 (1984) 1424-1433), pero no se encuentra en hemocitoblastos, linfocitos pro-B, células plasmáticas normales u otros tejidos normales (Tedder, T.F. *et al.*, J. Immunol. 135 (1985) 973-979).

Existen dos tipos diferentes de anticuerpos anti-CD20 que difieren significativamente en su modo de unión a CD20 y actividades biológicas (Cragg, M.S. *et al.*, Blood 103 (2004) 2738-2743; y Cragg, M.S. *et al.*, Blood 101 (2003) 1045-1052). Los anticuerpos de tipo I como, por ejemplo, rituximab (un anticuerpo no afucosilado con una cantidad de fucosa de un 85 % o superior) son potentes en la citotoxicidad mediada por el complemento.

Los anticuerpos de tipo II como, por ejemplo, tositumomab (B1), 11B8, AT80 o anticuerpos B-Ly1 humanizados, inician eficazmente la muerte de las células diana por medio de apoptosis independiente de caspasas con exposición concomitante de fosfatidilserina.

Conjugados de anticuerpo CD22-fármaco

Otros antígenos de linfocitos B, tales como CD19, CD22, y CD52, representan dianas con posibilidad terapéutica para el tratamiento de linfoma (Grillo-López A.J. *et al.*, Curr Pharm Biotechnol, 2:301-11, (2001)). CD22 es una sialoglucoproteína restringida a linfocitos B de 135 kDa expresada en la superficie de los linfocitos B solamente en las fases maduras de la diferenciación (Dorken, B. *et al.*, J. Immunol. 136:4470-4479 (1986)). La forma predominante de CD22 en los seres humanos es CD22beta que contiene siete dominios de la superfamilia de inmunoglobulinas en el dominio extracelular (Wilson, G.L. *et al.*, J. Exp. Med. 173:137-146 (1991)). Una forma variante, CD22 alfa, carece de los dominios 3 y 4 de la superfamilia de inmunoglobulinas (Stamenkovic, I. y Seed, B., Nature 345: 74-77 (1990)). Se ha demostrado que la unión a ligando a CD22 humano está asociada

con los dominios 1 y 2 de la superfamilia de inmunoglobulinas (también denominados epítopos 1 y 2) (Engel, P. *et al.*, J. Exp. Med. 181:1581-1586, 1995).

En LNH de linfocitos B, la expresión de CD22 varía de un 91 % a un 99 % en las poblaciones de gran malignidad y de escasa malignidad, respectivamente (Cesano, A. *et al.*, Blood 100:350a (2002)). CD22 puede funcionar tanto como un componente del complejo de activación de linfocitos B (Sato, S. *et al.*, Semin. Immunol. 10:287-296 (1998)), y como una molécula de adhesión (Engel, P. *et al.*, J. Immunol. 150:4719-4732 (1993)). Los linfocitos B de ratones deficientes en CD22 tienen una vida más corta y apoptosis potenciada, lo que sugiere un papel clave de este antígeno en la supervivencia de los linfocitos B (Otipoby, K.L. *et al.*, Nature (Lond) 384:634-637 (1996)). Después de la unión con su(s) ligando(s) natural(es) o anticuerpos, el CD22 se internaliza rápidamente, lo que proporciona una señal coestimuladora potente en los linfocitos B primarios y señales proapoptóticas en linfocitos B neoplásicos (Sato, S. *et al.*, Immunity 5:551-562 (1996)).

Los anticuerpos anti-CD22 se han estudiado como posibles tratamientos para cánceres de linfocitos B y otras enfermedades proliferativas de linfocitos B. Dichos anticuerpos anti-CD22 incluyen RFB4 (Mansfield, E. *et al.*, Blood 90:2020-2026 (1997)), CMC-544 (DiJoseph, J.F., Blood 103:1807-1814 (2004)) y LL2 (Pawlak-Byczkowska, E.J. *et al.*, Cancer Res. 49:4568-4577 (1989)). El anticuerpo LL2 (anteriormente llamado HPB-2) es un anticuerpo monoclonal IgG2a de ratón dirigido contra el antígeno CD22 (Pawlak-Byczkowska, E.J. *et al.* (1989), *supra*). En las evaluaciones inmunohistológicas *in vitro* se demostró la reactividad del anticuerpo LL2 con 50 de 51 muestras de LNH de linfocitos B de sometidas a prueba, pero no con otras neoplasias malignas o tejidos no linfoides normales (Pawlak-Byczkowska (1989), *supra*; Stein, R. *et al.*, Cancer Immunol. Immunother. 37:293-298 (1993)).

El uso de conjugados de anticuerpo-fármaco para la administración local de agentes citotóxicos o citostáticos, es decir, fármacos para destruir o inhibir células tumorales en el tratamiento del cáncer (Syrigos y Epenetos (1999) Anticancer Research 19:605-614; Niculescu-Duvaz y Springer (1997) Adv. Drug Del. Rev. 26:151-172; patente de EE. UU. n.º 4975278) permite la administración dirigida del resto de fármaco a tumores, y la acumulación intracelular en los mismos, donde la administración sistémica de estos agentes de fármacos no conjugados puede dar como resultado niveles inaceptables de toxicidad para las células normales, así como para las células tumorales que se busca eliminar (Baldwin *et al.*, (1986) Lancet pp. (Mar. 15, 1986):603-05; Thorpe, (1985) "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", en Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications, A. Pinchera *et al.* (ed.s), pp. 475-506). De este modo se busca la eficacia máxima con la mínima toxicidad. Se ha informado de que tanto los anticuerpos policlonales como los anticuerpos monoclonales son útiles en estas estrategias (Rowland *et al.*, (1986) Cancer Immunol. Immunother., 21:183-87). Los fármacos usados en estos procedimientos incluyen daunomicina, doxorubicina, metotrexato y vindesina (Rowland *et al.*, Cancer Immunol. Immunother. 21:183-87 (1986)). Las toxinas usadas en los conjugados de anticuerpo-toxina incluyen toxinas bacterianas, tales como toxina diftérica, toxinas vegetales, tales como ricina, toxinas de fármacos tradicionales, tales como geldanamycin (Kerr *et al.* (1997) Bioconjugate Chem. 8(6):781-784; Mandler *et al.* (2000) Journal of the Nat. Cancer Inst. 92(19): 1573-1581; Mandler *et al.* (2000) Bioorganic & Med. Chem. Letters 10:1025-1028; Mandler *et al.* (2002) Bioconjugate Chem. 13:786-791), maitansinoides (documento EP 1391213; Liu *et al.*, (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:8618-8623), y caliqueamicina (Lode *et al.* (1998) Cancer Res. 58:2928; Hinman *et al.* (1993) Cancer Res. 53:3336-3342). Las toxinas pueden ejercer sus efectos citotóxico y citostático mediante mecanismos que incluyen la unión a tubulina, la unión a ADN o la inhibición de la topoisomerasa (Meyer, D.L. y Senter, P.D. "Recent Advances in Antibody Drug Conjugates for Cancer Therapy" en Annual Reports in Medicinal Chemistry, vol. 38 (2003) capítulo 23, 229-237). Algunos fármacos citotóxicos tienden a ser inactivos o menos activos cuando se conjugan a ligandos de receptores de proteínas o anticuerpos grandes.

ZEVALIN® (ibritumomab tiuxetan, Biogen/Idec) es un conjugado de anticuerpo-radioisótopo compuesto por un anticuerpo monoclonal IgG1 kappa murino dirigido frente al antígeno CD20 encontrado en la superficie de linfocitos B normales y malignos y el radioisótopo ¹¹¹In o ⁹⁰Y unido por un conector quelante de tiourea (Wiseman *et al.*, (2000) Eur. Jour. Nucl. Med. 27(7):766-77; Wiseman *et al.* (2002) Blood 99(12):4336-42; Witzig *et al.* (2002) J. Clin. Oncol. 20(10):2453-63; Witzig *et al.* (2002) J. Clin. Oncol. 20(15):3262-69). Aunque ZEVALIN tiene actividad frente al linfoma no hodgkiniano (LNH) de linfocitos B, su administración da como resultado citopenias graves y prolongadas en la mayoría de los pacientes. MYLOTARG™ (gemtuzumab ozogamicina, Wyeth Pharmaceuticals), un conjugado de anticuerpo y fármaco compuesto por un anticuerpo CD33 hu enlazado a caliqueamicina, se aprobó en el año 2000 para el tratamiento de la leucemia mielógena aguda mediante inyección (Drugs of the Future (2000) 25(7):686; patentes de EE. UU. n.ºs 4970198; 5079233; 5585089; 5606040; 5693762; 5739116; 5767285; 5773001). Cantuzumab mertansina (Immunogen, Inc.), un conjugado de anticuerpo y fármaco compuesto por el anticuerpo huC242 enlazado por medio del conector disulfuro SPP al resto de fármaco de maitansinoide, DM1, se está desarrollando para el tratamiento de cánceres que expresan el antígeno CanAg, tales como de colon, pancreático, gástrico y otros. MLN-2704 (Millennium Pharm., BZL Biologies, Immunogen Inc.), un conjugado de anticuerpo y fármaco compuesto por el anticuerpo monoclonal antiantígeno prostático específico de membrana (PSMA) enlazado al resto de fármaco de maitansinoide, DM1, está en desarrollo para el posible tratamiento de los tumores de próstata. El mismo resto de fármaco de maitansinoide, DM1, se enlazó a través de un conector distinto a disulfuro, SMCC, a un anticuerpo monoclonal

murino de ratón, TA.1 (Chari *et al.* (1992) Cancer Research 52:127-131). Se informó de que este conjugado era 200 veces menos potente que el correspondiente conjugado de conector disulfuro. El conector SMCC se consideró en el mismo que era "no escindible".

Varios compuestos peptídicos cortos se han aislado del molusco marino, *Dolabella auricularia*, y se encontró que tienen actividad biológica (Pettit *et al.* (1993) Tetrahedron 49:9151; Nakamura *et al.* (1995) Tetrahedron Letters 36:5059-5062; Sone *et al.* (1995) Journal Org Chem. 60:4474). Los análogos de estos compuestos también se han preparado, y se encontró que algunos tienen actividad biológica (para una revisión, véase Pettit *et al.* (1998) Anti-Cancer Drug Design 13:243-277). Por ejemplo, auristatina E (documento US 5635483) es un análogo sintético del producto natural marino dolastatina 10, un agente que inhibe la polimerización de tubulina mediante unión al mismo sitio en la tubulina que el antineoplásico vincristina (G.R. Pettit, (1997) Prog. Chem. Org. Nat. Prod. 70:1-79). Dolastatina 10, auristatina PE y auristatina E son péptidos lineales que tienen cuatro aminoácidos, tres de los cuales son únicos para la clase de compuestos de dolastatina, y una amida del extremo C.

Los péptidos de auristatina, auristatina E (AE) y monometilauristatina (MMAE), análogos sintéticos de dolastatina, se conjugaron a: (i) anticuerpos monoclonales quiméricos cBR96 (específico para Lewis Y en carcinomas); (ii) cAC10, que es específico para CD30 en neoplasias malignas hemáticas (Klussman, *et al.* (2004), Bioconjugate Chemistry 15(4):765-773; Doronina *et al.* (2003) Nature Biotechnology 21(7):778-784; "Monomethylvaline Compounds Capable of Conjugation to Ligands"; Francisco *et al.* (2003) Blood 102(4):1458-1465; documento US 2004/0018194; (iii) anticuerpos anti-CD20, tales como Rituxan® (rituximab) (documento WO 04/032828) para el tratamiento de cánceres que expresan CD20 y trastornos inmunitarios; (iv) anticuerpos anti-EphB2 2H9 y anti-IL-8 para el tratamiento del cáncer colorrectal (Mao *et al.* (2004) Cancer Research 64(3):781-788); (v) anticuerpo frente a E-selectina (Bhaskar *et al.* (2003) Cancer Res. 63:6387-6394); y (vi) otros anticuerpos anti-CD30 (documento WO 03/043583). La monometilauristatina (MMAE) también se ha conjugado a 2H9, un anticuerpo frente a EphB2R, que es un receptor de tirosina cinasa de tipo 1 con TM con una estrecha homología entre ratón y ser humano, y se sobreexpresa en células de cáncer colorrectal (Mao *et al.* (2004) Cancer Res. 64:781-788).

Se ha informado de que monometilauristatina MMAF, una variante de auristatina E (MMAE) con una fenilalanina en el extremo C (US 5767237, US 6124431), es menos potente que MMAE, pero más potente cuando se conjuga a anticuerpos monoclonales (Senter *et al.*, Proceedings of the American Association for Cancer Research, volumen 45, resumen número 623, presentado el 28 de marzo de 2004). La auristatina F fenilendiamina (AFP); una variante de fenilalanina de MMAE, se enlazó a un mAb anti-CD70, 1F6, a través del extremo C de 1F6 por medio de un espaciador de fenilendiamina (Law *et al.*, Proceedings of the American Association for Cancer Research, volumen 45, resumen número 625, presentado el 28 de marzo de 2004).

También se han estudiado los conjugados de anticuerpo-toxina anti-CD22 como posibles compuestos terapéuticos. Por ejemplo, los primeros informes describieron inmunotoxinas que contenían la cadena A de la ricina dirigidas frente a anti-CD22 como posibles agentes antineoplásicos (May, R.D. *et al.*, Chemical Abstracts 106(21): 168656x, páginas 35-36 (1987); Ghetie, M.A. *et al.*, Cancer Research 48:2610-2617 (1988); y Amlot, P.L. *et al.*, Blood 82(9):2624-2633 (1993)). Cuando la toxina era un radioisótopo, epratuzumab, la versión de IgG1 humanizada (injerto de CDR de LL2, ha mostrado evidencia de actividad terapéutica para el radioinmunoconjugado (Juweid, M.E. *et al.*, Clin. Cancer Res. 5 (suppl 10):3292s-3303s (1999); Griffiths, G.L. *et al.*, J. Nucl. Med. 44:77-84 (2003); Linden, O. *et al.*, Clin. Cancer Res. 5 (suppl 10):3287s-3291s (1999)).

El conjugado de anticuerpo y fármaco (CAF) anti-CD22-vc-MMAE se desarrolló por Genentech y ya ha demostrado en diferentes modelos de xenoinjerto que es muy eficaz (Polson AG, Williams M *et al.*, Anti-CD22-MCC-DM1: an antibody-drug conjugate with a stable linker for the treatment of non-Hodgkin's lymphoma. Leukemia. 2010 Sep;24(9): 1566-73. Epub 2010 Jul 1). La monometilauristatina E (MMAE), un análogo sintético del producto natural dolastatina 10, es un inhibidor de microtúbulos. Este fármaco citotóxico se conjuga al anticuerpo anti-CD22. Después de la unión del CAF a la célula tumoral, se internaliza y se degrada liberando MMAE y, por lo tanto, induciendo la muerte celular.

Existe una necesidad en la técnica de fármacos adicionales para tratar diversos cánceres relacionados con linfocitos B tales como linfomas tales como linfomas no hodgkinianos y otros trastornos proliferativos de linfocitos B. Los fármacos particularmente útiles para este fin incluyen conjugados de anticuerpo-fármaco anti-CD22 dirigidos a linfocitos B que tienen una toxicidad significativamente menor, pero eficacia terapéutica útil. Estas y otras limitaciones y problemas del pasado se abordan por la presente invención.

Ogura *et al.* (2012) Cancer Science, vol. 103, n.º 5, páginas 933-938, describen el tratamiento de linfoma no hodgkiniano de linfocitos B con recidiva/resistente con rituximab y un conjugado de anticuerpo-fármaco anti-CD22, a saber, inotuzumab ozogamicina. Fayad *et al.* (2013) Journal of Clinical Oncology, vol. 31, n.º 5, páginas 573-583, describen el tratamiento de linfoma no hodgkiniano de linfocitos B con recidiva/resistente con rituximab y un conjugado de anticuerpo-fármaco anti-CD22, a saber, inotuzumab ozogamicina que tiene una alta tasa de respuesta. Un estudio sin enmascaramiento multicéntrico de fase I ((2013), documento XP055128133) describe

el tratamiento de linfoma no hodgkiniano de linfocitos B con recidiva/resistente y leucemia linfocítica crónica con rituximab y un conjugado de anticuerpo-fármaco anti-CD22, a saber, inotuzumab ozogamicina. Un ensayo aleatorizado sin enmascaramiento multicéntrico de fase II ((2013), páginas 1-9, documento XP055128138) describe el tratamiento de linfoma no hodgkiniano de linfocitos B con recidiva/resistente con rituximab y un conjugado de anticuerpo-fármaco anti-CD22, a saber, inotuzumab ozogamicina. El documento WO01/97858 describe el tratamiento de linfoma no hodgkiniano de linfocitos B con recidiva/resistente con rituximab y un anticuerpo radiomarcado (^{90}Y) anti-CD22. Mattes *et al.* (2008), Clinical Cancer Research, vol. 14, n.º 19, páginas 6154-6160, describen el tratamiento de linfoma avanzado con veltuzumab y epratuzumab anti-CD22 con ^{90}Y . La combinación muestra un efecto sinérgico en comparación con cualquier anticuerpo solo. El documento US2011305631 describe el tratamiento de tumores hemáticos con epratuzumab conjugado con SN-38 y veltuzumab. Umana *et al.* (2007) Blood, vol. 110, n.º 11 describen GA101, un anticuerpo anti-CD20 glucomanipulado que tiene una eficacia antineoplásica superior en comparación con rituximab.

La mención de cualquier referencia en esta solicitud no es una admisión de que la referencia es la técnica anterior a esta solicitud.

Sumario de la invención

Ahora se ha descubierto que la combinación de un anticuerpo anti-CD20 afucosilado con un conjugado de anticuerpo CD22-fármaco demostró efectos antiproliferativos significativamente potenciados.

Un aspecto de la invención es un anticuerpo anti-CD20 afucosilado con una cantidad de fucosa de un 60 % o menos de la cantidad total de oligosacáridos (glúcidos) en Asn297, para el tratamiento del cáncer en combinación con un conjugado de anticuerpo CD22-fármaco.

Otro aspecto de la invención es el uso de un anticuerpo anti-CD20 afucosilado con una cantidad de fucosa de un 60 % o menos de la cantidad total de oligosacáridos (glúcidos) en Asn297, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento del cáncer en combinación con un conjugado de anticuerpo CD22-fármaco.

Otro aspecto de la divulgación es un procedimiento de tratamiento de pacientes que padecen cáncer mediante la administración de un anticuerpo anti-CD20 afucosilado con una cantidad de fucosa de un 60 % o menos de la cantidad total de oligosacáridos (glúcidos) en Asn297, en combinación con un conjugado de anticuerpo CD22-fármaco, a un paciente que necesita dicho tratamiento.

En un aspecto, la cantidad de fucosa está entre un 40 % y un 60 % de la cantidad total de oligosacáridos (glúcidos) en Asn297. En otro aspecto, la cantidad de fucosa es un 0 % de la cantidad total de oligosacáridos (glúcidos) en Asn297.

En un aspecto, el anticuerpo anti-CD20 afucosilado es un anticuerpo IgG1. En otro modo de realización, dicho cáncer es un cáncer que expresa CD20, preferentemente un linfoma o leucemia linfocítica. En un aspecto, dicho anticuerpo anti-CD20 afucosilado es un anticuerpo B-Ly1 humanizado. En un modo de realización específico, el anticuerpo anti-CD20 es obinutuzumab (DCI recomendada, WHO Drug Information, vol. 26, n.º 4, 2012, pág. 453). Como se usa en el presente documento, obinutuzumab es sinónimo de GA101 o RO5072759. Este reemplaza todas las versiones previas (por ejemplo, vol. 25, n.º 1, 2011, pág. 75-76), y se conocía anteriormente como afutuzumab (DCI recomendada, WHO Drug Information, vol. 23, n.º 2, 2009, pág. 176; vol. 22, n.º 2, 2008, pág. 124).

En un aspecto, el anticuerpo CD22 en el conjugado de anticuerpo CD22-fármaco comprende (a) una HVR-L1 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 9, 10, 19-23, 32 y 33, y (b) al menos una, dos, tres, cuatro o cinco HVR seleccionadas de:

(1) una HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2;

(2) una HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4;

(3) una HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6;

(4) una HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12; y

(5) una HVR-L3 que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14.

En un aspecto, el conjugado de anticuerpo CD22-fármaco tiene la fórmula Ab-(L-D)p, en la que

(a) Ab es el anticuerpo CD22 como se define en el presente documento;

(b) L es un conector;

(c) D es un resto de fármaco.

En un aspecto del conjugado de anticuerpo CD22-fármaco que tiene la fórmula Ab-(L-D)p, L se selecciona de 6-maleimidocaproílo (MC), maleimidopropanoílo (MP), valina-citrulina (val-cit), alanina-fenilalanina (ala-phe), p-aminobenciloxicarbonilo (PAB), 4-(2-piridiltio)pentanoato de N-succinimidilo (SPP), 4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato de N-succinimidilo (SMCC) y (4-yodo-acetil)aminobenzoato de N-succinimidilo (SIAB). En un aspecto del conjugado de anticuerpo CD22-fármaco que tiene la fórmula Ab-(L-D)p, D se selecciona del grupo que consiste en auristatina, dolostantina, DM1, DM3, DM4, MMAE y MMAF.

En un modo de realización, dicho conjugado de anticuerpo CD22-fármaco es anti-CD22-MC-vc-PAB-MMAE. En un modo de realización específico, el anticuerpo anti-CD22 en dicho conjugado es 10F4.v3.

En un aspecto, el anticuerpo anti-CD20 afucosilado se une a CD20 con una KD de 10^{-8} M a 10^{-13} M.

Un aspecto de la invención es una composición que comprende un anticuerpo anti-CD20 afucosilado con una cantidad de fucosa de un 60 % o menos de la cantidad total de oligosacáridos (glúcidos) en Asn297 (en un aspecto, un anticuerpo B-Ly1 humanizado afucosilado) y un conjugado de anticuerpo CD22-fármaco. En un modo de realización de la composición de acuerdo con la invención, dicho anticuerpo anti-CD20 es obinutuzumab. En un aspecto de la composición de acuerdo con la invención, dicho anticuerpo CD22 en el conjugado de anticuerpo CD22-fármaco comprende (a) una HVR-L1 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 9, 10, 19-23, 32 y 33, y (b) al menos una, dos, tres, cuatro o cinco HVR seleccionas de:

(1) una HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2;

(2) una HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4;

(3) una HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6;

(4) una HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12; y

(5) una HVR-L3 que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14.

En un aspecto de la composición de acuerdo con la invención, dicho anticuerpo CD22 se une al mismo epítipo que un anticuerpo seleccionado de ATCC PTA-7621 (10F4.4.1).

En un modo de realización de la composición de acuerdo con la invención, se administran uno o más de otros agentes citotóxicos, quimioterápicos o antineoplásicos adicionales, o compuestos o radiación ionizante que potencian los efectos de dichos agentes.

En un aspecto del procedimiento de acuerdo con la invención, el conjugado de anticuerpo CD22-fármaco tiene la fórmula Ab-(L-D)p, en la que

(a) Ab es el anticuerpo CD22 como se define en el presente documento;

(b) L es un conector;

(c) D es un resto de fármaco.

En un aspecto de la composición de acuerdo con la invención, el conjugado de anticuerpo CD22-fármaco tiene la fórmula Ab-(L-D)p, en la que L se selecciona de 6-maleimidocaproílo (MC), maleimidopropanoílo (MP), valina-citrulina (val-cit), alanina-fenilalanina (ala-phe), p-aminobenciloxicarbonilo (PAB), 4-(2-piridiltio)pentanoato de N-succinimidilo (SPP), 4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato de N-succinimidilo (SMCC) y (4-yodo-acetil)aminobenzoato de N-succinimidilo (SIAB).

En un aspecto de la composición de acuerdo con la invención, el conjugado de anticuerpo CD22-fármaco tiene la fórmula Ab-(L-D)p, en la que D se selecciona del grupo que consiste en auristatina, dolostantina, DM1, DM3, DM4, MMAE y MMAF.

En un modo de realización de la composición de acuerdo con la invención, el conjugado de anticuerpo CD22-fármaco es anti-CD22-MC-vc-PAB-MMAE para el tratamiento del cáncer. En un modo de realización específico, el anticuerpo anti-CD22 en dicho conjugado es 10F4.v3. Un anticuerpo anti-CD20 afucosilado con una cantidad de fucosa de un 60 % o menos de la cantidad total de oligosacáridos (glúcidos) en Asn297, para el tratamiento del cáncer en combinación con un conjugado de anticuerpo CD22-fármaco.

Un aspecto de la divulgación es un procedimiento de tratamiento de pacientes que padecen cáncer mediante la administración de un anticuerpo anti-CD20 afucosilado con una cantidad de fucosa de un 60 % o menos de la cantidad total de oligosacáridos (glúcidos) en Asn297, en combinación con un conjugado de anticuerpo CD22-fármaco, a un paciente que necesita dicho tratamiento.

5 En un modo de realización de acuerdo con la divulgación, el procedimiento se caracteriza por que dicho cáncer es un cáncer que expresa CD20.

10 En un modo de realización de acuerdo con la divulgación, el procedimiento se caracteriza por que dicho cáncer que expresa CD20 es un linfoma o leucemia linfocítica.

En un aspecto de acuerdo con la divulgación, el procedimiento se caracteriza por que dicho anticuerpo anti-CD20 es un anticuerpo B-Ly1 humanizado.

15 En un modo de realización de acuerdo con la divulgación, el procedimiento se caracteriza por que dicho anticuerpo anti-CD20 es obinutuzumab.

20 En un modo de realización de acuerdo con la divulgación, el procedimiento se caracteriza por que se administran uno o más de otros agentes citotóxicos, quimioterápicos o antineoplásicos adicionales, o compuestos o radiación ionizante que potencian los efectos de dichos agentes.

25 En un aspecto de acuerdo con la divulgación, el procedimiento se caracteriza por que dicho anticuerpo CD22 en el conjugado de anticuerpo CD22-fármaco comprende (a) una HVR-L1 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 9, 10, 19-23, 32 y 33, y (b) al menos una, dos, tres, cuatro o cinco HVR seleccionadas de:

(1) una HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2;

30 (2) una HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4;

(3) una HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6;

(4) una HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12; y

35 (5) una HVR-L3 que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14.

En un aspecto de acuerdo con la divulgación, el procedimiento se caracteriza por que dicho anticuerpo CD22 se une al mismo epítipo que un anticuerpo seleccionado de ATCC PTA-7621 (10F4.4.1).

40 En un aspecto del procedimiento de acuerdo con la divulgación, el conjugado de anticuerpo CD22-fármaco tiene la fórmula Ab-(L-D)p, en la que

(a) Ab es el anticuerpo CD22 como se divulga en el presente documento;

45 (b) L es un conector;

(c) D es un resto de fármaco.

50 En un aspecto del procedimiento de acuerdo con la divulgación, el conjugado de anticuerpo CD22-fármaco tiene la fórmula Ab-(L-D)p, en la que L se selecciona de 6-maleimidocaproilo (MC), maleimidopropanoilo (MP), valina-citrulina (val-cit), alanina-fenilalanina (ala-phe), p-aminobenciloxycarbonilo (PAB), 4-(2-piridiltio)pentanoato de N-succinimidilo (SPP), 4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato de N-succinimidilo (SMCC) y (4-yodoacetil)aminobenzoato de N-succinimidilo (SIAB).

55 En un aspecto del procedimiento de acuerdo con la divulgación, el conjugado de anticuerpo CD22-fármaco tiene la fórmula Ab-(L-D)p, en la que D se selecciona del grupo que consiste en auristatina, dolostantina, DM1, DM3, DM4, MMAE y MMAF.

60 En un modo de realización del procedimiento de acuerdo con la divulgación, el conjugado de anticuerpo CD22-fármaco es anti-CD22-MC-vc-PAB-MMAE.

En un modo de realización del procedimiento de acuerdo con la divulgación, el anticuerpo anti-CD22 en dicho conjugado de anticuerpo CD22-fármaco es 10F4.v3.

Un aspecto de acuerdo con la invención es el uso de un anticuerpo anti-CD20 afucosilado con una cantidad de fucosa de un 60 % o menos de la cantidad total de oligosacáridos (glúcidos) en Asn297, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento del cáncer en combinación con un conjugado de anticuerpo CD22-fármaco.

5 Un modo de realización del uso de acuerdo con la invención se caracteriza por que dicho cáncer es un cáncer que expresa CD20.

Un modo de realización del uso de acuerdo con la invención se caracteriza por que dicho cáncer que expresa CD20 es un linfoma o leucemia linfocítica.

10 Un aspecto del uso de acuerdo con la invención se caracteriza por que dicho anticuerpo anti-CD20 es un anticuerpo B-Ly1 humanizado.

15 Un modo de realización del uso de acuerdo con la invención se caracteriza por que dicho anticuerpo anti-CD20 es obinutuzumab.

Un modo de realización del uso de acuerdo con la invención se caracteriza por que se administran uno o más de otros agentes citotóxicos, quimioterápicos o antineoplásicos adicionales, o compuestos o radiación ionizante que potencian los efectos de dichos agentes.

20 Un aspecto del uso de acuerdo con la invención se caracteriza por que dicho anticuerpo CD22 en el conjugado de anticuerpo CD22-fármaco comprende (a) una HVR-L1 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 9, 10, 19-23, 32 y 33, y (b) al menos una, dos, tres, cuatro o cinco HVR seleccionadas de:

25 (1) una HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2;

(2) una HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4;

30 (3) una HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6;

(4) una HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12; y

35 (5) una HVR-L3 que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14.

Un aspecto del uso de acuerdo con la invención se caracteriza por que dicho anticuerpo CD22 se une al mismo epítipo que un anticuerpo seleccionado de ATCC PTA-7621 (10F4.4.1).

40 Un aspecto del uso de acuerdo con la invención se caracteriza por que el conjugado de anticuerpo CD22-fármaco tiene la fórmula Ab-(L-D)_p, en la que

(a) Ab es el anticuerpo CD22 como se divulga en el presente documento;

45 (b) L es un conector;

(c) D es un resto de fármaco.

50 Un aspecto del uso de acuerdo con la invención se caracteriza por que el conjugado de anticuerpo CD22-fármaco tiene la fórmula Ab-(L-D)_p, en la que L se selecciona de 6-maleimidocaproilo (MC), maleimidopropanoilo (MP), valina-citrulina (val-cit), alanina-fenilalanina (ala-phe), p-aminobenciloxycarbonilo (PAB), 4-(2-piridiltio)pentanoato de N-succinimidilo (SPP), 4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato de N-succinimidilo (SMCC) y (4-yodo-acetil)aminobenzoato de N-succinimidilo (SIAB).

55 Un aspecto del uso de acuerdo con la invención se caracteriza por que el conjugado de anticuerpo CD22-fármaco tiene la fórmula Ab-(L-D)_p, en la que D se selecciona del grupo que consiste en auristatina, dolostantina, DM1, DM3, DM4, MMAE y MMAF.

Un modo de realización del uso de acuerdo con la invención se caracteriza por que el conjugado de anticuerpo CD22-fármaco es anti-CD22-MC-vc-PAB-MMAE.

60 Un modo de realización del uso de acuerdo con la invención se caracteriza por que el anticuerpo anti-CD22 en dicho conjugado de anticuerpo CD22-fármaco es 10F4.v3.

65 Un modo de realización del uso de acuerdo con la invención se caracteriza por que se administran uno o más de otros agentes citotóxicos, quimioterápicos o antineoplásicos adicionales, o compuestos o radiación ionizante que potencian los efectos de dichos agentes.

Descripción de las figuras

Figura 1: Efecto de obinutuzumab (GA101), rituximab, CAF anti-CD22 y las combinaciones de CD22 con GA101 o rituximab en un modelo de linfoma de WSU-DLCL2 en ratones SCID transgénicos para FcγR3a.

Figura 2: Análisis estadístico de los datos de la figura 1 mediante la prueba de Wilcoxon por pares y la prueba del orden logarítmico por pares.

Figura 3: Figuras 3A-3B: La **figura 3A** representa la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo anti-CD22 10F4 murino de la invención (m10F4) alineada con la versión 1 del anticuerpo 10F4 humanizado (h10F4v1) y alineada con la secuencia humana del subgrupo III. Las HVR están encerradas en cuadros (HVR-H1, HVRH2, HVR-H3). Las secuencias que enmarcan a las HVR son las secuencias estructurales (FR-H1 a FR-H4). Las secuencias se enumeran de acuerdo con la numeración de Kabat. La numeración de Kabat, Chothia, y las CDR de contacto se indican sobre las HVR encerradas en cuadros. La **figura 3B** representa la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera del anticuerpo anti-CD22 10F4 murino de la invención (m10F4) alineada con la versión 1 del anticuerpo 10F4 humanizado (h10F4v1) y alineada con la secuencia humana kappa I. Las versiones 2 y 3 del anticuerpo 10F4 humanizado (h10F4v2 y h10F4v3) tienen las mismas secuencias de aminoácidos para la forma madura secretada. Los anticuerpos h10F4v2 y h10F4v3 difieren de h10F4v1 en el aminoácido 28 de la HVR-L1 (N28V). Las HVR están encerradas en cuadros. Las secuencias de FR-L1, FR-L2, FR-L3 y FR-L4 enmarcan las HVR (HVR-L1, HVR-L2, HVR-L3). Las secuencias se enumeran de acuerdo con la numeración de Kabat. La numeración de Kabat, Chothia, y las CDR de contacto se indican sobre las HVR encerradas en cuadros.

Figura 4: La **figura 4** representa las secuencias de aminoácidos de longitud completa (regiones variable y constante) de las cadenas ligera y pesada del anticuerpo anti-CD22 10F4v2 humanizado, isotipo IgG1. Las partes subrayadas representan los dominios constantes.

Descripción detallada de la invención

La invención comprende un anticuerpo anti-CD20 afucosilado de isotipo IgG1 o IgG3 con una cantidad de fucosa de un 60 % o menos de la cantidad total de oligosacáridos (glúcidos) en Asn297, para el tratamiento del cáncer en combinación con un conjugado de anticuerpo CD22-fármaco.

La invención comprende el uso de un anticuerpo anti-CD20 afucosilado de isotipo IgG1 o IgG3 con una cantidad de fucosa de un 60 % o menos de la cantidad total de oligosacáridos (glúcidos) en Asn297, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento del cáncer en combinación con un conjugado de anticuerpo CD22-fármaco.

En un aspecto, la cantidad de fucosa está entre un 40 % y un 60 % de la cantidad total de oligosacáridos (glúcidos) en Asn297.

El término "anticuerpo" engloba las diversas formas de anticuerpos que incluyen pero no se limitan a anticuerpos completos, anticuerpos humanos, anticuerpos humanizados y anticuerpos genomanipulados como anticuerpos monoclonales, anticuerpos quiméricos o anticuerpos recombinantes, así como fragmentos de dichos anticuerpos, siempre y cuando se conserven las propiedades características de acuerdo con la invención. Los términos "anticuerpo monoclonal" o "composición de anticuerpo monoclonal", como se usa en el presente documento, se refieren a una preparación de moléculas de anticuerpo de una única composición de aminoácidos. Por consiguiente, el término "anticuerpo monoclonal humano" se refiere a anticuerpos que presentan una única especificidad de unión que tienen regiones variables y constantes derivadas de las secuencias de inmunoglobulina de estirpe germinal humana. En un aspecto, los anticuerpos monoclonales humanos se producen por un hibridoma que incluye un linfocito B obtenido de un animal transgénico no humano, por ejemplo, un ratón transgénico, que tiene un genoma que comprende un transgén de cadena pesada humana y un transgén de cadena ligera humana, fusionados en una célula inmortalizada.

El término "anticuerpo quimérico" se refiere a un anticuerpo monoclonal que comprende una región variable, es decir, una región de unión de una fuente o especie y al menos una porción de una región constante derivada de una fuente o especie diferente, que se prepara habitualmente por técnicas de ADN recombinante. Son especialmente preferentes los anticuerpos quiméricos que comprenden una región variable murina y una región constante humana. Dichos anticuerpos quiméricos murinos/humanos son el producto de genes de inmunoglobulina expresados que comprenden segmentos de ADN que codifican regiones variables de inmunoglobulina murina y segmentos de ADN que codifican regiones constantes de inmunoglobulina humana. Otras formas de "anticuerpos quiméricos" englobados por la presente invención son aquellas en las que la clase o subclase se ha modificado o cambiado con respecto a la del anticuerpo original. Dichos anticuerpos "quiméricos" se denominan también "anticuerpos de clase cambiada". Los procedimientos para producir anticuerpos quiméricos implican técnicas convencionales de ADN recombinante y de transfección génica, que se

conocen bien en la técnica actualmente. Véanse, por ejemplo, Morrison, S.L., *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81 (1984) 6851-6855; el documento US 5.202.238 y el documento US 5.204.244.

El término "anticuerpo humanizado" se refiere a anticuerpos en los que las regiones estructurales o "regiones determinantes de la complementariedad" (CDR) se han modificado para comprender la CDR de una inmunoglobulina de especificidad diferente en comparación con la de la inmunoglobulina original. En un aspecto preferente, una CDR murina se injerta en la región estructural de un anticuerpo humano para preparar el "anticuerpo humanizado". Véanse, por ejemplo, Riechmann, L. *et al.*, Nature 332 (1988) 323-327 y Neuberger, M.S. *et al.*, Nature 314 (1985) 268-270. Las CDR particularmente preferentes corresponden a las que representan secuencias que reconocen a los antígenos mencionados anteriormente para los anticuerpos quiméricos y bifuncionales.

Se pretende que el término "anticuerpo humano", como se usa en el presente documento, incluya anticuerpos que tienen regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulina de estirpe germinal humana. Los anticuerpos humanos se conocen bien en el estado de la técnica (van Dijk, M.A. y van de Winkel, J.G., Curr. Opin. en Chem. Biol. 5 (2001) 368-374). Basándose en dicha tecnología, se pueden producir anticuerpos humanos frente a una gran variedad de dianas. Se describen ejemplos de anticuerpos humanos, por ejemplo, en Kellermann, S.A. *et al.*, Curr Opin Biotechnol. 13 (2002) 593-597.

Se pretende que el término "anticuerpo humano recombinante", como se usa en el presente documento, incluya todos los anticuerpos humanos que se preparan, expresan, crean o aíslan por medios recombinantes, tales como los anticuerpos aislados de una célula huésped tal como una célula NS0 o CHO o de un animal (por ejemplo, un ratón), que es transgénico para los genes de inmunoglobulina humana o anticuerpos expresados usando un vector de expresión recombinante transfectado en una célula huésped. Dichos anticuerpos humanos recombinantes tienen regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulina de estirpe germinal humana en forma reordenada. Los anticuerpos humanos recombinantes de acuerdo con la invención se han sometido a una hipermutación somática *in vivo*. Por tanto, las secuencias de aminoácidos de las regiones VH y VL de los anticuerpos recombinantes son secuencias que, aunque se derivan de y están relacionadas con las secuencias VH y VL de la estirpe germinal humana, no pueden existir de forma natural dentro del repertorio de estirpes germinales de anticuerpos humanos *in vivo*.

Como se usa en el presente documento, el término "unión" o "unión específica" se refiere a la unión del anticuerpo a un epítipo del antígeno tumoral en un ensayo *in vitro*, preferentemente en un ensayo de resonancia de plasmón (BIAcore, GE-Healthcare Uppsala, Suecia) con antígeno natural purificado. La afinidad de la unión se define por los términos k_a (constante de velocidad para la asociación del anticuerpo del complejo anticuerpo/antígeno), K_D (constante de disociación) y K_D (k_D/k_a). Unión o unión específica significa una afinidad de unión (K_D) de 10^{-8} M o menos, preferentemente de 10^{-8} M a 10^{-13} M (en un aspecto de 10^{-9} M a 10^{-13} M). Por tanto, un anticuerpo afucosilado de acuerdo con la invención se une específicamente al antígeno tumoral con una afinidad de unión (K_D) de 10^{-8} mol/l o menos, preferentemente de 10^{-8} M a 10^{-13} M (en un aspecto de 10^{-9} M a 10^{-13} M).

Se pretende que el término "molécula de ácido nucleico", como se usa en el presente documento, incluya moléculas de ADN y moléculas de ARN. Una molécula de ácido nucleico puede ser monocatenaria o bicatenaria, pero preferentemente es un ADN bicatenario.

Los "dominios constantes" no están implicados directamente en la unión del anticuerpo a un antígeno, pero están implicados en las funciones efectoras (ADCC, unión a complemento y CDC).

La "región variable" (región variable de una cadena ligera (VL), la región variable de una cadena pesada (VH)), como se usa en el presente documento, indica cada una del par de cadenas ligera y pesada que está implicada directamente en la unión del anticuerpo al antígeno. Los dominios de las cadenas ligera y pesada humanas variables tienen la misma estructura general y cada dominio comprende cuatro regiones estructurales (FR) cuyas secuencias están ampliamente conservadas, conectadas por tres "regiones hipervariables" (o regiones determinantes de la complementariedad, CDR). Las regiones estructurales adoptan una conformación de lámina β y las CDR pueden formar bucles que conectan con la estructura de lámina β . Las CDR de cada cadena se mantienen en su estructura tridimensional mediante las regiones estructurales y, junto con las CDR de la otra cadena, forman el sitio de unión a antígeno.

Los términos "región hipervariable" o "porción de unión a antígeno de un anticuerpo", cuando se usan en el presente documento, se refieren a los residuos de aminoácido de un anticuerpo que son los responsables de la unión a antígeno. La región hipervariable comprende residuos de aminoácido de las "regiones determinantes de la complementariedad" o "CDR". Las regiones "estructurales" o "FR" son aquellas regiones de dominio variable distintas de los residuos de la región hipervariable, como se define en el presente documento. Por lo tanto, las cadenas ligera y pesada de un anticuerpo comprenden, del extremo N al C, los dominios FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 y FR4. Especialmente, la CDR3 de la cadena pesada es la región que más contribuye a la unión a antígeno. Las regiones CDR y FR se determinan de acuerdo con la definición estándar de Kabat *et al.*,

Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5.^a ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991) y/o los residuos de un "bucle hipervariable".

El término "anticuerpo afucosilado" se refiere a un anticuerpo de isotipo IgG1 o IgG3 (preferentemente de isotipo IgG1) con un patrón de glucosilación alterado en la región Fc en Asn297 que tiene un nivel reducido de residuos de fucosa. La glucosilación de IgG1 o IgG3 humana se produce en Asn297 como glucosilación con oligosacáridos complejos biantenarios fucosilados de núcleo terminada con hasta 2 residuos Gal. Estas estructuras se designan como residuos glucano G0, G1 (α 1,6 o α 1,3) o G2, en función de la cantidad de residuos Gal terminales (Raju, T.S., BioProcess Int. 1 (2003) 44-53). La glucosilación de tipo CHO de partes Fc del anticuerpo se describe, por ejemplo, en Routier, F.H., Glycoconjugate J. 14 (1997) 201-207. Los anticuerpos que se expresan de forma recombinante en células huésped CHO no glucomodificadas habitualmente están fucosilados en Asn297 en una cantidad de al menos un 85 %. Se debe entender que el término un anticuerpo afucosilado, como se usa en el presente documento, incluye un anticuerpo que no tiene fucosa en su patrón de glucosilación. Se conoce comúnmente que la posición típica de un residuo glucosilado en un anticuerpo es la asparagina en la posición 297, de acuerdo con el sistema de numeración EU ("Asn297").

El "sistema de numeración EU" o "índice EU" se usa, en general, cuando se refiere a un residuo en una región constante de la cadena pesada de inmunoglobulina (por ejemplo, el índice EU que se informa en Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5.^a ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)).

Por tanto, un anticuerpo afucosilado de acuerdo con la invención significa un anticuerpo de isotipo IgG1 o IgG3 (preferentemente de isotipo IgG1) en el que la cantidad de fucosa es un 60 % o menos de la cantidad total de oligosacáridos (glúcidos) en Asn297 (lo que significa que al menos un 40 % o más de los oligosacáridos de la región Fc en Asn297 están afucosilados). En un aspecto, la cantidad de fucosa está entre un 40 % y un 60 % de los oligosacáridos de la región Fc en Asn297. En otro aspecto, la cantidad de fucosa es un 50 % o menos y, en aún otro aspecto, la cantidad de fucosa es un 30 % o menos de los oligosacáridos de la región Fc en Asn297. De acuerdo con la invención, "cantidad de fucosa" significa la cantidad de dicho oligosacárido (fucosa) dentro de la cadena de oligosacárido (glúcido) en Asn297, relacionado con la suma de todos los oligosacáridos (glúcidos) fijados a Asn297 (por ejemplo, estructuras complejas, híbridas y de alto contenido en manosa) medida por espectrometría de masas MALDI-TOF y calculada como valor promedio (para un procedimiento detallado para determinar la cantidad de fucosa, véase, por ejemplo, el documento WO 2008/077546). Además, en un aspecto, los oligosacáridos de la región Fc están bisecados. El anticuerpo afucosilado de acuerdo con la invención se puede expresar en una célula huésped glucomodificada manipulada para expresar al menos un ácido nucleico que codifica un polipéptido que tiene actividad GnTIII en una cantidad suficiente para fucosilar parcialmente los oligosacáridos en la región Fc. En un aspecto, el polipéptido que tiene actividad GnTIII es un polipéptido de fusión. De forma alternativa, la actividad α 1,6-fucosiltransferasa de la célula huésped se puede disminuir o eliminar de acuerdo con el documento US 6.946.292 para generar células huésped glucomodificadas. La cantidad de fucosilación del anticuerpo se puede predeterminar, por ejemplo, mediante condiciones de fermentación (por ejemplo, tiempo de fermentación) o bien mediante combinación de al menos dos anticuerpos con una cantidad de fucosilación diferente. Dichos anticuerpos afucosilados y los procedimientos de glucomanipulación respectivos se describen en los documentos WO 2005/044859, WO 2004/065540, WO 2007/031875, Umana, P., *et al.*, Nature Biotechnol. 17 (1999) 176-180, WO 99/154342, WO 2005/018572, WO 2006/116260, WO 2006/114700, WO 2005/011735, WO 2005/027966, WO 97/028267, US 2006/0134709, US 2005/0054048, US 2005/0152894, WO 2003/035835, WO 2000/061739. Estos anticuerpos glucomanipulados tienen una ADCC aumentada. Otros procedimientos de glucomanipulación que generan anticuerpos afucosilados de acuerdo con la invención se describen por ejemplo, en Niwa, R. *et al.*, J. Immunol. Methods 306 (2005) 151-160; Shinkawa, T., *et al.*, J. Biol. Chem. 278 (2003) 3466-3473; el documento WO 03/055993 o el documento US 2005/0249722.

Por tanto, un aspecto de la invención es un anticuerpo anti-CD20 afucosilado de isotipo IgG1 o IgG3 (preferentemente de isotipo IgG1) que se une específicamente a CD20 con una cantidad de fucosa de un 60 % o menos de la cantidad total de oligosacáridos (glúcidos) en Asn297, para el tratamiento del cáncer en combinación con un conjugado de anticuerpo CD22-fármaco. Otro aspecto de la invención es el uso de un anticuerpo anti-CD20 afucosilado de isotipo IgG1 o IgG3 (preferentemente de isotipo IgG1) que se une específicamente a CD20 con una cantidad de fucosa de un 60 % o menos de la cantidad total de oligosacáridos (glúcidos) en Asn297, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento del cáncer en combinación con un conjugado de anticuerpo CD22-fármaco. En un aspecto, la cantidad de fucosa está entre un 60 % y un 20 % de la cantidad total de oligosacáridos (glúcidos) en Asn297. En un aspecto, la cantidad de fucosa está entre un 60 % y un 40 % de la cantidad total de oligosacáridos (glúcidos) en Asn297. En un aspecto, la cantidad de fucosa está entre un 0 % de la cantidad total de oligosacáridos (glúcidos) en Asn297.

CD20 (también conocido como antígeno CD20 de linfocitos B, antígeno B1 de superficie de linfocitos B, Leu-16, Bp35, BM5 y LF5; la secuencia se caracteriza en la entrada P11836 de la base de datos SwissProt) es una proteína transmembranaria hidrófoba con un peso molecular de aproximadamente 35 kD localizada en linfocitos pre-B y B maduros (Valentine, M.A. *et al.*, J. Biol. Chem. 264 (1989) 11282-11287; Tedder, T.F., *et al.*, Proc. Natl.

Acad. Sci. U.S.A. 85 (1988) 208-212; Stamenkovic, I., *et al.*, J. Exp. Med. 167 (1988) 1975-1980; Einfeld, D.A., *et al.*, EMBO J. 7 (1988) 711-717; Tedder, T.F., *et al.*, J. Immunol. 142 (1989) 2560-2568). El gen humano correspondiente es el miembro 1 de la subfamilia A de 4 dominios que abarcan la membrana, también conocido como MS4A1. Este gen codifica un miembro de la familia de genes 4A que abarcan la membrana. Los miembros de esta familia de proteínas activas se caracterizan por tener rasgos estructurales comunes y límites de empalme intrón/exón similares y presentan patrones de expresión únicos entre células hematopoyéticas y tejidos no linfoides. Este gen codifica la molécula de superficie de linfocitos B que desempeña un papel en el desarrollo y diferenciación de linfocitos B en células plasmáticas. Este miembro de la familia está localizado en 11q12, entre un grupo de miembros de la familia. El empalme alternativo de este gen da como resultado dos variantes de transcripción que codifican la misma proteína.

Los términos "CD20" y "antígeno CD20" se usan indistintamente en el presente documento e incluyen cualquier variante, isoforma y especie homóloga de CD20 humano que se expresa de modo natural por células o se expresa en células transfectadas con el gen CD20. La unión de un anticuerpo de la invención al antígeno CD20 media en la destrucción de células que expresan CD20 (por ejemplo, una célula tumoral), por inactivación del CD20. La destrucción de las células que expresan CD20 se puede producir por uno o más de los siguientes mecanismos: inducción de muerte celular/apoptosis, ADCC y CDC.

Los sinónimos de CD20, como se reconoce en la técnica, incluyen el antígeno CD20 de linfocitos B, antígeno B1 de superficie de linfocitos B, Leu-16, Bp35, BM5 y LF5.

El término "anticuerpo anti-CD20" de acuerdo con la invención es un anticuerpo que se une específicamente al antígeno CD20. En función de las propiedades de unión y de las actividades biológicas de los anticuerpos anti-CD20 con respecto al antígeno CD20, se pueden distinguir dos tipos de anticuerpos anti-CD20 (anticuerpos anti-CD20 de tipo I y de tipo II) de acuerdo con Cragg, M.S. *et al.*, Blood 103 (2004) 2738-2743; y Cragg, M.S. *et al.*, Blood 101 (2003) 1045-1052, véase la tabla 1.

Tabla 1: Propiedades de los anticuerpos anti-CD20 de tipo I y de tipo II

Anticuerpos anti-CD20 de tipo I	Anticuerpos anti-CD20 de tipo II
Epítipo de CD20 de tipo I	Epítipo de CD20 de tipo II
Localizan CD20 en balsas lipídicas	No localizan CD20 en balsas lipídicas
CDC aumentada (si es isotipo IgG1)	CDC disminuida (si es isotipo IgG1)
Actividad ADCC (si es isotipo IgG1)	Actividad ADCC (si es isotipo IgG1)
Capacidad de unión completa	Capacidad de unión reducida
Agregación homotípica	Agregación homotípica más fuerte
Inducción de apoptosis tras la reticulación	Fuerte inducción de muerte celular sin reticulación

Los ejemplos de anticuerpos anti-CD20 de tipo II incluyen, por ejemplo, anticuerpo IgG1 B-Ly1 humanizado (un anticuerpo IgG1 quimérico humanizado, como se divulga en el documento WO 2005/044859), IgG1 11B8 (como se divulga en el documento WO 2004/035607) e IgG1 AT80. Típicamente, los anticuerpos anti-CD20 de tipo II del isotipo IgG1 muestran propiedades de CDC características. Los anticuerpos anti-CD20 de tipo II tienen una CDC disminuida (si es isotipo IgG1) en comparación con los anticuerpos de tipo I del isotipo IgG1.

Los ejemplos de anticuerpos anti-CD20 de tipo I incluyen, por ejemplo, rituximab, IgG3 HI47 (ECACC, hibridoma), IgG1 2C6 (como se divulga en el documento WO 2005/103081), IgG1 2F2 (como se divulga en los documentos WO 2004/035607 y WO 2005/103081) e IgG1 2H7 (como se divulga en el documento WO 2004/056312).

Los anticuerpos anti-CD20 afucosilados de acuerdo con la invención son, en un aspecto, un anticuerpo anti-CD20 de tipo II; en otro aspecto, un anticuerpo B-Ly1 humanizado afucosilado.

Los anticuerpos anti-CD20 afucosilados de acuerdo con la invención tienen una citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) aumentada, a diferencia de los anticuerpos anti-CD20 que no tienen la cantidad de fucosa reducida.

Por "anticuerpo anti-CD20 afucosilado con una citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) aumentada" se entiende un anticuerpo anti-CD20 afucosilado, como se define ese término en el presente documento, que tiene una ADCC aumentada determinada por cualquier procedimiento adecuado conocido por los expertos en la técnica. Un ensayo de ADCC *in vitro* aceptado es como sigue:

- 1) el ensayo usa células diana que se sabe que expresan el antígeno diana reconocido por la región de unión a antígeno del anticuerpo;
 - 2) el ensayo usa como células efectoras las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) humanas aisladas de la sangre de un donante sano elegido aleatoriamente;
 - 3) el ensayo se lleva a cabo de acuerdo con el protocolo siguiente:
 - ii) las PBMC se aíslan usando procedimientos estándar de centrifugación por densidad y se suspenden a 5×10^6 células/ml en medio de cultivo celular RPMI;
 - iii) las células diana se cultivan por procedimientos estándar de cultivo de tejidos, se obtienen de la fase de crecimiento exponencial con una viabilidad superior a un 90 %, se lavan en medio de cultivo celular RPMI, se marcan con 100 microcurios de ^{51}Cr , se lavan dos veces con medio de cultivo celular y se resuspenden en medio de cultivo celular a una densidad de 10^5 células/ml;
 - iv) se transfieren 100 microlitros de la anterior suspensión final de células diana a cada pocillo de una placa de microvaloración de 96 pocillos;
 - v) el anticuerpo se diluye en serie de 4000 ng/ml a 0,04 ng/ml en medio de cultivo celular y se añaden 50 microlitros de las soluciones de anticuerpo resultantes a las células diana en la placa de microvaloración de 96 pocillos, sometiendo a prueba por triplicado diversas concentraciones de anticuerpo que abarcan el intervalo de concentraciones completo anterior;
 - vi) para los controles de liberación máxima (MR), 3 pocillos adicionales de la placa que contienen las células diana marcadas reciben 50 microlitros de una solución acuosa al 2 % (VN) de un detergente no iónico (Nonidet, Sigma, St. Louis), en lugar de la solución de anticuerpo (punto iv anterior);
 - vii) para los controles de liberación espontánea (SR), 3 pocillos adicionales de la placa que contienen las células diana marcadas reciben 50 microlitros de medio de cultivo celular RPMI en lugar de la solución de anticuerpo (punto iv anterior);
 - viii) a continuación, se centrifuga la placa de microvaloración de 96 pocillos a $50 \times g$ durante 1 minuto y se incuba a 4°C durante 1 hora;
 - ix) se añaden 50 microlitros de la suspensión de PBMC (punto i anterior) a cada pocillo para generar una proporción de células efectoras:diana de 25:1 y se colocan las placas en un incubador en una atmósfera con un 5 % de CO_2 a 37°C durante 4 horas;
 - x) se obtiene el sobrenadante libre de células de cada pocillo y se cuantifica la radioactividad liberada experimentalmente (ER) usando un contador gamma;
 - xi) se calcula el porcentaje de lisis específica para cada concentración de anticuerpo de acuerdo con la fórmula $(\text{ER}-\text{MR})/(\text{MR}-\text{SR}) \times 100$, donde ER es el promedio de radioactividad cuantificada (véase el punto ix anterior) para esa concentración de anticuerpo, MR es el promedio de radioactividad cuantificada (véase el punto ix anterior) para los controles MR (véase el punto v anterior) y SR es el promedio de radioactividad cuantificada (véase el punto ix anterior) para los controles SR (véase el punto vi anterior);
 - 4) "ADCC aumentada" se define como un aumento en el porcentaje máximo de lisis específica observada dentro del intervalo de concentraciones de anticuerpo sometido a prueba anterior y/o bien una reducción en la concentración de anticuerpo requerida para lograr la mitad del porcentaje máximo de lisis específica observada dentro del intervalo de concentraciones de anticuerpo sometido a prueba anterior. El aumento de ADCC se refiere a la ADCC, medida con el ensayo anterior, mediada por el mismo anticuerpo, producida por el mismo tipo de células huésped, usando los mismos procedimientos estándar de producción, purificación, formulación y almacenamiento, que se conocen por los expertos en la técnica, pero que no se han producido en células huésped manipuladas para sobreexpresar GnTIII.
- Dicha "ADCC aumentada" se puede obtener por glucomanipulación de dichos anticuerpos, lo que significa potenciar dichas funciones efectoras naturales mediadas por células de los anticuerpos monoclonales manipulando su componente oligosacárido, como se describe en Umana, P. *et al.*, Nature Biotechnol. 17 (1999) 176-180 y US 6.602.684.
- El término "citotoxicidad dependiente del complemento" (CDC) se refiere a la lisis de células tumorales humanas diana por el anticuerpo de acuerdo con la invención en presencia del complemento. La CDC se mide

preferentemente mediante el tratamiento de una preparación de células que expresan CD20 con un anticuerpo anti-CD20 de acuerdo con la invención en presencia del complemento. Se encuentra CDC si, a una concentración de 100 nM, el anticuerpo induce la lisis (muerte celular) de un 20 % o más de las células tumorales después de 4 horas. El ensayo se realiza preferentemente con células tumorales marcadas con ^{51}Cr o Eu y medición del ^{51}Cr o Eu liberado. Los controles incluyen la incubación de las células tumorales diana con el complemento pero sin el anticuerpo.

El anticuerpo "rituximab" (anticuerpo de referencia; ejemplo de un anticuerpo anti-CD20 de tipo I) es un anticuerpo monoclonal quimérico humano, genomanipulado, que contiene el dominio constante murino gamma 1, dirigido frente al antígeno CD20 humano. Este anticuerpo quimérico contiene dominios constantes gamma 1 humanos y se identifica con el nombre "C2B8" en el documento US 5.736.137 (Anderson *et al.*) publicado el 17 de abril de 1998, asignado a IDEC Pharmaceuticals Corporation. Rituximab está aprobado para el tratamiento de pacientes con linfoma no hodgkiniano de linfocitos B, positivo para CD20, con recidiva o resistente, de escasa malignidad o folicular. Los estudios *in vitro* del mecanismo de acción han demostrado que rituximab presenta citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) humana (Reff, M.E., *et al.*, Blood 83(2) (1994) 435-445). Además, presenta una actividad significativa en ensayos que miden la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC). Rituximab no está afucosilado.

Tabla 2

Anticuerpo	Cantidad de fucosa
Rituximab (no afucosilado)	>85 %
B-Ly1 humanizado natural afucosilado glucomanipulado (B-HH6-B-KV1) (no afucosilado)	>85 %
B-Ly1 humanizado afucosilado glucomanipulado (B-HH6-B-KV1 GE)	45-50 %

El término "anticuerpo B-Ly1 humanizado" se refiere al anticuerpo B-Ly1 humanizado como se divulga en los documentos WO 2005/044859 y WO 2007/031875, que se obtuvo a partir del anticuerpo monoclonal murino anti-CD20 B-Ly1 (región variable de la cadena pesada murina (VH): SEQ ID NO: 28; región variable de la cadena ligera murina (VL): SEQ ID NO: 29 (véase Poppema, S. y Visser, L., Biotest Bulletin 3 (1987) 131-139) por quimerización con un dominio constante humano de IgG1 y posterior humanización (véanse los documentos WO 2005/044859 y WO 2007/031875). Estos "anticuerpos B-Ly1 humanizados" se divulgan en detalle en los documentos WO 2005/044859 y WO 2007/031875.

En un aspecto, el "anticuerpo B-Ly1 humanizado" tiene la región variable de la cadena pesada (VH) seleccionada del grupo de SEQ ID NO: 3 a SEQ ID NO: 46 (de B-HH2 a B-HH9 y de B-HL8 a B-HL17 de los documentos WO 2005/044859 y WO 2007/031875). En un aspecto específico, dicho dominio variable se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO: 30, 31, 34, 36, 38, 40 y 42 (B-HH2, BHH-3, B-HH6, B-HH8, B-HL11 y B-HL13 de los documentos WO 2005/044859 y WO 2007/031875). En un aspecto específico, el "anticuerpo B-Ly1 humanizado" tiene la región variable de la cadena ligera (VL) de SEQ ID NO: 47 (B-KV1 de los documentos WO 2005/044859 y WO 2007/031875). En un aspecto específico, el "anticuerpo B-Ly1 humanizado" tiene una región variable de la cadena pesada (VH) de SEQ ID NO: 34 (B-HH6 de los documentos WO 2005/044859 y WO 2007/031875) y una región variable de la cadena ligera (VL) de SEQ ID NO: 47 (B-KV1 de los documentos WO 2005/044859 y WO 2007/031875). Además, en un aspecto, el anticuerpo B-Ly1 humanizado es un anticuerpo IgG1. De acuerdo con la invención, dichos anticuerpos B-Ly1 humanizados afucosilados son glucomanipulados (GE) en la región Fc de acuerdo con los procedimientos descritos en los documentos WO 2005/044859, WO 2004/065540, WO 2007/031875, Umana, P. *et al.*, Nature Biotechnol. 17 (1999) 176-180 y el documento WO 99/154342. En un aspecto, el B-Ly1 humanizado afucosilado glucomanipulado es B-HH6-B-KV1 GE. En un modo de realización, el anticuerpo anti-CD20 es obinutuzumab (DCI recomendada, WHO Drug Information, vol. 26, n.º 4, 2012, pág. 453). Como se usa en el presente documento, obinutuzumab es sinónimo de GA101. Este reemplaza todas las versiones previas (por ejemplo, vol. 25, n.º 1, 2011, pág. 75-76), y se conocía anteriormente como afutuzumab (DCI recomendada, WHO Drug Information, vol. 23, n.º 2, 2009, pág. 176; vol. 22, n.º 2, 2008, pág. 124).

Dichos anticuerpos B-Ly1 humanizados glucomanipulados tienen un patrón de glucosilación alterado en la región Fc, teniendo preferentemente un nivel reducido de residuos de fucosa. En un aspecto, la cantidad de fucosa es un 60 % o menos de la cantidad total de oligosacáridos en Asn297 (en un aspecto la cantidad de fucosa está entre un 40 % y un 60 %, en otro aspecto la cantidad de fucosa es un 50 % o menos, y en aún otro aspecto la cantidad de fucosa es un 30 % o menos). En otro aspecto, los oligosacáridos de la región Fc están preferentemente bisecados. Estos anticuerpos B-Ly1 humanizados glucomanipulados tienen una ADCC aumentada.

"CD22" como se usa en el presente documento es una sialoglicoproteína restringida a linfocitos B de 135 kDa expresada en la superficie de los linfocitos B solamente en las fases de diferenciación maduras (Dörken, B. *et al.*, J. Immunol 136:4470-4479 (1986)). La forma predominante de CD22 en los seres humanos es CD22beta que contiene siete dominios de la superfamilia de inmunoglobulinas en el dominio extracelular (Wilson, G.L. *et al.*, J. Exp. Med. 173:137-146 (1991)). Una forma variante, CD22 alfa, carece de los dominios 3 y 4 de la superfamilia de inmunoglobulinas (Stamenkovic, I. y Seed, B., Nature 345: 74-77 (1990)). Se ha demostrado que la unión a ligando a CD22 humano está asociada con los dominios 1 y 2 de la superfamilia de inmunoglobulinas (también denominados epítomos 1 y 2) (Engel, P. *et al.*, J. Exp. Med. 181:1581-1586, 1995).

El término "anticuerpo anti-CD22" se refiere a un anticuerpo que inhibe al CD22.

En un aspecto, se proporciona un anticuerpo que se une a CD22 en dicho conjugado de anticuerpo-fármaco de acuerdo con la invención, en el que el anticuerpo comprende al menos una, dos, tres, cuatro, cinco o seis HVR seleccionadas de:

(1) una HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2;

(2) una HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4;

(3) una HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6;

(4) una HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10;

(5) una HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12; y

(6) una HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14.

En otro aspecto, un anticuerpo que se une a CD22 en dicho conjugado de anticuerpo-fármaco de acuerdo con la invención comprende (a) una HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10, y (b) al menos una, dos, tres, cuatro o cinco HVR seleccionadas de:

(1) una HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2;

(2) una HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4;

(3) una HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6;

(4) una HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12; y

(6) una HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14.

En otro aspecto, un anticuerpo que se une a CD22 en dicho conjugado de anticuerpo-fármaco de acuerdo con la invención comprende (a) una HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9, y (b) al menos una, dos, tres, cuatro o cinco HVR seleccionadas de:

(1) una HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2;

(2) una HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4;

(3) una HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6;

(4) una HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12; y

(6) una HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14.

En otro aspecto, un anticuerpo que se une a CD22 en dicho conjugado de anticuerpo-fármaco de acuerdo con la invención comprende (a) una HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6, y (b) al menos una, dos, tres, cuatro o cinco HVR seleccionadas de:

(1) una HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2;

(2) una HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4;

(3) una HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9;

(4) una HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12; y

(5) una HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14.

5 En otro aspecto, un anticuerpo que se une a CD22 en dicho conjugado de anticuerpo-fármaco de acuerdo con la invención comprende (a) una HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6, y (b) al menos una, dos, tres, cuatro o cinco HVR seleccionadas de:

(1) una HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2;

10

(2) una HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4;

(3) una HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10;

15

(4) una HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12; y

(5) una HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14.

20 En un aspecto, el anticuerpo comprende una HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10. En un aspecto, el anticuerpo comprende además una HVR-H1, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 y una HVR-H2, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4. En un aspecto, el anticuerpo comprende además una HVR-L2, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12 y una HVR-L3, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14.

25 En determinados aspectos, cualquiera de los anticuerpos anteriores comprende además al menos una región estructural seleccionada de una región estructural consenso del subgrupo III de VH y una región estructural consenso del subgrupo I de VL.

30 En un aspecto, se proporciona un anticuerpo que se une a CD22 en dicho conjugado de anticuerpo-fármaco de acuerdo con la invención, en el que el anticuerpo comprende un dominio variable de la cadena pesada que tiene al menos un 90 %, al menos un 91 %, al menos un 92 %, al menos un 93 %, al menos un 94 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 %, o al menos un 99 % de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16. En un aspecto, el anticuerpo comprende un dominio variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 16.

35

En un aspecto, el anticuerpo comprende además un dominio variable de la cadena ligera que tiene al menos un 90 %, al menos un 91 %, al menos un 92 %, al menos un 93 %, al menos un 94 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 % o al menos un 99 % de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 17. En un aspecto, el anticuerpo comprende un dominio variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 17.

40

En un aspecto, el anticuerpo comprende además un dominio variable de la cadena ligera que tiene al menos un 90 %, al menos un 91 %, al menos un 92 %, al menos un 93 %, al menos un 94 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 % o al menos un 99 % de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 18. En un aspecto, el anticuerpo comprende un dominio variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 18.

45

En un aspecto, el anticuerpo comprende un dominio variable de la cadena pesada que tiene al menos un 90 %, al menos un 91 %, al menos un 92 %, al menos un 93 %, al menos un 94 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % o un 100 % de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16 y un dominio variable de la cadena ligera que tiene al menos un 90 %, al menos un 91 %, al menos un 92 %, al menos un 93 %, al menos un 94 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % o un 100 % de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 17. En un aspecto, el anticuerpo comprende un dominio variable de la cadena pesada que tiene al menos un 90 %, al menos un 91 %, al menos un 92 %, al menos un 93 %, al menos un 94 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % o un 100 % de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16 y un dominio variable de la cadena ligera que tiene al menos un 90 %, al menos un 91 %, al menos un 92 %, al menos un 93 %, al menos un 94 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % o un 100 % de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 18. En un aspecto, el dominio variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16 y el dominio variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 17. En un aspecto, el dominio variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16 y el dominio variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 18.

60

65

En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo anti-CD22 que comprende (a) una, dos o tres HVR de VH seleccionadas de las que se muestran en la figura 3A y/o (b) una, dos o tres HVR de VL seleccionadas de las que se muestran en la figura 3B. En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo anti-CD22 que comprende un dominio variable de la cadena pesada seleccionado de los que se muestran en la figura 3A y un dominio variable de la cadena ligera seleccionado de los que se muestran en la figura 3B.

En determinados aspectos, se proporciona un polinucleótido que codifica cualquiera de los anticuerpos anteriores. En un aspecto, se proporciona un vector que comprende el polinucleótido. En un aspecto, se proporciona una célula huésped que comprende el vector. En un aspecto, la célula huésped es eucariota. En un aspecto, la célula huésped es una célula de ovario de hámster chino (CHO). En un aspecto, se proporciona un procedimiento de preparación de un anticuerpo anti-CD22, en el que el procedimiento comprende cultivar la célula huésped en condiciones adecuadas para la expresión del polinucleótido que codifica el anticuerpo, y aislar el anticuerpo.

En un aspecto, se proporciona un anticuerpo que se une a CD22 expresado en la superficie de una célula en dicho conjugado de anticuerpo-fármaco de acuerdo con la invención. En un aspecto, el anticuerpo se une a un epítipo dentro de una región de CD22 humano o de ratón que comprende el dominio 1 o el dominio 2 o los dominios 1 y 2. En un aspecto, la célula es una célula de mamífero. En un aspecto, la célula es una célula humana. En un aspecto, la célula es una célula cancerosa. En un aspecto, la célula es un linfocito B. En un modo de realización, la célula cancerosa es un linfocito B.

En determinados aspectos, cualquiera de los anticuerpos anteriores es un anticuerpo monoclonal. En un aspecto, el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo seleccionado de un fragmento Fab, Fab'-SH, Fv, scFv o (Fab')₂. En un aspecto, el anticuerpo es humanizado. En un aspecto, el anticuerpo es humano.

En un aspecto, los anticuerpos de la invención incluyen anticuerpos manipulados con cisteína, donde uno o más aminoácidos de un anticuerpo original se reemplazan por un aminoácido de cisteína libre, como se divulga en el documento WO2006/034488. Se puede manipular así, es decir, mutar, cualquier forma de anticuerpo anti-CD22. Por ejemplo, un fragmento de anticuerpo Fab original se puede manipular para formar un Fab manipulado con cisteína, denominado en el presente documento "tioFab". De forma similar, se puede manipular un anticuerpo monoclonal original para formar un "tioMab". Cabe señalar que una única mutación de sitio genera un único residuo de cisteína manipulado en un tioFab, mientras que una única mutación de sitio genera dos residuos de cisteína manipulados en un tioMab, debido a la naturaleza dimérica del anticuerpo IgG. Los anticuerpos anti-CD22 manipulados con cisteína de la invención incluyen anticuerpos monoclonales, anticuerpos monoclonales humanizados o quiméricos y fragmentos de unión a antígeno de anticuerpos, polipéptidos de fusión y análogos que se unen preferentemente a polipéptidos CD22 asociados a células. Un anticuerpo manipulado con cisteína puede comprender de forma alternativa un anticuerpo que comprende una cisteína en una posición divulgada en el presente documento en el anticuerpo o Fab, que resulta del diseño de la secuencia y/o la selección del anticuerpo, sin alterar necesariamente un anticuerpo original, tal como mediante el diseño y la selección de anticuerpos de presentación en fagos o a través de diseño *de novo* de secuencias estructurales de cadena ligera y/o cadena pesada y regiones constantes. Un anticuerpo manipulado con cisteína comprende uno o más aminoácidos de cisteína libre que tiene un valor de reactividad de tiol en los intervalos de 0,6 a 1,0; de 0,7 a 1,0 o de 0,8 a 1,0. Un aminoácido de cisteína libre es un residuo de cisteína que se ha manipulado en el anticuerpo original y no forma parte de un puente de disulfuro. Los anticuerpos manipulados con cisteína son útiles para la fijación de compuestos citotóxicos y/o equivalentes en el sitio de la cisteína manipulada a través de, por ejemplo, una maleimida o haloacetilo. La reactividad nucleófila de la funcionalidad tiol de un residuo de Cys con respecto a un grupo maleimida es aproximadamente 1000 veces superior en comparación con cualquier otra funcionalidad de aminoácido en una proteína, tal como un grupo amino de residuos de lisina o el grupo amino N-terminal. La funcionalidad tiol específica en reactivos de yodoacetilo y maleimida puede reaccionar con grupos amina, pero se requieren un pH más alto (>9,0) y tiempos de reacción más largos (Garman, 1997, *Non-Radioactive Labelling: A Practical Approach*, Academic Press, Londres).

En un aspecto, un anticuerpo anti-CD22 manipulado con cisteína en dicho conjugado de anticuerpo-fármaco de acuerdo con la invención comprende una cisteína manipulada en una cualquiera de las siguientes posiciones, donde la posición es el número de acuerdo con Kabat *et al.*, en la cadena ligera (véase Kabat *et al.* (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5.^a ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD) y de acuerdo con la numeración EU en la cadena pesada (incluyendo la región Fc) (véase Kabat *et al.* (1991), *supra*), en el que la región constante de la cadena ligera comienza en la posición 108 (numeración de Kabat) y la región constante de la cadena pesada comienza en la posición 118 (numeración EU). La posición también se puede denominar por su posición en la numeración secuencial de los aminoácidos de la cadena ligera o de la cadena pesada de longitud completa. De acuerdo con un aspecto de la invención, un anticuerpo anti-CD22 en dicho conjugado de anticuerpo-fármaco de acuerdo con la invención comprende una cisteína manipulada en LC-V205C (número de Kabat: Val 205; número secuencial 210 manipulada para que sea Cys en esa posición). De acuerdo con un aspecto, un anticuerpo anti-CD22 comprende una cisteína manipulada en HC-A118C (número EU: Ala 118; número secuencial 121 manipulada para que sea Cys en esa posición). De acuerdo con un aspecto, un anticuerpo anti-CD22 comprende una cisteína manipulada en Fc-S400C (número

EU: Ser 400; número secuencial 403 manipulada para que sea Cys en esa posición). En otros aspectos, la cisteína manipulada de la cadena pesada (incluyendo la región Fc) se encuentra en una cualquiera de las siguientes posiciones (de acuerdo con la numeración EU): 41, 88, 116, 118, 120, 171, 282, 375 o 400. Por tanto, los cambios en el aminoácido en estas posiciones para un anticuerpo original anti-CD22 de la invención son: A41C, A88C, S116C, A118C, T120C, A171C, V282C, S375C o S400C. En otros aspectos, la cisteína manipulada de la cadena ligera se encuentra en una cualquiera de las siguientes posiciones (de acuerdo con la numeración de Kabat): 15, 43, 110, 144, 168, 205. Por tanto, los cambios en el aminoácido en estas posiciones para un anticuerpo original anti-CD22 de la invención son: V15C, A43C, V110C, A144C, S168C o V205C.

Un anticuerpo anti-CD22 manipulado con cisteína en dicho conjugado de anticuerpo-fármaco de acuerdo con la invención comprende uno o más aminoácidos de cisteína libre, en el que el anticuerpo anti-CD22 manipulado con cisteína se une a un polipéptido CD22 y se prepara mediante un procedimiento que comprende reemplazar uno o más residuos de aminoácido de un anticuerpo original anti-CD22 por cisteína, en el que el anticuerpo original comprende al menos una secuencia de HVR seleccionada de:

(a) una secuencia de HVR-L1 **RSSQSIVHSNGNTFLE** (SEQ ID NO: 9) o la secuencia **RSSQSIVHSGNTFLE** (SEQ ID NO: 10) (figura 3B);

(b) una secuencia de HVR-L2 **KVSNRFS** (SEQ ID NO: 12) (figura 3B);

(c) una secuencia de HVR-L3 **FQGSQFPYT** (SEQ ID NO: 14) (figura 3B);

(d) una secuencia de HVR-H1 **GYEFSRSWMN** (SEQ ID NO: 2) (figura 3A);

(e) una secuencia de HVR-H2 **GRIYPGDGDTNYSKGFKG** (SEQ ID NO: 4) (figura 3A); y

(f) una secuencia de HVR-H3 **DGSSWDWYFDV** (SEQ ID NO: 6) (figura 3A).

En un determinado aspecto, la invención se refiere a un anticuerpo anti-CD22 manipulado con cisteína en dicho conjugado de anticuerpo-fármaco de acuerdo con la invención, que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente un 80 % de identidad de secuencia de aminoácidos, de forma alternativa al menos aproximadamente un 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia de aminoácidos, con un anticuerpo manipulado con cisteína que tiene una secuencia de aminoácidos de longitud completa como se divulga en el presente documento, o una secuencia de aminoácidos de anticuerpo manipulado con cisteína que carece del péptido señal como se divulga en el presente documento.

Todavía en otro aspecto, la invención se refiere a un anticuerpo anti-CD22 manipulado con cisteína aislado en dicho conjugado de anticuerpo-fármaco de acuerdo con la invención que comprende una secuencia de aminoácidos que está codificada por una secuencia de nucleótidos que hibrida con el complemento de una molécula de ADN que codifica (a) un anticuerpo manipulado con cisteína que tiene una secuencia de aminoácidos de longitud completa como se divulga en el presente documento, (b) una secuencia de aminoácidos de anticuerpo manipulado con cisteína que carece del péptido señal como se divulga en el presente documento, (c) un dominio extracelular de una proteína de anticuerpo manipulado con cisteína transmembranaria, con o sin el péptido señal, como se divulga en el presente documento, (d) una secuencia de aminoácidos codificada por cualquiera de las secuencias de ácido nucleico divulgadas en el presente documento o (e) cualquier otro fragmento específicamente definido de una secuencia de aminoácidos de anticuerpo manipulado con cisteína de longitud completa como se divulga en el presente documento.

En un aspecto específico, la invención proporciona un anticuerpo anti-CD22 manipulado con cisteína aislado en dicho conjugado de anticuerpo-fármaco de acuerdo con la invención sin la secuencia señal N-terminal y/o sin la metionina iniciadora y está codificado por una secuencia de nucleótidos que codifica dicha secuencia de aminoácidos como se describe en el presente documento. Los procedimientos para producir los mismos también se describen en el presente documento, en los que dichos procedimientos comprenden cultivar una célula huésped que comprende un vector que comprende la molécula de ácido nucleico codificadora apropiada en condiciones adecuadas para la expresión del anticuerpo manipulado con cisteína y la recuperación del anticuerpo manipulado con cisteína del cultivo celular.

Otro aspecto de la invención proporciona un anticuerpo anti-CD22 manipulado con cisteína aislado en dicho conjugado de anticuerpo-fármaco de acuerdo con la invención que presenta supresión en el dominio transmembranario o bien inactivación en el dominio transmembranario. Los procedimientos para producir el mismo también se describen en el presente documento, en el que esos procedimientos comprenden cultivar una

célula huésped que comprende un vector que comprende la molécula de ácido nucleico codificadora apropiada en condiciones adecuadas para la expresión del anticuerpo manipulado con cisteína y la recuperación del anticuerpo manipulado con cisteína del cultivo celular.

En otros aspectos, la invención proporciona anticuerpos quiméricos anti-CD22 manipulados con cisteína aislados en dicho conjugado de anticuerpo-fármaco de acuerdo con la invención que comprende cualquiera de los anticuerpos manipulados con cisteína descritos en el presente documento fusionados a un polipéptido heterógeno (no CD22). Un ejemplo de dichas moléculas quiméricas comprende cualquiera de los anticuerpos manipulados con cisteína descritos en el presente documento fusionados a un polipéptido heterógeno tal como, por ejemplo, una secuencia identificadora de epítipo o una región Fc de una inmunoglobulina.

El anticuerpo anti-CD22 manipulado con cisteína en dicho conjugado de anticuerpo-fármaco de acuerdo con la invención puede ser un anticuerpo monoclonal, fragmento de anticuerpo, anticuerpo quimérico, anticuerpo humanizado, anticuerpo monocatenario o anticuerpo que inhibe competitivamente la unión de un anticuerpo polipeptídico anti-CD22 a su epítipo antigénico respectivo. Los anticuerpos de la presente invención se pueden conjugar opcionalmente a un agente inhibidor del crecimiento o agente citotóxico tal como una toxina, incluyendo, por ejemplo, una auristatina, un antibiótico, un isótopo radioactivo, una enzima nucleolítica o similar. Los anticuerpos de la presente invención se pueden producir opcionalmente en células CHO o células bacterianas y preferentemente inhiben el crecimiento o la proliferación o inducen la muerte de una célula a la que se unen. Para fines de diagnóstico, los anticuerpos de la presente invención se pueden marcar de forma detectable, fijar a un soporte sólido o similares.

En otros aspectos de la presente invención, la invención proporciona vectores que comprenden ADN que codifica cualquiera de los anticuerpos anti-CD22 en dicho conjugado de anticuerpo-fármaco de acuerdo con la invención y los anticuerpos anti-CD22 manipulados con cisteína en dicho conjugado de anticuerpo-fármaco de acuerdo con la invención descritos en el presente documento. También se proporcionan células huésped que comprenden cualquiera de dichos vectores. A modo de ejemplo, las células huésped pueden ser células CHO, células de *E. coli* o células de levadura. Se proporciona además un procedimiento para producir cualquiera de los polipéptidos descritos en el presente documento y comprende cultivar células huésped en condiciones adecuadas para la expresión del polipéptido deseado y recuperar el polipéptido deseado del cultivo celular.

Los anticuerpos manipulados con cisteína pueden ser útiles en el tratamiento del cáncer e incluyen anticuerpos específicos para los receptores de superficie celular y transmembranarios, y antígenos asociados a tumores (AAT). Dichos anticuerpos se pueden usar como anticuerpos no marcados (no conjugados a un fármaco o resto marcador) o como conjugados de anticuerpo-fármaco (CAF). Los anticuerpos manipulados con cisteína de la invención se pueden acoplar de manera eficiente y específica para el sitio con un reactivo que reaccione con tiol. El reactivo que reacciona con tiol puede ser un reactivo conector multifuncional, un reactivo marcador de captura, un reactivo fluoróforo o un producto intermedio fármaco-conector. El anticuerpo manipulado con cisteína se puede marcar con un marcador detectable, inmovilizar en un soporte de fase sólida y/o conjugar con un resto de fármaco. La reactividad del tiol se puede generalizar a cualquier anticuerpo donde la sustitución de aminoácidos con aminoácidos de cisteína reactivos se pueda realizar dentro de los intervalos de la cadena ligera seleccionada de los intervalos de aminoácidos: de L-10 a L-20; de L-38 a L-48; de L-105 a L-115; de L-139 a L-149; de L-163 a L-173; y dentro de los intervalos de la cadena pesada seleccionados de los intervalos de aminoácidos: de H-35 a H-45; de H-83 a H-93; de H-114 a H-127; y de H-170 a H-184, y en la región Fc dentro de los intervalos seleccionados de H-268 a H-291; de H-319 a H-344; de H-370 a H-380; y de H-395 a H-405, donde la numeración de las posiciones de aminoácidos comienza en la posición 1 del sistema de numeración de Kabat (Kabat *et al.* (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5.^a ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD) y continúa secuencialmente a partir de entonces como se divulga en el documento WO2006034488. La reactividad del tiol también se puede generalizar a determinados dominios de un anticuerpo, tales como el dominio constante de la cadena ligera (CL) y los dominios constantes de la cadena pesada, CH1, CH2 y CH3. Los reemplazos de cisteína que dan como resultado valores de reactividad del tiol de 0,6 y superiores se pueden realizar en los dominios constantes de la cadena pesada α , δ , ϵ , γ y μ de anticuerpos inalterados: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, respectivamente, incluyendo las subclases de IgG: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2. Dichos anticuerpos y sus usos se divulgan en el documento WO2006/034488.

Los anticuerpos manipulados con cisteína de la invención preferentemente conservan la capacidad de unión a antígeno de sus homólogos de anticuerpos originales naturales. Por tanto, los anticuerpos manipulados con cisteína se pueden unir, preferentemente de forma específica, a antígenos. Dichos antígenos incluyen, por ejemplo, antígenos asociados a tumores (AAT), proteínas receptoras de superficie celular y otras moléculas de superficie celular, proteínas transmembranarias, proteínas de señalización, factores reguladores de la supervivencia celular, factores reguladores de la proliferación celular, moléculas asociadas con (por ejemplo, que se sabe o se sospecha que contribuyen funcionalmente al) desarrollo o diferenciación de tejidos, linfocinas, citocinas, moléculas implicadas en la regulación del ciclo celular, moléculas implicadas en la vasculogénesis y moléculas asociadas con (por ejemplo, que se sabe o se sospecha que contribuyen funcionalmente a) la angiogénesis. El antígeno asociado a tumor puede ser un factor de diferenciación de grupo (es decir, una proteína CD, que incluye pero no se limita a CD22). Los anticuerpos anti-CD22 manipulados con cisteína de la

invención conservan la capacidad de unión a antígeno de su anticuerpo original anti-CD22. Por tanto, los anticuerpos anti-CD22 manipulados con cisteína de la invención se pueden unir, preferentemente de forma específica, a antígenos CD22 que incluyen isoformas anti-CD22 humanas beta y/o alfa, incluso cuando dichos antígenos se expresan en la superficie de células, incluyendo, sin limitación, linfocitos B.

Una descripción detallada de anticuerpos anti-CD22 ejemplares como parte del conjugado de anticuerpo-fármaco en la combinación de la invención con un anticuerpo anti-CD20 como se define en el presente documento es como sigue:

Aspectos específicos de anticuerpos anti-CD22

En un aspecto, la invención proporciona una combinación de un anticuerpo anti-CD20 como se define en el presente documento con un anticuerpo en dicho conjugado de anticuerpo-fármaco de acuerdo a la invención que comprende al menos una, dos, tres, cuatro, cinco o seis HVR seleccionadas de (a) una HVR-H1, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2; (b) una HVR-H2, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4; (c) una HVR-H3, que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 6; (d) una HVR-L1, que comprende la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de SEQ ID NO: 9, 10, 19, 20, 21, 22, 23; (e) una HVR-L2, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12; y (f) una HVR-L3, que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 14.

En un aspecto, la invención proporciona una combinación de un anticuerpo anti-CD20 como se define en el presente documento con un anticuerpo anti-CD22 en dicho conjugado de anticuerpo-fármaco de acuerdo con la invención que comprende al menos una, al menos dos o las tres secuencias de HVR de VH seleccionadas de (a) una HVR-H1, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2; (b) una HVR-H2, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4; (c) una HVR-H3, que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 6. En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo anti-CD22 en dicho conjugado de anticuerpo-fármaco de acuerdo con la invención que comprende una HVR-H1, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2. En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo anti-CD22 que comprende una HVR-H2, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4. En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo anti-CD22 que comprende una HVR-H3, que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 6.

En un aspecto, la invención proporciona una combinación de un anticuerpo anti-CD20 como se define en el presente documento con un anticuerpo anti-CD22 en dicho conjugado de anticuerpo-fármaco de acuerdo con la invención que comprende una HVR-H3, que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 6 y una HVR-H1, que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 2.

En un aspecto, la invención proporciona una combinación de un anticuerpo anti-CD20 como se define en el presente documento con un anticuerpo anti-CD22 en dicho conjugado de anticuerpo-fármaco de acuerdo con la invención que comprende una HVR-H3, que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 6 y una HVR-H2, que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 4.

En un aspecto, la invención proporciona una combinación de un anticuerpo anti-CD20 como se define en el presente documento con un anticuerpo anti-CD22 que comprende una HVR-H1, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 y una HVR-H2, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4.

En un aspecto, la invención proporciona una combinación de un anticuerpo anti-CD20 como se define en el presente documento con un anticuerpo anti-CD22 en dicho conjugado de anticuerpo-fármaco de acuerdo con la invención que comprende una HVR-H1, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2; una HVR-H2, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4; y una HVR-H3, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6.

En un aspecto, la invención proporciona una combinación de un anticuerpo anti-CD20 como se define en el presente documento con un anticuerpo anti-CD22 en dicho conjugado de anticuerpo-fármaco de acuerdo con la invención que comprende al menos una, al menos dos o las tres secuencias de HVR de VL seleccionadas de (a) una HVR-L1, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9 o de SEQ ID NO: 10; (b) una HVR-L2, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12; y (c) una HVR-L3, que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 14. En un aspecto, la invención proporciona una combinación de un anticuerpo anti-CD20 como se define en el presente documento con un anticuerpo anti-CD22 que comprende una HVR-L1, que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 9. En un aspecto, la invención proporciona una combinación de un anticuerpo anti-CD20 como se define en el presente documento con un anticuerpo anti-CD22 que comprende una HVR-L1, que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 10. En un aspecto, la invención proporciona una combinación de un anticuerpo anti-CD20 como se define en el presente documento con un anticuerpo anti-CD22 en dicho conjugado de anticuerpo-fármaco de acuerdo con la invención que comprende una HVR-L1, que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 19-23. En un aspecto, la HVR-L1 comprende la secuencia de

aminoácidos de SEQ ID NO: 9, en la que N28 se reemplaza por V (un cambio del aminoácido N28V, que genera SEQ ID NO: 10). En un aspecto, la HVR-L1 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9, en la que N28 se reemplaza por A (un cambio del aminoácido N28A, que genera SEQ ID NO: 19). En un aspecto, la HVR-L1 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9, en la que N28 se reemplaza por Q (un cambio del aminoácido N28Q, que genera SEQ ID NO: 20). En un aspecto, la HVR-L1 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9, en la que N28 se reemplaza por S (un cambio del aminoácido N28S, que genera SEQ ID NO: 21). En un aspecto, la HVR-L1 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9, en la que N28 se reemplaza por D (un cambio del aminoácido N28D, que genera SEQ ID NO: 22). En un aspecto, la HVR-L1 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9, en la que N28 se reemplaza por I (un cambio del aminoácido N28I, que genera SEQ ID NO: 23). En un aspecto, la invención proporciona una combinación de un anticuerpo anti-CD20 como se define en el presente documento con un anticuerpo anti-CD22 en dicho conjugado de anticuerpo-fármaco de acuerdo con la invención que comprende una HVR-L1, que comprende la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de SEQ ID NO: 9, 10, 19, 20, 21, 22, 23. En un aspecto, la HVR-L1 es una cualquiera de SEQ ID NO: 9, 10, 19, 20, 21, 22 o 23 y el aminoácido en la posición N30 (asparagina en la posición 30) se reemplaza por A (un cambio del aminoácido N30A). En un aspecto, la HVR-L1 es una cualquiera de SEQ ID NO: 9, 10, 19, 20, 21, 22 o 23 y el aminoácido en la posición N30 (asparagina en la posición 30) se reemplaza por Q (un cambio del aminoácido N30Q).

En un aspecto, la invención proporciona una combinación de un anticuerpo anti-CD20 como se define en el presente documento con un anticuerpo anti-CD22 en dicho conjugado de anticuerpo-fármaco de acuerdo con la invención que comprende (a) una HVR-H3, que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6 y (b) una HVR-L3, que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14. En algunos aspectos, el anticuerpo CD22 en dicho conjugado de anticuerpo-fármaco de acuerdo con la invención comprende además (a) una HVR-H1, que comprende SEQ ID NO: 2 y una HVR-H2, que comprende SEQ ID NO: 4.

En un aspecto, la invención proporciona una combinación de un anticuerpo anti-CD20 como se define en el presente documento con un anticuerpo anti-CD22 en dicho conjugado de anticuerpo-fármaco de acuerdo con la invención que comprende (a) una HVR-H3, que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6 y (b) una HVR-L2, que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12. En algunos aspectos, el anticuerpo CD22 en dicho conjugado de anticuerpo-fármaco de acuerdo con la invención comprende además (a) una HVR-H1, que comprende SEQ ID NO: 2 y una HVR-H2, que comprende SEQ ID NO: 4.

En un aspecto, la invención proporciona una combinación de un anticuerpo anti-CD20 como se define en el presente documento con un anticuerpo anti-CD22 en dicho conjugado de anticuerpo-fármaco de acuerdo con la invención que comprende (a) una HVR-H3, que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6 y (b) una HVR-L1, que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 9, 10, 19, 20, 21, 22 y 23. En algunos aspectos, el anticuerpo CD22 comprende además (a) una HVR-H1, que comprende SEQ ID NO: 2 y una HVR-H2, que comprende SEQ ID NO: 4. En algunos aspectos, la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9, 10, 19, 20, 21, 22 o 23 comprende un cambio del aminoácido N30A o N30Q. En algunos aspectos, el anticuerpo CD22 en dicho conjugado de anticuerpo-fármaco de acuerdo con la invención comprende además la HVR-L2, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12. En algunos aspectos, el anticuerpo CD22 en dicho conjugado de anticuerpo-fármaco de acuerdo con la invención comprende además la HVR-L3, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14.

En un aspecto, la invención proporciona una combinación de un anticuerpo anti-CD20 como se define en el presente documento con un anticuerpo anti-CD22 en dicho conjugado de anticuerpo-fármaco de acuerdo con la invención que comprende (a) una HVR-H1, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2; (b) una HVR-H2, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4; (c) una HVR-H3, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6; (d) una HVR-L1, que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 9, 10, 19, 20, 21, 22, 23; (e) una HVR-L2, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12; y una HVR-L3, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14. En algunos aspectos, la invención proporciona además que la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9, 10, 19, 20, 21, 22 o 23 seleccionada como HVR-L1 se modifica por el cambio de un aminoácido N30A o un N30Q.

En un aspecto, la invención proporciona una combinación de un anticuerpo anti-CD20 como se define en el presente documento con un anticuerpo anti-CD22 en dicho conjugado de anticuerpo-fármaco de acuerdo con la invención que comprende un dominio variable de la cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 16 (véase la figura 3A, h10F4v1). En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo anti-CD22 en dicho conjugado de anticuerpo-fármaco de acuerdo con la invención que comprende un dominio variable de la cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 17 (véase la figura 3B, h10F4v1). En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo anti-CD22 en dicho conjugado de anticuerpo-fármaco de acuerdo con la invención que comprende un dominio variable de la cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 18 (véase la figura 3B, h10F4v3).

En un aspecto, la invención proporciona una combinación de un anticuerpo anti-CD20 como se define en el presente documento con un anticuerpo anti-CD22 en dicho conjugado de anticuerpo-fármaco de acuerdo con la invención que comprende una cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 26 (véase la figura 3A, m10F4). En

un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo anti-CD22 en dicho conjugado de anticuerpo-fármaco de acuerdo con la invención que comprende una cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 27 (véase la figura 3B, m10F4).

- 5 En un aspecto, la invención proporciona una combinación de un anticuerpo anti-CD20 como se define en el presente documento con un anticuerpo anti-CD22 en dicho conjugado de anticuerpo-fármaco de acuerdo con la invención que comprende 1, 2, 3, 4, 5 o 6 de las secuencias de HVR del anticuerpo 10F4.4.1 producido por el hibridoma depositado en la ATCC y que tiene el número de acceso PTA-7621.
- 10 En un aspecto, la invención proporciona una combinación de un anticuerpo anti-CD20 como se define en el presente documento con un anticuerpo anti-CD22 en dicho conjugado de anticuerpo-fármaco de acuerdo con la invención que comprende 1, 2, 3, 4, 5 o 6 de las secuencias de HVR del anticuerpo 5E8.1.8 producido por el hibridoma depositado en la ATCC y que tiene el número de acceso PTA-7620.
- 15 Un anticuerpo anti-CD22 en dicho conjugado de anticuerpo-fármaco de acuerdo con la invención para su combinación con un anticuerpo anti-CD20 como se define en el presente documento puede comprender cualquier secuencia de dominio variable de la región estructural adecuada, siempre que el anticuerpo conserve la capacidad de unión a CD22. Por ejemplo, en algunos aspectos, los anticuerpos anti-CD22 en dicho conjugado de anticuerpo-fármaco de acuerdo con la invención comprenden una secuencia consenso con región estructural de la cadena pesada del subgrupo III humano. En un aspecto de estos anticuerpos, la secuencia consenso con región estructural de la cadena pesada comprende la(s) sustitución/sustituciones en la posición 71, 73 y/o 78. En un aspecto de estos anticuerpos, la posición 71 es A, la posición 73 es T y/o la posición 78 es A. En un aspecto, estos anticuerpos comprenden una secuencia estructural de dominio variable de la cadena pesada de huMAb4D5-8, por ejemplo, SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7 (FR-H1, FR-H2, FR-H3, FR-H4, respectivamente). El huMAb4D5-8 se conoce comercialmente como anticuerpo anti-HER2 HERCEPTIN®, Genentech, Inc., South San Francisco, CA, EE. UU.; al que también se hace referencia en las patentes de EE. UU. n.ºs 6.407.213 y 5.821.337, y en Lee *et al.*, J. Mol. Biol. (2004), 340(5): 1073-1093. En uno de dichos aspectos, estos anticuerpos comprenden además una secuencia consenso con región estructural de la cadena ligera humana. En uno de dichos aspectos, estos anticuerpos comprenden una secuencia estructural de dominio variable de la cadena ligera de huMAb4D5-8, por ejemplo, SEQ ID NO: 8, 1, 13, 15 (FR-L1, FR-L2, FR-L3, FR-L4, respectivamente).
- 20
- 25
- 30

En un aspecto, un anticuerpo anti-CD22 en dicho conjugado de anticuerpo-fármaco de acuerdo con la invención para su combinación con un anticuerpo anti-CD20 como se define en el presente documento comprende un dominio variable de la cadena pesada que comprende una secuencia estructural y regiones hipervariables, en el que la secuencia estructural comprende la secuencias de FR-H1-FR-H4 SEQ ID NO: 1, 3, 5 y 7, respectivamente; la HVR-H1 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2; la HVR-H2 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4; y la HVR-H3 comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 6. En un aspecto, un anticuerpo anti-CD22 comprende un dominio variable de la cadena ligera que comprende una secuencia estructural y regiones hipervariables, en el que la secuencia estructural comprende las secuencias de FR-L1-FR-L4 de SEQ ID NO: 8, 11, 13 y 15, respectivamente; la HVR-L1 comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 9, 10, 19, 20, 21, 22 y 23, en el que una cualquiera de SEQ ID NO: 9-10 o 19-23 puede comprender un cambio del aminoácido N30A o N30Q; la HVR-L2 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12; y la HVR-L3 comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 14. En un aspecto de estos anticuerpos, el dominio variable de la cadena pesada comprende SEQ ID NO: 16 y el dominio variable de la cadena ligera comprende SEQ ID NO: 17 o 18.

35

40

45

En algunos aspectos, la invención proporciona una combinación de un anticuerpo anti-CD20 como se define en el presente documento con un anticuerpo anti-CD22 en dicho conjugado de anticuerpo-fármaco de acuerdo con la invención que comprende un dominio variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 90 %, un 91 %, un 92 %, un 93 %, un 94 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 % o un 99 % de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16. En algunos aspectos, una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 90 %, un 91 %, un 92 %, un 93 %, un 94 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 % o un 99 % de identidad de secuencia contiene sustituciones, inserciones o deleciones en relación con la secuencia de referencia, pero un anticuerpo que comprenda esa secuencia de aminoácidos conserva la capacidad de unión a CD22. En algunos aspectos, se han sustituido, insertado y/o delecionado un total de 1 a 10 aminoácidos en una secuencia de SEQ ID NO: 16. En algunos aspectos, las sustituciones, inserciones o deleciones se producen en regiones fuera de las HVR (es decir, en las FR). En algunos aspectos, un anticuerpo anti-CD22 en dicho conjugado de anticuerpo-fármaco de acuerdo con la invención para su combinación con un anticuerpo anti-CD20 como se define en el presente documento comprende un dominio variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 16.

50

55

60

En algunos modos de realización, la invención proporciona una combinación de un anticuerpo anti-CD20 como se define en el presente documento con un anticuerpo anti-CD22 en dicho conjugado de anticuerpo-fármaco de

65

acuerdo con la invención que comprende un dominio variable de la cadena pesada como se representa a continuación.

1 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg
 Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Glu Phe Ser Arg Ser Trp Met Asn Trp Val Arg
 Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly Arg Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp
Thr Asn Tyr Ser Gly Lys Phe Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys
 Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 Cys Ala Arg Asp Gly Ser Ser Trp Asp Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr
 5 Leu Val Thr Val Ser Ser 113 (SEQ ID NO: 16) (los residuos de HVR están subrayados).

En algunos aspectos, las secuencias FR y de HVR de cadena pesada comprenden las siguientes:

10 HVR-H1 (Gly Tyr Glu Phe Ser Arg Ser Trp Met Asn, SEQ ID NO: 2)

HVR-H2 (Gly Arg Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr Ser Gly Lys Phe Lys Gly, SEQ ID
 NO: 4)

15 HVR-H3 (Asp Gly Ser Ser Trp Asp Trp Tyr Phe Asp Val, SEQ ID NO: 6)

FR-H1 (Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser
 Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser, SEQ ID NO: 1)

20 FR-H2 (Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val, SEQ ID NO: 3)

FR-H3 (Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met
 Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg, SEQ ID NO: 5)

25 FR-H4 (Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser, SEQ ID NO: 7)

En algunos modos de realización, la invención proporciona una combinación de un anticuerpo anti-CD20 como
 se define en el presente documento con un anticuerpo anti-CD22 en dicho conjugado de anticuerpo-fármaco de
 acuerdo con la invención que comprende un dominio variable de la cadena ligera como se representa a
 continuación.

30 1 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val
 Thr Ile Thr Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Asn Gly Asn Thr Phe Leu Glu
 Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn
Arg Phe Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
Ser Gln Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys 108 (SEQ ID NO: 17) (los
 residuos de HVR están subrayados y la posición N28 está en negrita)

35 o

1 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val
 Thr Ile Thr Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Val Gly Asn Thr Phe Leu Glu
 Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn
Arg Phe Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
Ser Gln Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys 108 (SEQ ID NO: 18) (los
 residuos de HVR están subrayados y N28V está en negrita).

5 En algunos aspectos, las secuencias de HVR de cadena ligera comprenden las siguientes:

HVR-L1 (Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Asn Gly Asn Thr Phe Leu Glu, SEQ ID NO: 9)

HVR-L1 (Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Val Gly Asn Thr Phe Leu Glu, SEQ ID NO: 10)

10 HVR-L1 (Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Ala Gly Asn Thr Phe Leu Glu, SEQ ID NO: 19)

HVR-L1 (Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Gln Gly Asn Thr Phe Leu Glu, SEQ ID NO: 20)

15 HVR-L1 (Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Ser Gly Asn Thr Phe Leu Glu, SEQ ID NO: 21)

HVR-L1 (Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Asp Gly Asn Thr Phe Leu Glu, SEQ ID NO: 22)

20 HVR-L1 (Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Ile Gly Asn Thr Phe Leu Glu, SEQ ID NO: 23)

HVR-L1 (Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Ile Gly Ala Thr Phe Leu Glu, SEQ ID NO: 24)

HVR-L1 (Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Ile Gly Gln Thr Phe Leu Glu, SEQ ID NO: 25)

25 HVR-L2 (Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser, SEQ ID NO: 12)

HVR-L3 (Phe Gln Gly Ser Gln Phe Pro Tyr Thr, SEQ ID NO: 14)

En algunos aspectos, las secuencias FR de cadena ligera comprenden las siguientes:

30 FR-L1 (Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys, SEQ ID NO: 8);

35 FR-L2 (Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr, SEQ ID NO: 11);

FR-L3 (Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys, SEQ ID NO: 13);

40 FR-L4 (Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys, SEQ ID NO: 15).

En un aspecto, la invención proporciona una combinación de un anticuerpo anti-CD20 como se define en el
 presente documento con un anticuerpo anti-CD22 en dicho conjugado de anticuerpo-fármaco de acuerdo con la
 invención que comprende un dominio variable de la cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos
 que tiene al menos un 90 %, un 91 %, un 92 %, un 93 %, un 94 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 % o un
 45 99 % de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 17 o 18. En
 algunos aspectos, una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 90 %, un 91 %, un 92 %, un 93 %, un
 94 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 % o un 99 % de identidad de secuencia contiene sustituciones,
 inserciones o deleciones en relación con la secuencia de referencia, pero un anticuerpo que comprenda esa

secuencia de aminoácidos conserva la capacidad de unión a CD22. En algunos aspectos, se han sustituido, insertado y/o deletado un total de 1 a 10 aminoácidos en una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 17 o 18. En algunos aspectos, las sustituciones, inserciones o deleciones se producen en regiones fuera de las HVR (es decir, en las FR). En algunos aspectos, un anticuerpo anti-CD22 en dicho conjugado de anticuerpo-fármaco de acuerdo con la invención para la combinación con un anticuerpo anti-CD20 como se define en el presente documento comprende un dominio variable de la cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 17 o 18.

En un aspecto, la invención proporciona una combinación de un anticuerpo anti-CD20 como se define en el presente documento con un anticuerpo anti-CD22 en dicho conjugado de anticuerpo-fármaco de acuerdo con la invención que comprende (a) un dominio variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 90 %, un 91 %, un 92 %, un 93 %, un 94 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 % o un 99 % de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 16; y (b) un dominio variable de la cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 90 %, un 91 %, un 92 %, un 93 %, un 94 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 % o un 99 % de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 17 o 18. En algunos aspectos, una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 90 %, un 91 %, un 92 %, un 93 %, un 94 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 % o un 99 % de identidad de secuencia contiene sustituciones, inserciones o deleciones en relación con la secuencia de referencia, pero un anticuerpo que comprenda esa secuencia de aminoácidos conserva la capacidad de unión a CD22. En algunos aspectos, se han sustituido, insertado y/o deletado un total de 1 a 10 aminoácidos en la secuencia de referencia. En algunos aspectos, las sustituciones, inserciones o deleciones se producen en regiones fuera de las HVR (es decir, en las FR). En algunos aspectos, un anticuerpo anti-CD22 en dicho conjugado de anticuerpo-fármaco de acuerdo con la invención para su combinación con un anticuerpo anti-CD20 como se define en el presente documento comprende un dominio variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16 y un dominio variable de la cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 18.

En un aspecto, el anticuerpo anti-CD22 en dicho conjugado de anticuerpo-fármaco de acuerdo con la invención comprende 1, 2, 3, 4, 5 o 6 de las regiones hipervariables del anticuerpo 5E8.1.8 producido por el hibridoma depositado en la ATCC y que tiene el n.º de acceso PTA-7620.

Fragmentos de anticuerpo

La presente invención engloba fragmentos de anticuerpo. Se pueden generar fragmentos de anticuerpo mediante medios tradicionales, tales como digestión enzimática o por técnicas recombinantes. En determinadas circunstancias existen ventajas en el uso de fragmentos de anticuerpo, en lugar de anticuerpos completos. El tamaño más pequeño de los fragmentos permite un aclaramiento rápido y puede dar lugar a un acceso mejorado a tumores sólidos. Para obtener una revisión de determinados fragmentos de anticuerpo, véase Hudson *et al.* (2003) Nat. Med. 9:129-134.

Se han desarrollado diversas técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpo. Tradicionalmente, estos fragmentos se derivaban por medio de digestión proteolítica de anticuerpos inalterados (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 actualmente se pueden producir directamente por células huésped recombinantes. Todos los fragmentos de anticuerpo Fab, Fv y ScFv se pueden expresar en y secretar a partir de *E. coli*, permitiendo, por tanto, la producción fácil de grandes cantidades de estos fragmentos. Los fragmentos de anticuerpo se pueden aislar a partir de las colecciones de fagos de anticuerpos analizados anteriormente. De forma alternativa, los fragmentos Fab'-SH se pueden recuperar directamente a partir de *E. coli* y acoplar químicamente para formar fragmentos F(ab')₂ (Carter *et al.*, Bio/Technology 10:163-167 (1992)). De acuerdo con otro enfoque, se pueden aislar directamente fragmentos F(ab')₂ a partir del cultivo de células huésped recombinantes. Se describen el fragmento Fab y F(ab')₂ con semivida *in vivo* aumentada que comprende residuos de epítipo de unión a receptor de rescate en la patente de EE. UU. n.º 5.869.046. Otras técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpo serán evidentes para el experto en la técnica. En determinados aspectos, un anticuerpo es un fragmento Fv monocaténario (scFv). Véase el documento WO 93/16185; patentes de EE. UU. n.ºs 5.571.894; y 5.587.458. Fv y scFv son las únicas especies con sitios de combinación inalterados que están desprovistos de regiones constantes; por tanto, pueden ser adecuados para la unión no específica reducida durante el uso *in vivo*. Las proteínas de fusión de scFv se pueden construir para generar la fusión de una proteína efectora en el extremo aminoterminal o bien carboxilo terminal de un scFv. Véase Antibody Engineering, ed. Borrebaeck, *supra*. El fragmento de anticuerpo también puede ser un "anticuerpo lineal", por ejemplo, como se describe en la patente de EE. UU. 5.641.870, por ejemplo. Dichos anticuerpos lineales pueden ser monoespecíficos o biespecíficos.

Anticuerpos humanizados

La invención engloba anticuerpos humanizados. Se conocen en la técnica diversos procedimientos para humanizar anticuerpos no humanos. Por ejemplo, un anticuerpo humanizado puede tener uno o más residuos de

aminoácido introducidos en el mismo a partir de una fuente que no sea humana. Estos residuos de aminoácido no humanos se denominan a menudo residuos de "importación", que típicamente se toman de un dominio variable de "importación". La humanización se puede realizar esencialmente siguiendo el procedimiento de Winter y sus colaboradores (Jones *et al.* (1986) *Nature* 321:522-525; Riechmann *et al.* (1988) *Nature* 332:323-327; Verhoeyen *et al.* (1988) *Science* 239:1534-1536), sustituyendo secuencias de la región hipervariable con las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano. Por consiguiente, dichos anticuerpos "humanizados" son anticuerpos quiméricos (patente de EE. UU. n.º 4.816.567) en los que se ha sustituido sustancialmente menos de un dominio variable humano inalterado con la secuencia correspondiente de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados son típicamente anticuerpos humanos en los que algunos residuos de la región hipervariable y posiblemente algunos residuos de FR se sustituyen por residuos de sitios análogos en anticuerpos de roedor.

La elección de los dominios variables humanos, tanto ligeros como pesados, que se van a usar en la preparación de los anticuerpos humanizados puede ser importante para reducir la antigenicidad. De acuerdo con el denominado procedimiento de "mejor ajuste", la secuencia del dominio variable de un anticuerpo de roedor se criba frente a toda la colección de secuencias de dominio variable humanas conocidas. A continuación, la secuencia humana que es más próxima a la del roedor se acepta como la región estructural humana para el anticuerpo humanizado (Sims *et al.* (1993) *J. Immunol.* 151:2296; Chothia *et al.* (1987) *J. Mol. Biol.* 196:901. Otro procedimiento usa una región estructural particular derivada de la secuencia consenso de todos los anticuerpos humanos de un subgrupo particular de las cadenas ligera o pesada. Se puede usar la misma región estructural para varios anticuerpos humanizados diferentes (Carter *et al.* (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4285; Presta *et al.* (1993) *J. Immunol.*, 151:2623).

Es además deseable, en general, que los anticuerpos se humanicen con conservación de alta afinidad por el antígeno y otras propiedades biológicas favorables. Para lograr este objetivo, de acuerdo con un procedimiento, los anticuerpos humanizados se preparan mediante un procedimiento de análisis de las secuencias originales y diversos productos humanizados conceptuales usando modelos tridimensionales de las secuencias originales y humanizadas. Los modelos tridimensionales de inmunoglobulina están comúnmente disponibles y son conocidos por los expertos en la técnica. Están disponibles programas informáticos que ilustran y presentan estructuras conformacionales tridimensionales probables de secuencias de inmunoglobulinas candidatas seleccionadas. La inspección de estas representaciones permite el análisis del papel probable de los residuos en el funcionamiento de la secuencia de inmunoglobulina candidata, es decir, el análisis de residuos que influyen en la capacidad de la inmunoglobulina candidata de unirse a su antígeno. De esta manera, los residuos de FR se pueden seleccionar y combinar a partir de las secuencias de receptor y de importación de manera que se logre la característica de anticuerpo deseada, tal como una afinidad aumentada por el/los antígeno(s) diana. En general, los residuos de la región hipervariable están implicados directamente y de forma más sustancial en influir en la unión a antígeno.

Anticuerpos humanos

Los anticuerpos anti-CD22 humanos de la invención se pueden construir combinando secuencia(s) del dominio variable de clones Fv seleccionada(s) de colecciones de presentación en fagos derivadas de seres humanos con secuencia(s) del dominio constante humanas conocidas como se describe anteriormente. De forma alternativa, se pueden preparar anticuerpos anti-CD22 monoclonales humanos de la invención mediante el procedimiento de hibridoma. Las líneas celulares de heteromieloma ratón-humano y mieloma humano para la producción de anticuerpos monoclonales humanos se han descrito, por ejemplo, por Kozbor *J. Immunol.*, 133:3001 (1984); Brodeur *et al.*, *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1987); y Boerner *et al.*, *J. Immunol.*, 147:86 (1991).

Actualmente es posible producir animales transgénicos (por ejemplo, ratones) que, tras la inmunización, pueden producir un repertorio completo de anticuerpos humanos en ausencia de producción de inmunoglobulina endógena. Por ejemplo, se ha descrito que la delección homocigótica del gen de la región de unión de cadena pesada (JH) del anticuerpo en ratones mutantes quiméricos y de la estirpe germinal da como resultado la inhibición completa de la producción de anticuerpos endógenos. La transferencia de la matriz génica de inmunoglobulina de estirpe germinal humana a dichos ratones mutantes de estirpe germinal dará como resultado la producción de anticuerpos humanos tras la exposición al antígeno. Véase, por ejemplo, Jakobovits *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU.*, 90: 2551 (1993); Jakobovits *et al.*, *Nature*, 362: 255 (1993); Bruggemann *et al.*, *Year in Immunol.*, 7: 33 (1993).

También se puede usar el barajado de genes para derivar anticuerpos humanos de anticuerpos no humanos, por ejemplo, de roedor, donde el anticuerpo humano tiene afinidades y especificidades similares al anticuerpo no humano de partida. De acuerdo con este procedimiento, que también se llama "sellado de epítipo", la región variable de la cadena pesada o bien ligera de un fragmento de anticuerpo no humano obtenido mediante técnicas de presentación en fagos como se describe anteriormente se reemplaza por un repertorio de genes de dominio V humanos, creando una población de quimeras de scFv o Fab de cadena humana/cadena no humana. La selección con antígeno da como resultado el aislamiento de un scFv o Fab quimérico de cadena humana/cadena no humana, en el que la cadena humana restablece el sitio de unión a antígeno destruido tras la

eliminación de la cadena no humana correspondiente en el clon de presentación en fagos primario, es decir, el epítipo regula (sella) la elección del ligando de cadena humana. Cuando se repite el procedimiento a fin de reemplazar la cadena no humana restante, se obtiene un anticuerpo humano (véase el documento de PCT WO 93/06213 publicado el 1 de abril de 1993). A diferencia de la humanización tradicional de anticuerpos no humanos mediante injerto de CDR, esta técnica proporciona anticuerpos completamente humanos, que no tienen residuos de FR o CDR de origen no humano.

Anticuerpos biespecíficos

Los anticuerpos biespecíficos son anticuerpos monoclonales que tienen especificidades de unión por al menos dos antígenos diferentes. En determinados aspectos, los anticuerpos biespecíficos son anticuerpos humanos o humanizados. En determinados aspectos, una de las especificidades de unión es para CD22 y la otra es para cualquier otro antígeno. En determinados aspectos, los anticuerpos biespecíficos se pueden unir a dos epítopos diferentes de CD22. También se pueden usar anticuerpos biespecíficos para localizar agentes citotóxicos con respecto a las células que expresan CD22. Estos anticuerpos poseen un brazo de unión a CD22 y un brazo que se une al agente citotóxico, tal como, por ejemplo, saporina, antiinterferón α , alcaloide de la vinca, cadena A de ricina, metotrexato o hapteno con isótopo radioactivo. Los anticuerpos biespecíficos se pueden preparar como anticuerpos de longitud completa o fragmentos de anticuerpo (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos de $F(ab')_2$).

Los procedimientos para preparar anticuerpos biespecíficos se conocen en la técnica. Tradicionalmente, la producción recombinante de anticuerpos biespecíficos se basa en la coexpresión de dos pares de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina, donde las dos cadenas pesadas tienen diferentes especificidades (Milstein y Cuello, *Nature*, 305: 537 (1983)). Debido a la combinación aleatoria de las cadenas pesada y ligera de inmunoglobulina, estos hibridomas (cuadromas) producen una mezcla posible de 10 moléculas de anticuerpo diferentes, de las cuales solamente una tiene la estructura biespecífica correcta. La purificación de la molécula correcta, que se hace habitualmente mediante etapas de cromatografía de afinidad, es bastante engorrosa, y los rendimientos del producto son bajos. Se divulgan procedimientos similares en el documento WO 93/08829, publicado el 13 de mayo de 1993, y en Trautner *et al.*, *EMBO J.*, 10: 3655 (1991).

De acuerdo con un enfoque diferente, los dominios variables de anticuerpo con las especificidades de unión deseadas (sitios de combinación anticuerpo-antígeno) se fusionan con secuencias de dominio constante de inmunoglobulina. La fusión, por ejemplo, es con un dominio constante de la cadena pesada de inmunoglobulina, que comprende al menos parte de las regiones bisagra, CH2 y CH3. En determinados aspectos, la primera región constante de la cadena pesada (CH1), que contiene el sitio necesario para la unión a la cadena ligera, está presente en al menos una de las fusiones. Los ADN que codifican las fusiones de la cadena pesada de inmunoglobulina y, si se desea, la cadena ligera de inmunoglobulina, se insertan en vectores de expresión separados, y se cotransfectan en un organismo huésped adecuado. Esto proporciona gran flexibilidad en el ajuste de las proporciones mutuas de los tres fragmentos polipeptídicos en los aspectos cuando las proporciones desiguales de las tres cadenas polipeptídicas usadas en la construcción proporcionan los rendimientos óptimos. Sin embargo, es posible insertar las secuencias codificantes de dos o las tres cadenas polipeptídicas en un vector de expresión donde la expresión de al menos dos cadenas polipeptídicas en proporciones iguales da como resultado altos rendimientos o donde las proporciones no son de particular importancia.

En un aspecto de este enfoque, los anticuerpos biespecíficos están compuestos por una cadena pesada de inmunoglobulina híbrida con una primera especificidad de unión en un brazo, y un par de la cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina híbrida (que proporciona una segunda especificidad de unión) en el otro brazo. Se descubrió que esta estructura asimétrica facilita la separación del compuesto biespecífico deseado de combinaciones indeseadas de las cadenas de inmunoglobulina, ya que la presencia de una cadena ligera de inmunoglobulina en solamente una mitad de la molécula biespecífica proporciona un modo fácil de separación. Este enfoque se divulga en el documento WO 94/04690. Para obtener más detalles de la generación de anticuerpos biespecíficos véase, por ejemplo, Suresh *et al.*, *Methods in Enzymology*, 121:210 (1986).

De acuerdo con otro enfoque, se puede manipular la interfaz entre un par de moléculas de anticuerpo para maximizar el porcentaje de heterodímeros que se recuperan del cultivo de células recombinantes. La interfaz comprende al menos una parte del dominio C_H3 de un dominio constante de anticuerpo. En este procedimiento, una o más cadenas laterales pequeñas de aminoácido de la interfaz de la primera molécula de anticuerpo se reemplazan por cadenas laterales mayores (por ejemplo, tirosina o triptófano). Se crean "cavidades" compensatorias de tamaño idéntico o similar a la(s) cadena(s) lateral(es) grande(s) en la interfaz de la segunda molécula de anticuerpo reemplazando las cadenas laterales de aminoácido grandes con otras más pequeñas (por ejemplo, alanina o treonina). Esto proporciona un mecanismo para aumentar el rendimiento del heterodímero sobre otros productos finales indeseados tales como homodímeros.

Los anticuerpos biespecíficos incluyen anticuerpos reticulados o "heteroconjugados". Por ejemplo, uno de los anticuerpos del heteroconjugado se puede acoplar a avidina, el otro a biotina. Dichos anticuerpos se han propuesto, por ejemplo, para dirigir células del sistema inmunitario a células indeseadas (patente de EE. UU. n.º 4.676.980) y para el tratamiento de la infección por VIH (documentos WO 91/00360, WO 92/00373 y EP 03089).

Los anticuerpos heteroconjugados se pueden preparar usando cualquier procedimiento de reticulación conveniente. Los agentes de reticulación adecuados se conocen bien en la técnica y se divulgan en la patente de EE. UU. n.º 4.676.980, junto con una serie de técnicas de reticulación.

También se han descrito en la literatura técnicas para generar anticuerpos biespecíficos a partir de fragmentos de anticuerpo. Por ejemplo, se pueden preparar anticuerpos biespecíficos usando enlaces químicos. Brennan *et al.*, Science, 229: 81 (1985) describen un procedimiento en el que se escinden proteolíticamente anticuerpos inalterados para generar fragmentos F(ab')₂. Estos fragmentos se reducen en presencia del agente que forma complejos con ditiol arsenito de sodio para estabilizar los ditioles vecinos y prevenir la formación de disulfuro intermolecular. A continuación, los fragmentos Fab' generados se convierten en derivados de tionitrobenzoato (TNB). A continuación, uno de los derivados Fab'-TNB se reconvierte en el Fab'-tiol mediante reducción con mercaptoetilamina y se mezcla con una cantidad equimolar del otro derivado Fab'-TNB para formar el anticuerpo biespecífico. Los anticuerpos biespecíficos producidos se pueden usar como agentes para la inmovilización selectiva de enzimas.

Los recientes progresos han facilitado la recuperación directa de fragmentos Fab'-SH a partir de *E. coli*, que se pueden acoplar químicamente para formar anticuerpos biespecíficos. Shalaby *et al.*, J. Exp. Med., 175: 217-225 (1992) describen la producción de una molécula de F(ab')₂ de anticuerpo biespecífico completamente humanizado. Cada fragmento Fab' se secretó por separado de *E. coli* y se sometió a acoplamiento químico dirigido *in vitro* para formar el anticuerpo biespecífico. El anticuerpo biespecífico así formado se pudo unir a células que sobreexpresaban el receptor HER2 y linfocitos T humanos normales, así como activar la actividad lítica de linfocitos citotóxicos humanos frente a dianas de tumor de mama humanas.

También se han descrito diversas técnicas para preparar y aislar fragmentos de anticuerpo biespecífico directamente a partir del cultivo de células recombinantes. Por ejemplo, se han producido anticuerpos biespecíficos usando cremalleras de leucina. Kostelny *et al.*, J. Immunol., 148(5): 1547-1553 (1992). Los péptidos de cremallera de leucinas de las proteínas Fos y Jun se enlazaron a las porciones Fab' de dos anticuerpos diferentes mediante fusión génica. Los homodímeros de anticuerpo se redujeron en la región bisagra para formar monómeros y a continuación, se reoxidaron para formar los heterodímeros de anticuerpo. Este procedimiento también se puede utilizar para la producción de homodímeros de anticuerpos. La tecnología de "diacuerpo" descrita por Hollinger *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993) ha proporcionado un mecanismo alternativo para preparar fragmentos de anticuerpo biespecíficos. Los fragmentos comprenden un dominio variable de la cadena pesada (VH) conectado a un dominio variable de la cadena ligera (VL) mediante un conector que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios de la misma cadena. Por consiguiente, se fuerza que los dominios VH y VL de un fragmento se emparejen con los dominios VL y VH complementarios de otro fragmento, formando de este modo dos sitios de unión a antígeno. También se ha informado de otra estrategia para preparar fragmentos de anticuerpo biespecífico mediante el uso de dímeros de Fv monocatenarios (sFv). Véase Gruber *et al.*, J. Immunol., 152:5368 (1994).

Se contemplan anticuerpos con más de dos valencias. Por ejemplo, se pueden preparar anticuerpos trispecíficos. Tutt *et al.* J. Immunol. 147: 60 (1991).

Anticuerpos multivalentes

Un anticuerpo multivalente se puede internalizar (y/o catabolizar) más rápidamente que un anticuerpo bivalente por una célula que expresa un antígeno al que se unen los anticuerpos. Los anticuerpos de la presente invención pueden ser anticuerpos multivalentes (que son distintos de la clase IgM) con tres o más sitios de unión a antígeno (por ejemplo, anticuerpos tetravalentes), que se pueden producir fácilmente mediante expresión recombinante de ácido nucleico que codifica las cadenas polipeptídicas del anticuerpo. El anticuerpo multivalente puede comprender un dominio de dimerización y tres o más sitios de unión a antígeno. En determinados aspectos, el dominio de dimerización comprende (o consiste en) una región Fc o una región bisagra. En este escenario, el anticuerpo comprenderá una región Fc y tres o más sitios de unión a antígeno aminoterminal a la región Fc. En determinados aspectos, un anticuerpo multivalente comprende (o consiste en) de tres a aproximadamente ocho sitios de unión a antígeno. En uno de dichos aspectos, un anticuerpo multivalente comprende (o consiste en) cuatro sitios de unión a antígeno. El anticuerpo multivalente comprende al menos una cadena polipeptídica (por ejemplo, dos cadenas polipeptídicas), en el que la(s) cadena(s) polipeptídica(s) comprende(n) dos o más dominios variables. Por ejemplo, la(s) cadena(s) polipeptídica(s) puede(n) comprender VD1-(X1)n-VD2-(X2)n-Fc, en las que VD1 es un primer dominio variable, VD2 es un segundo dominio variable, Fc es una cadena polipeptídica de una región Fc, X1 y X2 representan un aminoácido o polipéptido, y n es 0 o 1. Por ejemplo, la(s) cadena(s) polipeptídica(s) puede(n) comprender: VH-CH1-conector flexible-VH-CH1-cadena de la región Fc; o VH-CH1-VH-CH1-cadena de la región Fc. El anticuerpo multivalente del presente documento puede comprender además al menos dos (por ejemplo, cuatro) polipéptidos de dominio variable de la cadena ligera. El anticuerpo multivalente del presente documento puede comprender, por ejemplo, de aproximadamente dos a aproximadamente ocho polipéptidos de dominio variable de la cadena ligera. Los polipéptidos de dominio variable de la cadena ligera contemplados en este caso comprenden un dominio variable de la cadena ligera y, opcionalmente, comprenden además un dominio CL.

Anticuerpos de dominio único

En algunos aspectos, el anticuerpo de la invención es un anticuerpo de dominio único. Un anticuerpo de dominio único es una cadena polipeptídica única que comprende todo o una porción del dominio variable de la cadena pesada o todo o una porción del dominio variable de la cadena ligera de un anticuerpo. En determinados aspectos, un anticuerpo de dominio único es un anticuerpo de dominio único humano (Domantis, Inc., Waltham, MA; véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 6.248.516 B1). En un aspecto, un anticuerpo de dominio único consiste en todo o una porción del dominio variable de la cadena pesada de un anticuerpo.

Variantes de anticuerpo

En algunos aspectos, se contempla(n) modificación/modificaciones de secuencia de aminoácidos de los anticuerpos descritos en el presente documento. Por ejemplo, puede ser deseable mejorar la afinidad de unión y/u otras propiedades biológicas del anticuerpo. Las variantes de secuencia de aminoácidos de un anticuerpo se pueden preparar introduciendo cambios apropiados en la secuencia de nucleótidos que codifica el anticuerpo o mediante síntesis de péptidos. Dichas modificaciones incluyen, por ejemplo, deleciones de y/o inserciones en y/o sustituciones de residuos dentro de las secuencias de aminoácidos del anticuerpo. Se puede hacer cualquier combinación de deleción, inserción y sustitución para llegar a la construcción final, siempre que la construcción final posea las características deseadas. Las alteraciones aminoacídicas se pueden introducir en la secuencia de aminoácidos del anticuerpo objeto en el momento en que se realiza esa secuencia.

Un procedimiento útil para la identificación de determinados residuos o regiones del anticuerpo que son localizaciones preferentes para la mutagénesis se llama "mutagénesis por barrido de alanina" como se describe por Cunningham y Wells (1989) Science, 244:1081-1085. En este caso, un residuo o grupo de residuos diana (por ejemplo, residuos cargados, tales como arg, asp, his, lys y glu) se identifica y reemplaza por un aminoácido neutro o cargado negativamente (por ejemplo, alanina o polialanina) para que afecte a la interacción de los aminoácidos con el antígeno. A continuación, aquellas localizaciones de aminoácidos que demuestran sensibilidad funcional a las sustituciones se refinan introduciendo variantes adicionales o diferentes en, o para, los sitios de sustitución. Por tanto, aunque el sitio para introducir una variación en la secuencia de aminoácidos esté predeterminado, la naturaleza de la mutación *per se* no necesita estar predeterminada. Por ejemplo, para analizar la funcionalidad de una mutación en un sitio dado, se lleva a cabo mutagénesis aleatoria o por barrido de ala en la región o codón diana y las inmunoglobulinas expresadas se criban para determinar la actividad deseada.

Las inserciones en la secuencia de aminoácidos incluyen fusiones amino y/o carboxiterminales que varían en longitud de un residuo a polipéptidos que contienen cien o más residuos, así como inserciones intrasecuenciales de residuos de aminoácidos únicos o múltiples. Los ejemplos de inserciones terminales incluyen un anticuerpo con un residuo de metionilo N terminal. Otras variantes de inserción de la molécula de anticuerpo incluyen la fusión al extremo N o C del anticuerpo a una enzima (por ejemplo, para ADEPT) o un polipéptido que aumente la semivida en suero del anticuerpo.

En determinados aspectos, se altera un anticuerpo de la invención para aumentar o disminuir el grado en el que el anticuerpo se glucosila. La glucosilación de polipéptidos es típicamente unida por enlaces N o bien unida por enlaces O. Unión por enlaces N se refiere a la fijación de un resto glucídico a la cadena lateral de un residuo de asparagina. Las secuencias tripeptídicas de asparagina-X-serina y asparagina-X-treonina, donde X es cualquier aminoácido excepto prolina, son las secuencias de reconocimiento para la fijación enzimática del resto glucídico a la cadena lateral de asparagina. Por tanto, la presencia de cualquiera de estas secuencias tripeptídicas en un polipéptido crea un sitio de glucosilación posible. La glucosilación unida por enlaces O se refiere a la fijación de uno de los glúcidos N-acetilgalactosamina, galactosa o xilosa a un hidroxiaminoácido, lo más comúnmente serina o treonina, aunque también se puede usar 5-hidroxiprolina o 5-hidroxilisina.

La adición o deleción de sitios de glucosilación al anticuerpo se consigue convenientemente alterando la secuencia de aminoácidos de tal manera que se cree o se elimine una o más de las secuencias tripeptídicas descritas anteriormente (para sitios de glucosilación unidos por enlaces N). La alteración se puede realizar también mediante la adición, deleción o sustitución de uno o más residuos de serina o treonina a la secuencia del anticuerpo original (para sitios de glucosilación unidos por enlaces O).

Cuando el anticuerpo comprende una región Fc, se puede alterar el hidrato de carbono fijado al mismo. Por ejemplo, se describen anticuerpos con una estructura glucídica madura que carece de fucosa fijada a una región Fc del anticuerpo en la solicitud de patente de EE. UU. n.º US 2003/0157108 (Presta, L.). Véase también el documento US 2004/0093621 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd). Se hace referencia a los anticuerpos con una N-acetilglucosamina (GlcNAc) de bisección en el hidrato de carbono fijado a una región Fc del anticuerpo en el documento WO 2003/011878, Jean-Mairet *et al.* y la patente de EE. UU. n.º 6.602.684, Umana *et al.* Se informa de los anticuerpos con al menos un residuo de galactosa en el oligosacárido fijado a una región Fc del anticuerpo en el documento WO 1997/30087, Patel *et al.* Véanse, también, el documento WO 1998/58964 (Raju, S.) y el

documento WO 1999/22764 (Raju, S.) con respecto a anticuerpos con hidrato de carbono alterado fijado a la región Fc de los mismos. Véase también el documento US 2005/0123546 (Umana *et al.*) sobre moléculas de unión a antígeno con glucosilación modificada.

En determinados aspectos, la variante de glucosilación comprende una región Fc, en la que una estructura glucídica fijada a la región Fc carece de fucosa. Dichas variantes tienen una función ADCC mejorada. Opcionalmente, la región Fc comprende además una o más sustituciones aminoacídicas en la misma que mejoran más la ADCC, por ejemplo, las sustituciones en las posiciones 298, 333 y/o 334 de la región Fc (numeración Eu de residuos). Los ejemplos de publicaciones relacionadas con anticuerpos "desfucosilados" o "deficitarios en fucosa" incluyen: los documentos US 2003/0157108; WO 2000/61739; WO 2001/29246; US 2003/0115614; US 2002/0164328; US 2004/0093621; US 2004/0132140; US 2004/0110704; US 2004/0110282; US 2004/0109865; WO 2003/085119; WO 2003/084570; WO 2005/035586; WO 2005/035778; WO 2005/053742; Okazaki *et al.*, J. Mol. Biol. 336:1239-1249 (2004); Yamane-Ohnuki *et al.*, Biotech. Bioeng. 87:614 (2004). Los ejemplos de líneas celulares que producen anticuerpos desfucosilados incluyen células CHO Lee 13 deficitarias en fucosilación de proteínas (Ripka *et al.*, Arch. Biochem. Biophys., 249:533-545 (1986); solicitud de patente de EU. UU. n.º US 2003/0157108 A1, Presta, L; y el documento WO 2004/056312 A1, Adams *et al.*, especialmente en el ejemplo 11) y líneas celulares con genes inactivados, tales como el gen de alfa-1,6-fucosiltransferasa, FUT8, células CHO con genes inactivados (Yamane-Ohnuki *et al.*, Biotech. Bioeng., 87: 614 (2004)).

En un aspecto, el anticuerpo se altera para mejorar su semivida en suero. Para aumentar la semivida en suero del anticuerpo, se puede incorporar un epítipo de unión a receptor de rescate en el anticuerpo (especialmente un fragmento de anticuerpo) como se describe en el documento US 5739277, por ejemplo. Como se usa en el presente documento, el término "epítipo de unión a receptor de rescate" se refiere a un epítipo de la región Fc de una molécula de IgG (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4) que es responsable de aumentar la semivida en suero *in vivo* de la molécula de IgG (documentos US 2003/0190311, US6821505; US 6165745; US 5624821; US 5648260; US 6165745; US 5834 597).

Otro tipo de variante es una variante de sustitución aminoacídica. Estas variantes tienen al menos un residuo de aminoácido en la molécula de anticuerpo reemplazado por un residuo diferente. Los sitios de interés para la mutagénesis sustitutiva incluyen las regiones hipervariables, pero también se contemplan alteraciones en FR. Se muestran sustituciones conservadoras en la tabla 1 bajo el encabezado "sustituciones preferentes". Si dichas sustituciones dan como resultado un cambio deseable en la actividad biológica, entonces se pueden introducir más cambios sustanciales, denominados "sustituciones ejemplares" en la tabla 1, o como se describe además a continuación con referencia a las clases de aminoácidos, y cribar los productos.

TABLA 2

Residuo original	Sustituciones ejemplares	Sustituciones preferentes
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp, Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; norleucina	Leu
Leu (L)	Norleucina; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr

Residuo original	Sustituciones ejemplares	Sustituciones preferentes
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; norleucina	Leu

Las modificaciones sustanciales de las propiedades biológicas del anticuerpo se consiguen seleccionando sustituciones que difieren significativamente en su efecto de mantener (a) la estructura de la cadena principal polipeptídica en el área de la sustitución, por ejemplo, como una conformación de lámina o hélice, (b) la carga o hidrofobicidad de la molécula en el sitio diana o (c) el volumen de la cadena lateral. Los aminoácidos se pueden agrupar de acuerdo con similitudes en las propiedades de sus cadenas laterales (en A.L. Lehninger, en Biochemistry, segunda ed., pp. 73-75, Worth Publishers, Nueva York (1975)):

(1) no polares: Al (A), Val (V), Leu (L), Ile (I), Pro (P), Phe (F), Trp (W), Met (M)

(2) polares sin carga: Gly (G), Ser (S), Thr (T), Cys (C), Tyr (Y), Asn (N), Gln (Q)

(3) ácidos: Asp (D), Glu (E)

(4) básicos: Lys (K), Arg (R), His (H)

De forma alternativa, los residuos naturales se pueden dividir en grupos basándose en las propiedades comunes de la cadena lateral:

(1) hidrófobos: norleucina, Met, Ala, Val, Leu, Ile;

(2) hidrófilos neutros: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;

(3) ácidos: Asp, Glu;

(4) básicos: His, Lys, Arg;

(5) residuos que influyen en la orientación de la cadena: Gly, Pro;

(6) aromáticos: Trp, Tyr, Phe.

Las sustituciones no conservadoras supondrán el intercambio de un miembro de una de estas clases por otra clase. Dichos residuos sustituidos también se pueden introducir en los sitios de sustitución conservadora o, en los sitios restantes (no conservados).

Un tipo de variante de sustitución implica sustituir uno o más restos de la región hipervariable de un anticuerpo original (por ejemplo, un anticuerpo humanizado o humano). En general, la(s) variante(s) resultante(s) seleccionada(s) para el desarrollo posterior tendrán propiedades biológicas modificadas (por ejemplo, mejoradas) con respecto al anticuerpo original a partir del cual se generan. Un modo conveniente de generar dichas variantes de sustitución implica la maduración por afinidad usando presentación en fagos. En resumen, varios sitios de la región hipervariable (por ejemplo, los sitios 6-7) se mutan para generar todas las posibles sustituciones aminoacídicas en cada sitio. Los anticuerpos así generados se presentan a partir de partículas de fagos filamentosos como fusiones con al menos parte de una proteína de recubrimiento de fago (por ejemplo, el producto de gen III de M13) empaquetado dentro de cada partícula. A continuación, las variantes presentadas en fagos se criban por su actividad biológica (por ejemplo, afinidad de unión). A fin de identificar los sitios de la región hipervariable candidatos para su modificación, se puede realizar una mutagénesis de barrido (por ejemplo, barrido de alanina) para identificar los residuos de la región hipervariable que contribuyen significativamente a la unión a antígeno. De forma alternativa, o adicionalmente, puede ser beneficioso analizar una estructura cristalina del complejo antígeno-anticuerpo para identificar puntos de contacto entre el anticuerpo y el antígeno. Dichos residuos de contacto y residuos vecinos son candidatos para la sustitución de acuerdo con técnicas conocidas en la técnica, incluyendo las elaboradas en el presente documento. Una vez que se generan dichas variantes, el panel de variantes se somete a cribado usando técnicas conocidas en la técnica, incluyendo las descritas en el presente documento, y se pueden seleccionar anticuerpos con propiedades superiores en uno o más ensayos relevantes para un desarrollo posterior.

Las moléculas de ácido nucleico que codifican variantes de secuencia de aminoácidos del anticuerpo se preparan mediante una variedad de procedimientos conocidos en la técnica. Estos procedimientos incluyen, pero no se limitan a, aislamiento a partir de una fuente natural (en el caso de variantes de secuencia de aminoácidos naturales) o preparación mediante mutagénesis mediada por oligonucleótidos (o dirigida al sitio), mutagénesis

por PCR, y mutagénesis por casete de una variante preparada anteriormente o una versión no variante del anticuerpo.

Puede ser deseable introducir una o más modificaciones aminoacídicas en una región Fc de anticuerpos de la invención, generando de este modo una variante de la región Fc. La variante de la región Fc puede comprender una secuencia de la región Fc humana (por ejemplo, una región Fc de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 humana) que comprenda una modificación aminoacídica (por ejemplo, una sustitución) en una o más posiciones aminoacídicas, incluyendo la de una cisteína de bisagra.

De acuerdo con esta descripción y las enseñanzas de la técnica, se contempla que en algunos aspectos, un anticuerpo de la invención pueda comprender una o más alteraciones en comparación con el anticuerpo homólogo natural, por ejemplo, en la región Fc. No obstante, estos anticuerpos conservan sustancialmente las mismas características requeridas para la utilidad terapéutica en comparación con su homólogo natural. Por ejemplo, se cree que se pueden realizar determinadas alteraciones en la región Fc que darían como resultado una unión a C1q alterada (es decir, mejorada o bien reducida) y/o citotoxicidad dependiente del complemento (CDC), por ejemplo, como se describe en el documento WO99/51642. Véanse también Duncan y Winter, *Nature* 322:738-40 (1988); la patente de EE. UU. n.º 5.648.260; la patente de EE. UU. n.º 5.624.821; y el documento WO94/29351 con respecto a otros ejemplos de variantes de la región Fc. Los documentos WO00/42072 (Presta) y WO 2004/056312 (Lowman) describen variantes de anticuerpo con unión mejorada o reducida a los FcR. Véase, también, Shields *et al.* *J. Biol. Chem.* 9(2): 6591-6604 (2001). Se describen anticuerpos con semividas aumentadas y unión mejorada al receptor Fc neonatal (FcRn), que es responsable de la transferencia de las IgG maternas al feto (Guyer *et al.*, *J. Immunol.* 117:587 (1976) y Kim *et al.*, *J. Immunol.* 24:249 (1994)) en el documento US 2005/0014934A1 (Hinton *et al.*). Estos anticuerpos comprenden una región Fc con una o más sustituciones en la misma que mejoran la unión de la región Fc al FcRn. Las variantes de polipéptido con secuencias de aminoácido de la región Fc alteradas y capacidad de unión a C1q aumentada o disminuida se describen en la patente de EE. UU. n.º 6.194.551B1, documento WO99/51642. Véase, también, Idusogie *et al.* *J. Immunol.* 164: 4178-4184 (2000).

En un aspecto, la invención proporciona anticuerpos que comprenden modificaciones en la interfaz de los polipéptidos de Fc que comprende la región Fc, en los que las modificaciones facilitan y/o promueven la heterodimerización. Estas modificaciones comprenden la introducción de una protuberancia en un primer polipéptido de Fc y una cavidad en un segundo polipéptido de Fc, en las que la protuberancia se puede posicionar en la cavidad para promover la formación de complejos de los primer y segundo polipéptidos de Fc. Los procedimientos de generación de anticuerpos con estas modificaciones se conocen en la técnica, por ejemplo, como se describe en la patente de EE. UU. n.º 5.731.168.

Derivados de anticuerpo

Los anticuerpos de la presente invención se pueden modificar además para que contengan restos no proteicos adicionales que se conocen en la técnica y están fácilmente disponibles. Preferentemente, los restos adecuados para la derivatización del anticuerpo son polímeros solubles en agua. Los ejemplos no limitantes de polímeros solubles en agua incluyen, pero no se limitan a, polietilenglicol (PEG), copolímeros de etilenglicol/propilenglicol, carboximetilcelulosa, dextrano, poli(alcohol vinílico), polivinilpirrolidona, poli-1,3-dioxolano, poli-1,3,6-trioxano, copolímero de etileno/anhídrido maleico, poliaminoácidos (homopolímeros o bien copolímeros aleatorios) y dextrano o poli(n-vinilpirrolidona)/polietilenglicol, homopolímeros de propilenglicol, copolímeros de poli(óxido de propileno)/óxido de etileno, polioles polioxiethylados (por ejemplo, glicerol), poli(alcohol vinílico) y mezclas de los mismos. El propionaldehído de polietilenglicol puede tener ventajas en su fabricación debido a su estabilidad en agua. El polímero puede ser de cualquier peso molecular, y puede estar ramificado o no ramificado. El número de polímeros fijados al anticuerpo puede variar, y si se fija más de un polímero, pueden ser las mismas moléculas o diferentes. En general, se puede determinar el número y/o tipo de polímeros usados para la derivatización basándose en consideraciones que incluyen, pero no se limitan a, las propiedades o funciones particulares del anticuerpo que se va a mejorar, independientemente de si el derivado de anticuerpo se usará en un tratamiento en condiciones definidas, etc.

En otro aspecto, se proporcionan conjugados de un anticuerpo y un resto no proteico que se pueden calentar de forma selectiva mediante exposición a la radiación. En un aspecto, el resto no proteico es un nanotubo de carbono (Kam *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102: 11600-11605 (2005)). La radiación puede ser de cualquier longitud de onda e incluye, pero no se limita a, las longitudes de onda que no dañan las células normales, pero que calientan el resto no proteico hasta una temperatura a la que se destruyen las células proximales al anticuerpo-resto no proteico.

El término "conjugado de anticuerpo CD22-fármaco" de acuerdo con la invención se refiere a agentes que tienen la fórmula Ab-(L-D)p, en los que

(a) Ab es el anticuerpo CD22 como se divulga en el presente documento;

(b) L es un conector;

(c) D es un resto de fármaco.

- 5 En un modo de realización del procedimiento de acuerdo con la invención, el conjugado de anticuerpo CD22-fármaco es anti-CD22-MC-vc-PAB-MMAE.

Conjugados de anticuerpo-fármaco

- 10 En otro aspecto, la invención proporciona inmunoconjugados o conjugados de anticuerpo-fármaco (CAF), que comprenden un anticuerpo conjugado a un agente citotóxico tal como un agente quimioterápico, un fármaco, un agente inhibidor del crecimiento, una toxina (por ejemplo, una toxina enzimáticamente activa de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, o fragmentos de la misma) o un isótopo radioactivo (es decir, un radioconjugado). En otro aspecto, la invención proporciona además procedimientos de uso de los
- 15 inmunoconjugados. En un aspecto, un inmunoconjugado comprende cualquiera de los anticuerpos anti-CD22 anteriores fijado covalentemente a un agente citotóxico o a un agente detectable para su combinación con un anticuerpo anti-CD22 como se define en el presente documento.

El uso de conjugados de anticuerpo-fármaco para la administración local de agentes citotóxicos o citostáticos, es decir, fármacos para destruir o inhibir células tumorales en el tratamiento del cáncer (Syrigos y Epenetos (1999) *Anticancer Research* 19:605-614; Niculescu-Duvaz y Springer (1997) *Adv. Drg Del. Rev.* 26:151-172; patente de EE. UU. 4.975.278) permite la administración dirigida del resto de fármaco a tumores, y la acumulación intracelular en los mismos, donde la administración sistémica de estos agentes de fármacos no conjugados puede dar como resultado niveles inaceptables de toxicidad para las células normales, así como para las células tumorales que se busca eliminar (Baldwin *et al.*, (1986) *Lancet* pp. (Mar. 15, 1986):603-05; Thorpe, (1985) "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", en *Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications*, A. Pinchera *et al.* (ed.s), pp. 475-506). De este modo se busca la eficacia máxima con la mínima toxicidad. Se ha informado de que tanto los anticuerpos policlonales como los anticuerpos monoclonales son útiles en estas estrategias (Rowland *et al.*, (1986) *Cancer Immunol. Immunother.*, 21:183-87).

25 Los fármacos usados en estos procedimientos incluyen daunomicina, doxorubicina, metotrexato y vindesina (Rowland *et al.*, (1986) *supra*). Las toxinas usadas en los conjugados de anticuerpo-toxina incluyen toxinas bacterianas, tales como toxina diftérica, toxinas vegetales, tales como ricina, toxinas de fármacos tradicionales, tales como geldanamycin (Mandler *et al.* (2000) *Jour. of the Nat. Cancer Inst.* 92(19): 1573-1581; Mandler *et al.* (2000) *Bioorganic & Med. Chem. Letters* 10:1025-1028; Mandler *et al.* (2002) *Bioconjugate Chem.* 13:786-791), maitansinoides (documento EP 1391213; Liu *et al.*, (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:8618-8623), y caliqueamicina (Lode *et al.* (1998) *Cancer Res.* 58:2928; Hinman *et al.* (1993) *Cancer Res.* 53:3336-3342). Las toxinas pueden ejercer sus efectos citotóxico y citostático mediante mecanismos que incluyen la unión a tubulina, la unión a ADN o la inhibición de la topoisomerasa. Algunos fármacos citotóxicos tienden a ser inactivos o menos activos cuando se conjugan a ligandos de receptores de proteínas o anticuerpos grandes.

40 ZEVALIN® (ibritumomab tiuxetan, Biogen/Idec) es un conjugado de anticuerpo-radioisótopo compuesto por un anticuerpo monoclonal IgG1 kappa murino dirigido frente al antígeno CD20 encontrado en la superficie de linfocitos B normales y malignos y el radioisótopo ¹¹¹In o ⁹⁰Y unido por un conector-quelante de tiourea (Wiseman *et al.*, (2000) *Eur. Jour. Nucl. Med.* 27(7):766-77; Wiseman *et al.* (2002) *Blood* 99(12):4336-42; Witzig *et al.* (2002) *J. Clin. Oncol.* 20(10):2453-63; Witzig *et al.* (2002) *J. Clin. Oncol.* 20(15):3262-69). Aunque ZEVALIN tiene actividad frente al linfoma no hodgkiniano (LNH) de linfocitos B, su administración da como resultado citopenias graves y prolongadas en la mayoría de los pacientes. MYLOTARG™ (gemtuzumab ozogamicina, Wyeth Pharmaceuticals), un conjugado de anticuerpo y fármaco compuesto por un anticuerpo CD33 hu enlazado a caliqueamicina, se aprobó en el año 2000 para el tratamiento de la leucemia mieloide aguda mediante inyección (*Drugs of the Future* (2000) 25(7):686; patentes de EE. UU. n.ºs 4970198; 5079233; 5585089; 5606040; 5693762; 5739116; 5767285; 5773001). Cantuzumab mertansina (Immunogen, Inc.), un conjugado de anticuerpo y fármaco compuesto por el anticuerpo huC242 enlazado por medio del conector disulfuro SPP al resto de fármaco de maitansinoide, DM1, está progresando en ensayos de fase II para el tratamiento de cánceres que expresan CanAg, tales como de colon, pancreático, gástrico y otros. MLN-2704 (Millennium Pharm., BZL Biologies, Immunogen Inc.), un conjugado de anticuerpo y fármaco compuesto por el anticuerpo monoclonal anti-antígeno prostático específico de membrana (PSMA) enlazado al resto de fármaco de maitansinoide, DM1, está en desarrollo para el posible tratamiento de los tumores de próstata. Los péptidos de auristatina E (AE) y monometilauristatina (MMAE), análogos sintéticos de dolastatina, se conjugaron a los anticuerpos monoclonales quiméricos cBR96 (específico para Lewis Y en carcinomas) y cAC10 (específico para CD30 en neoplasias malignas hemáticas) (Doronina *et al.*, (2003) *Nature Biotechnology* 21(7):778-784) y están en desarrollo terapéutico.

Los agentes quimioterápicos útiles en la generación de inmunoconjugados se describen en el presente documento. Las toxinas enzimáticamente activas y los fragmentos de las mismas que se pueden usar incluyen la cadena A diftérica, fragmentos activos de no unión de la toxina de difteria, cadena A de exotoxina (de *Pseudomonas aeruginosa*), cadena A de ricina, cadena A de abrina, cadena A de modeccina, alfa-sarcina,

proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas de diantina, proteínas de *Phytolacca americana* (PAPI, PAPII y PAP-S), inhibidor de *Momordica charantia*, curcina, crotina, inhibidor de *Saponaria officinalis*, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina y los tricotecenos. Véase, por ejemplo, el documento WO 93/21232 publicado el 28 de octubre de 1993. Están disponibles una variedad de radionúclidos para la producción de anticuerpos radioconjugados. Los ejemplos incluyen ^{212}Bi , ^{131}I , ^{131}In , ^{90}Y y ^{186}Re . Los conjugados del anticuerpo y del agente citotóxico se preparan usando una variedad de agentes bifuncionales de acoplamiento de proteínas tales como propionato de N-succinimidil-3-(2-piridilditio) (SPDP), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como adipimidato de dimetilo HCl), ésteres activos (tales como suberato de disuccinimidilo), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos bis-azido (tales como bis-(p-azidobenzoil)hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (tales como bis-(p-diazoniobenzoil)etilendiamina), diisocianatos (tales como 2,6-diisocianato de tolueno) y compuestos de flúor bis-activos (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzeno). Por ejemplo, se puede preparar una inmunotoxina de ricina como se describe en Vitetta *et al.* (1987) *Science* 238:1098. El ácido 1-isotiocianatobencil-3-metildietilentriaminopentaacético (MX-DTPA) marcado con carbono 14 es un agente quelante ejemplar para la conjugación del radionúclido al anticuerpo (documento WO94/11026).

Los conjugados de un anticuerpo y una o más toxinas de fármacos tradicionales, tales como una caliqueamicina, maitansinoides, dolastatinas, auristatinas, un tricoteceno y CC1065, y los derivados de estas toxinas que tienen actividad de toxina también se contemplan en el presente documento.

Maitansina y maitansinoides

En algunos aspectos, el inmunconjugado comprende un anticuerpo (de longitud completa o fragmentos) de la invención conjugado a una o más moléculas de maitansinoide.

Los maitansinoides son inhibidores mitóticos que actúan inhibiendo la polimerización de tubulina. La maitansina se aisló por primera vez a partir del arbusto del África oriental *Maytenus serrata* (patente de EE. UU. n.º 3896111). Posteriormente, se descubrió que determinados microbios también producen maitansinoides, tales como maitansinol y ésteres C-3 de maitansinol (patente de EE. UU. n.º 4.151.042). Se divulgan maitansinol sintético y derivados y análogos del mismo, por ejemplo, en las patentes de EE. UU. n.ºs 4.137.230; 4.248.870; 4.256.746; 4.260.608; 4.265.814; 4.294.757; 4.307.016; 4.308.268; 4.308.269; 4.309.428; 4.313.946; 4.315.929; 4.317.821; 4.322.348; 4.331.598; 4.361.650; 4.364.866; 4.424.219; 4.450.254; 4.362.663 y 4.371.533.

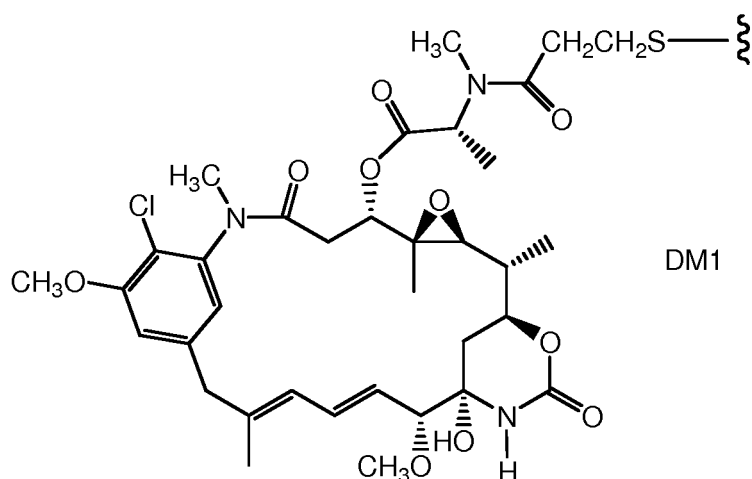
Los restos de fármaco de maitansinoide son restos de fármaco atractivos en los conjugados de anticuerpo y fármaco debido a que son: (i) relativamente accesibles para preparar mediante fermentación o modificación química, derivatización de productos de fermentación, (ii) susceptibles de derivatización con grupos funcionales adecuados para la conjugación a través de los conectores no disulfuro a anticuerpos, (iii) estables en el plasma y (iv) eficaces frente a una variedad de líneas celulares tumorales.

Los compuestos de maitansina adecuados para su uso como restos de fármaco maitansinoides se conocen bien en la técnica, y se pueden aislar a partir de fuentes naturales de acuerdo con procedimientos conocidos, producir usando técnicas de genomanipulación (véase Yu *et al.* (2002) PNAS 99:7968-7973), o de maitansinol y análogos de maitansinol preparados sintéticamente de acuerdo con procedimientos conocidos.

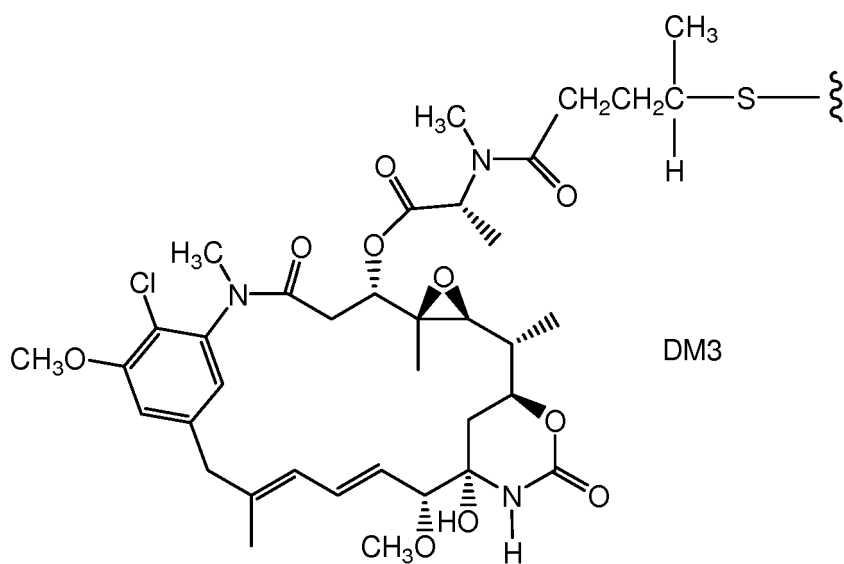
Los restos de fármaco maitansinoides ejemplares incluyen aquellos que tienen un anillo aromático modificado, tales como: C-19-descloro (documento US 4256746) (preparado por reducción con hidruro de litio y aluminio de ansamitocina P2); C-20-hidroxi (o C-20-desmetil) +/-C-19-descloro (patentes de EE. UU. n.ºs 4361650 y 4307016) (preparado por desmetilación usando *Streptomyces* o *Actinomyces* o descloración usando LAH); y C-20-desmetoxi, C-20-aciloxi (-OCOR), +/-descloro (patente de EE. UU. n.º 4.294.757) (preparados por acilación usando cloruros de acilo) y aquellos que tienen modificaciones en otras posiciones

Los restos de fármaco maitansinoides ejemplares también incluyen aquellos que tienen modificaciones tales como: C-9-SH (documento US 4424219) (preparado por la reacción de maitansinol con H_2S o P_2S_5); C-14-alcoximetilo(desmetoxi/ CH_2OR) (documento US 4331598); C-14-hidroximetilo o aciloximetilo (CH_2OH o CH_2OAc) (documento US 4450254) (preparado a partir de *Nocardia*); C-15-hidroxi/aciloxi (documento US 4364866) (preparado por la conversión de maitansinol por *Streptomyces*); C-15-metoxi (patentes de EE. UU. n.ºs 4313946 y 4315929) (aislado a partir de *Trewia nudiflora*); C-18-N-desmetil (patentes de EE. UU. n.ºs 4362663 y 4322348) (preparado por la desmetilación de maitansinol por *Streptomyces*); y 4,5-desoxi (documento US 4371533) (preparado por la reducción con tricloruro de titanio/LAH de maitansinol).

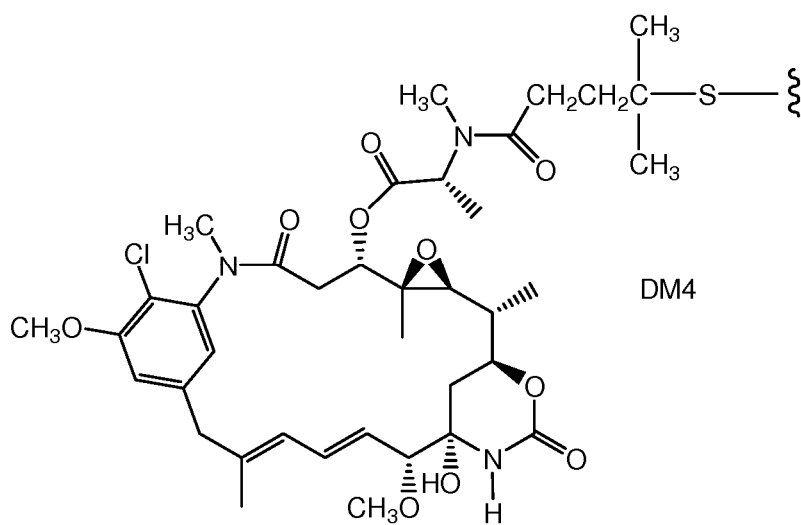
Los aspectos ejemplares de los restos de fármaco maitansinoides incluyen: DM1; DM3; y DM4, que tienen las estructuras:



DM1



DM3

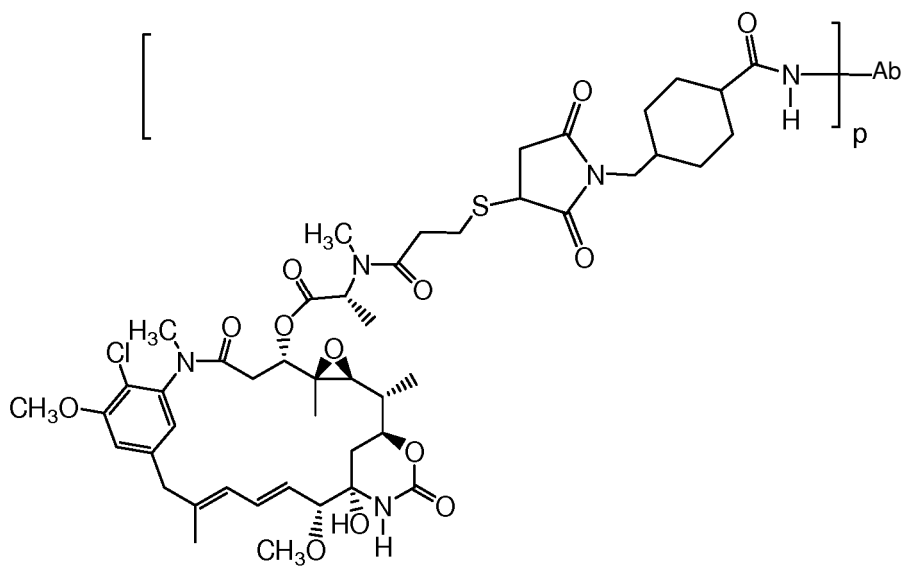
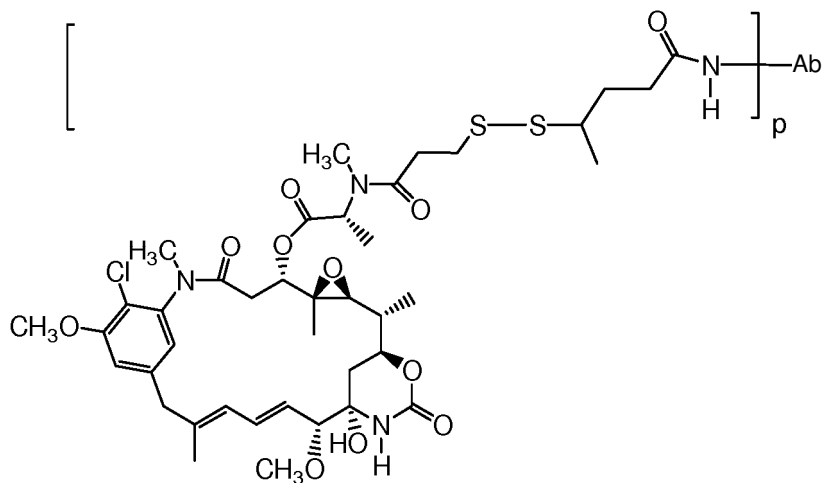


DM4

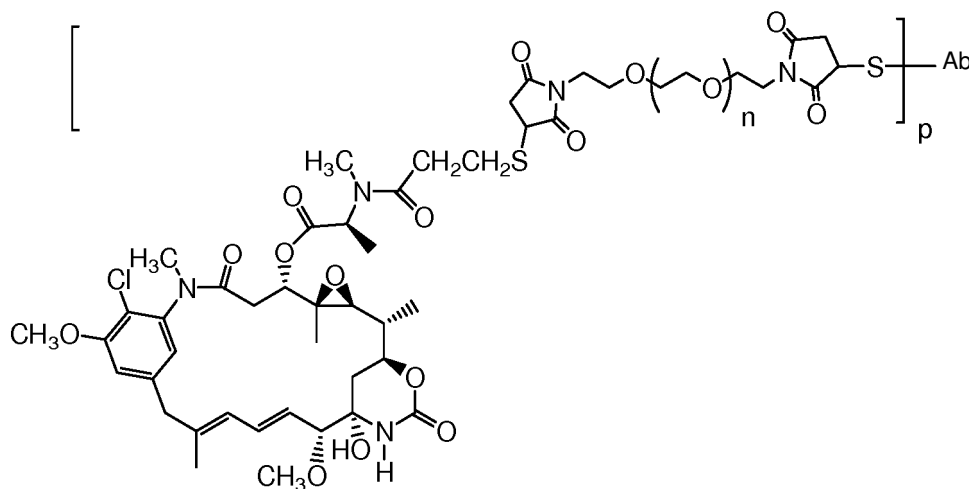
en las que la línea ondulada indica la fijación covalente del átomo de azufre del fármaco a un conector (L) de un conjugado de anticuerpo y fármaco. Se ha informado de HERCEPTIN® (trastuzumab, anticuerpo anti-HER2)

enlazado por SMCC a DM1 (documento WO 2005/037992). Un conjugado de anticuerpo y fármaco de la presente invención se puede preparar de acuerdo con los procedimientos descritos en la misma.

Otros conjugados de anticuerpo y fármaco maitansinoides ejemplares tienen las siguientes estructuras y abreviaturas, (en las que Ab es anticuerpo y p es 1 a aproximadamente 8):



Los conjugados de anticuerpo-fármaco ejemplares en los que DM1 se enlaza a través de un conector BMPEO a un grupo tiol del anticuerpo tienen la estructura y la abreviatura:



en la que Ab es anticuerpo; n es 0, 1 o 2; y p es 1, 2, 3 o 4.

- 5 Se divulgan inmunoconjugados que contienen maitansinoides, procedimientos de preparación de los mismos y su uso terapéutico, por ejemplo, en las patentes de EE. UU. n.^{os} 5.208.020; 5.416.064; 6.441.163 y en la patente europea EP 0 425 235 B1. Liu *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:8618-8623 (1996) describieron inmunoconjugados que comprendían un maitansinoide designado como DM1 enlazado al anticuerpo monoclonal C242 dirigido frente al cáncer colorrectal humano. Se descubrió que el conjugado era altamente citotóxico hacia las células del cáncer de colon cultivadas y mostró actividad antitumoral en un ensayo de crecimiento tumoral *in vivo*. Chari *et al.*, Cancer Research 52:127-131 (1992) describen inmunoconjugados en los que un maitansinoide se conjugó por medio de un conector disulfuro al anticuerpo murino A7 que se une a un antígeno en líneas celulares de cáncer de colon humano, o a otro anticuerpo monoclonal murino TA.1 que se une al oncogén HER-2/neu. La citotoxicidad del conjugado de TA.1-maitansinoide se sometió a prueba *in vitro* en la línea celular de cáncer de mama humano SK-BR-3, que expresa 3×10^5 antígenos de superficie HER-2 por célula. El conjugado de fármaco logró un grado de citotoxicidad similar al del fármaco de maitansinoide libre, que se podía aumentar aumentando el número de moléculas de maitansinoide por molécula de anticuerpo. El conjugado de A7-maitansinoide mostró baja citotoxicidad sistémica en ratones.
- 10
- 15
- 20 Los conjugados de anticuerpo anti-CD22-maitansinoide para su combinación con un anticuerpo anti-CD22 como se definen en el presente documento se preparan enlazando químicamente un anticuerpo a una molécula de maitansinoide sin disminuir significativamente la actividad biológica del anticuerpo ni de la molécula de maitansinoide. Véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.^o 5.208.020. Un promedio de 3-4 moléculas de maitansinoide conjugadas por molécula de anticuerpo ha demostrado eficacia en la potenciación de la citotoxicidad de células diana sin afectar negativamente a la función o a la solubilidad del anticuerpo, aunque incluso se esperaría que una molécula de toxina/anticuerpo potencie la citotoxicidad frente al uso del anticuerpo no marcado. Los maitansinoides se conocen bien en la técnica y se pueden sintetizar mediante técnicas conocidas o aislar a partir de fuentes naturales. Se divulgan maitansinoides adecuados, por ejemplo, en la patente de EE. UU. n.^o 5.208.020 y en las otras patentes y publicaciones de no patente mencionadas anteriormente en el presente documento. Los maitansinoides preferentes son maitansinol y análogos de maitansinol modificados en el anillo aromático o en otras posiciones de la molécula de maitansinol, tales como diversos ésteres de maitansinol.
- 25
- 30
- 35 Hay muchos grupos de enlace conocidos en la técnica para preparar conjugados de anticuerpo-maitansinoide, incluyendo, por ejemplo, los divulgados en las patentes de EE. UU. n.^{os} 5208020, 6441163, o en la patente EP 0 425 235 B1, Chari *et al.*, Cancer Research 52:127-131 (1992) y en el documento US 2005/0169933 A1. Los conjugados de anticuerpo-maitansinoide que comprenden el componente conector SMCC se pueden preparar como se divulga en la publicación de solicitud de patente de EE. UU. n.^o 2005/0276812, presentada el 31 de mayo de 2005, "Antibody Drug Conjugates and Methods". Los grupos de enlace incluyen grupos disulfuro, grupos tioéter, grupos lábiles a ácidos, grupos fotolábiles, grupos lábiles a peptidasas o grupos lábiles a esterases, como se divulga en las patentes identificadas anteriormente. Se describen y ejemplifican grupos de enlace adicionales en el presente documento.
- 40
- 45 Los conjugados del anticuerpo y el maitansinoide se pueden preparar usando una variedad de agentes de acoplamiento de proteínas bifuncionales tales como propionato de N-succinimidil-3-(2-piridilditio) (SPDP), ciclohexano-1-carboxilato de 4-(N-maleimidometil)succinimidilo (SMCC), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como adipimidato de dimetilo HCl), ésteres activos (tales como suberato de disuccinimidilo), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos bis-azido (tales como bis-(p-

azidobenzoil)hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (tales como bis-(p-diazoniobenzoil)etilendiamina), diisocianatos (tales como 2,6-diisocianato de tolueno) y compuestos de flúor bis-activos (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzoceno). Los agentes de acoplamiento particularmente preferentes incluyen propionato de N-succinimidil-3-(2-piridilditio) (SPDP) (Carlsson *et al.*, Biochem J. 173:723-737 (1978)) y N-succinimidil-4-(2-piridilditio)pentanoato (SPP) para proporcionar un enlace disulfuro.

El conector se puede fijar a la molécula de maitansinoide en diversas posiciones, en función del tipo de enlace. Por ejemplo, se puede formar un enlace éster por reacción con un grupo hidroxilo usando técnicas de acoplamiento convencionales. La reacción se puede producir en la posición C-3 que tiene un grupo hidroxilo, la posición C-14 modificada con hidroximetilo, la posición C-15 modificada con un grupo hidroxilo y la posición C-20 que tiene un grupo hidroxilo. En un aspecto preferente, el enlace se forma en la posición C-3 del maitansinol o un análogo de maitansinol.

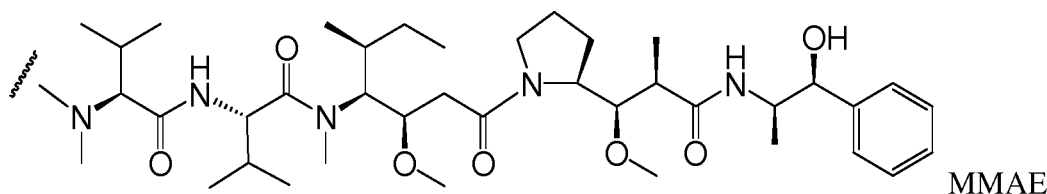
En un aspecto, cualquiera de los anticuerpos de la invención (de longitud completa o fragmento) está conjugado a una o más moléculas de maitansinoide. En un aspecto del inmunoconjugado, el agente citotóxico D, es un maitansinoide DM1. En un aspecto del inmunoconjugado, el conector es SMCC. En un aspecto del conjugado de anticuerpo-conector y fármaco para la combinación de un anticuerpo anti-CD20 como se define en el presente documento, el conjugado de anticuerpo-conector-fármaco es un anticuerpo anti-CD22 como se describe en el presente documento al que está covalentemente el agente citotóxico DM1 por medio del conector SMCC.

Auristatinas y dolastatinas

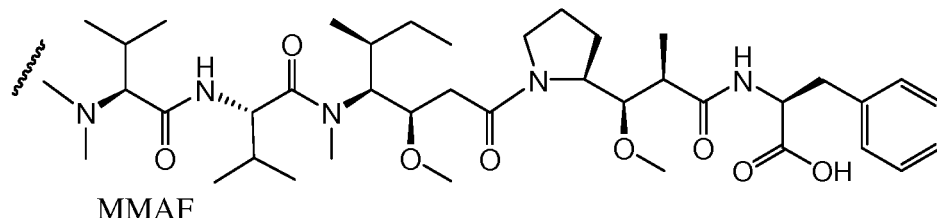
En algunos aspectos, el inmunoconjugado comprende un anticuerpo de la invención conjugado a dolastatinas o análogos y derivados peptídicos de dolastatina, las auristatinas (patentes de EE. UU. n.ºs 5635483 y 5780588). Se ha demostrado que las dolastatinas y las auristatinas interfieren con la dinámica de los microtúbulos, la hidrólisis de GTP y la división nuclear y celular (Woyke *et al.* (2001) Antimicrob. Agents and Chemother. 45(12):3580-3584) y tienen actividad antineoplásica (documento US 5663149) y antifúngica (Pettit *et al.* (1998) Antimicrob. Agents Chemother. 42:2961-2965). El resto de fármaco de dolastatina o auristatina se puede fijar al anticuerpo a través del extremo N (amínico) o el extremo C (carboxílico) del resto de fármaco peptídico (documento WO 02/088172).

Los aspectos ejemplares de auristatina incluyen los restos de fármaco de monometilauristatinas enlazadas por el extremo N DE y DF, divulgados en "Senter *et al.*, Proceedings of the American Association for Cancer Research, volumen 45, resumen número 623, presentado el 28 de marzo de 2004.

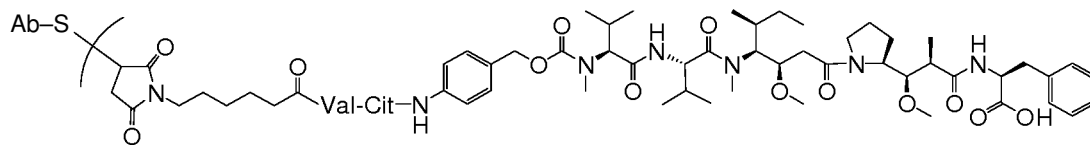
Un modo de realización ejemplar de auristatina es MMAE (en la que la línea ondulada indica la fijación covalente a un conector (L) de un conjugado de anticuerpo y fármaco).



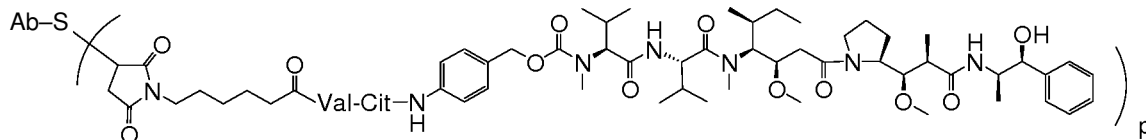
Otro aspecto ejemplar de auristatina es MMAF, en la que la línea ondulada indica la fijación covalente a un conector (L) de un conjugado de anticuerpo y fármaco (documento US 2005/0238649):



Los modos realización ejemplares adicionales que comprenden MMAE o MMAF y diversos componentes conectores (descritos adicionalmente en el presente documento) tienen las siguientes estructuras y abreviaturas (en las que Ab significa anticuerpo y p es de 1 a aproximadamente 8):

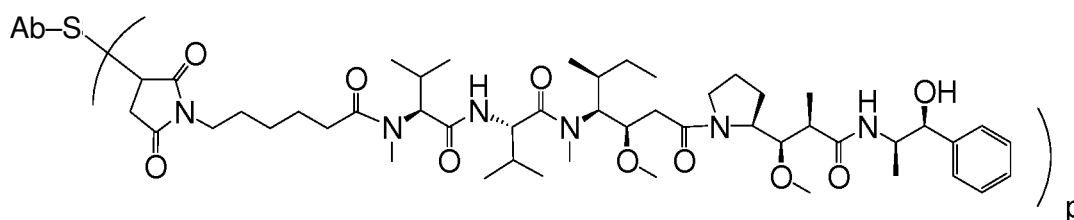


Ab-MC-vc-PAB-MMAF



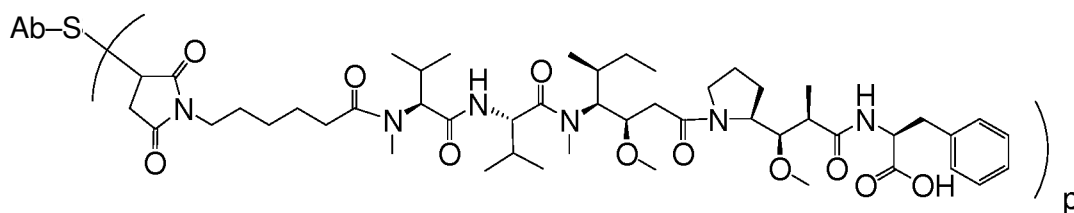
5

Ab-MC-vc-PAB-MMAE



10

Ab-MC-MMAE



15 Ab-MC-MMAF

Típicamente, se pueden preparar restos de fármaco basados en péptidos formando un enlace peptídico entre dos o más aminoácidos y/o fragmentos peptídicos. Dichos enlaces peptídicos se pueden preparar, por ejemplo, de acuerdo con el procedimiento de síntesis en fase líquida (véase E. Schröder y K. Lübke, "The Peptides", volumen 1, pp. 76-136, 1965, Academic Press) que se conoce bien en el campo de la química de péptidos. Los restos de fármaco de auristatina/dolastatina se pueden preparar de acuerdo con los procedimientos de: documento US 5635483; documento US 5780588; Pettit *et al* (1989) J. Am. Chem. Soc. 111:5463-5465; Pettit *et al*. (1998) Anti-Cancer Drug Design 13:243-277; Pettit, G.R., *et al*. Synthesis, 1996, 719-725; Pettit *et al*. (1996) J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1 5:859-863; y Doronina (2003) Nat Biotechnol 21(7):778-784.

25

Caliqueamicina

En otros aspectos, el inmunoconjugado comprende un anticuerpo de la invención conjugado a una o más moléculas de caliqueamicina. Los antibióticos de la familia de las caliqueamicinas pueden producir roturas de ADN bicatenario a concentraciones subpicomolares. Para la preparación de conjugados de la familia de las caliqueamicinas, véanse las patentes de EE. UU. 5.712.374, 5.714.586, 5.739.116, 5.767.285, 5.770.701, 5.770.710, 5.773.001, 5.877.296 (todas conferidas a American Cyanamid Company). Los análogos estructurales de caliqueamicina que se pueden usar incluyen, pero no se limitan a, $\gamma_1^1 \alpha_2^1 \alpha_3^1$ N-acetil- γ_1^1 , PSAG y θ_1^1 (Hinman *et al*, Cancer Research 53:3336-3342 (1993), Lode *et al*, Cancer Research 58:2925-2928 (1998) y las patentes de EE. UU. anteriormente mencionadas conferidas a American Cyanamid). Otro fármaco antineoplásico que se puede conjugar con el anticuerpo es QFA, que es un antifolato. Tanto la caliqueamicina como el QFA tienen sitios intracelulares de acción y no atraviesan fácilmente la membrana plasmática. Por lo tanto, la captación celular de estos agentes a través de internalización mediada por anticuerpos potencia enormemente sus efectos citotóxicos.

40

Otros agentes citotóxicos

Otros agentes antineoplásicos que se pueden conjugar a los anticuerpos de la invención incluyen BCNU, estreptozaicina, vincristina y 5-fluorouracilo, la familia de agentes conocidos colectivamente como complejo LL-E33288 descrita en las patentes de EE. UU. 5.053.394, 5.770.710, así como esperamicinas (patente de EE. UU. 5.877.296).

Las toxinas enzimáticamente activas y los fragmentos de las mismas que se pueden usar incluyen la cadena A diftérica, fragmentos activos de no unión de la toxina diftérica, cadena A de exotoxina (de *Pseudomonas aeruginosa*), cadena A de ricina, cadena A de abrina, cadena A de modeccina, alfa-sarcina, proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas de diantina, proteínas de *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII y PAP-S), inhibidor de *Momordica charantia*, curcina, crotina, inhibidor de *Saponaria officinalis*, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina y los tricotecenos. Véase, por ejemplo, el documento WO 93/21232 publicado el 28 de octubre de 1993.

La presente invención contempla adicionalmente además un inmunoconjugado formado entre un anticuerpo y un compuesto con actividad nucleolítica (por ejemplo, una ribonucleasa o una ADN endonucleasa, tal como una desoxirribonucleasa; DNasa).

Para la destrucción selectiva del tumor, el anticuerpo puede comprender un átomo altamente radioactivo. Una variedad de isótopos radioactivos están disponibles para la producción de anticuerpos radioconjugados. Los ejemplos incluyen At^{211} , I^{131} , I^{125} , Y^{90} , Re^{186} , Re^{188} , Sm^{153} , Bi^{212} , P^{32} , Pb^{212} y los isótopos radioactivos de Lu. Cuando el conjugado se usa para detección, puede comprender un átomo radioactivo para estudios de gammagrafía, por ejemplo, Tc^{99m} o I^{123} , o un marcador de espín para la resonancia magnética nuclear (RMN) (también conocida como resonancia magnética, RM), tal como yodo-123 de nuevo, yodo-131, indio-111, flúor-19, carbono-13, nitrógeno-15, oxígeno-17, gadolinio, manganeso o hierro.

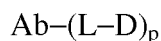
Los radiomarcadores u otros se pueden incorporar en el conjugado de maneras conocidas. Por ejemplo, el péptido se puede biosintetizar o se puede sintetizar mediante síntesis química de aminoácidos usando precursores aminoácidos adecuados que implican, por ejemplo, flúor-19 en lugar de hidrógeno. Los marcadores tales como Tc^{99m} o I^{123} , Re^{186} , Re^{188} e In^{111} se pueden fijar por medio de un residuo de cisteína en el péptido. El itrio-90 se puede fijar por medio de un residuo de lisina. El procedimiento IODOGEN (Fraker *et al.* (1978) Biochem. Biophys. Res. Commun. 80:49-57 se puede usar para incorporar yodo-123. "Monoclonal Antibodies in Immunoscintigraphy" (Chatal, CRC Press 1989) describe otros procedimientos en detalle.

Los conjugados del anticuerpo y el agente citotóxico se pueden preparar usando una variedad de agentes de acoplamiento de proteínas bifuncionales tales como propionato de N-succinimidil-3-(2-piridilditio) (SPDP), ciclohexano-1-carboxilato de succinimidil-4-(N-maleimidometilo) (SMCC), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como adipimidato de dimetilo HCl), ésteres activos (tales como suberato de disuccinimidilo), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos bis-azido (tales como bis-(p-azidobenzoi)hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (tales como bis-(p-diazoniobenzoi)etilendiamina), diisocianatos (tales como 2,6-diisocianato de tolueno) y compuestos de flúor bis-activos (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenceno). Por ejemplo, se puede preparar una inmunotoxina de ricina como se describe en Vitetta *et al.*, *Science* 238:1098 (1987). El ácido 1-isotiocianatobencil-3-metildietilentríaminopentaacético (MX-DTPA) marcado con carbono 14 es un agente quelante ejemplar para la conjugación del radionúclido al anticuerpo. Véase el documento WO94/11026. El conector puede ser un "conector escindible" que facilita la liberación del fármaco citotóxico en la célula. Por ejemplo, se puede usar un conector lábil para ácido, un conector sensible a la peptidasa, un conector fotolábil, un conector de dimetilo o un conector que contiene disulfuro (Chari *et al.*, Cancer Research 52:127-131 (1992); patente de EE. UU. n.º 5.208.020).

Los compuestos de la invención contemplan expresamente, pero no se limitan a, CAF preparado con reactivos de reticulación: BMPS, EMCS, GMBS, HBVS, LC-SMCC, MBS, MPBH, SBAP, SIA, SIAB, SMCC, SMPB, SMPH, sulfo-EMCS, sulfo-GMBS, sulfo-KMUS, sulfo-MBS, sulfo-SIAB, sulfo-SMCC y sulfo-SMPB, y SVSB (succinimidil-(4-vinilsulfona)benzoato) que están disponibles comercialmente (por ejemplo, de Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL., EE. UU.). Véanse las páginas 467-498 de 2003-2004 Applications Handbook and Catalog.

Preparación de conjugados de anticuerpo y fármaco:

En los conjugados de anticuerpo y fármaco (CAF) de la invención, se conjuga un anticuerpo (Ab) a uno o más restos de fármaco (D), por ejemplo, de aproximadamente 1 a aproximadamente 20 restos de fármaco por anticuerpo, a través de un conector (L). El CAF de fórmula I se puede preparar por varias rutas, empleando reacciones, condiciones y reactivos de química orgánica conocidos por los expertos en la técnica, incluyendo: (1) reacción de un grupo nucleófilo de un anticuerpo con un reactivo conector bivalente, para formar Ab-L, por medio de un enlace covalente, seguido de reacción con un resto de fármaco D; y (2) reacción de un grupo nucleófilo de un resto de fármaco con un reactivo conector bivalente, para formar D-L, por medio de un enlace covalente, seguido de reacción con el grupo nucleófilo de un anticuerpo. Se describen en el presente documento procedimientos adicionales para preparar el CAF.

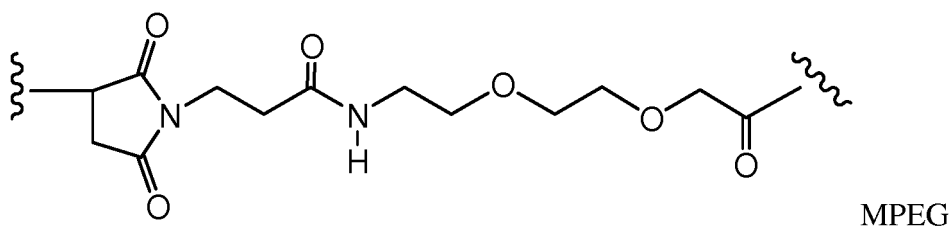
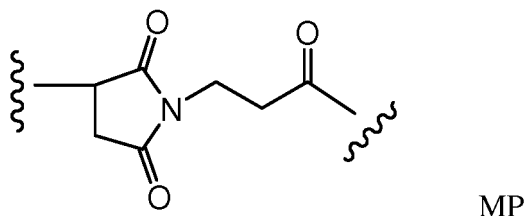
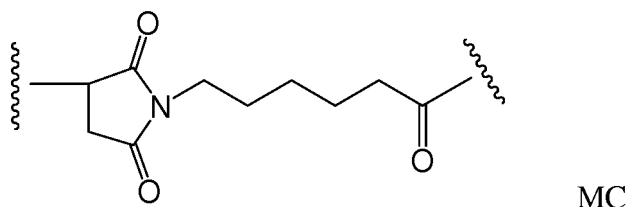


Fórmula I

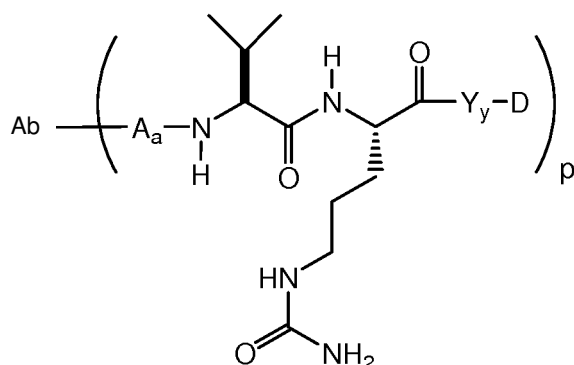
El conector puede estar compuesto por uno o más componentes conectores. Los componentes conectores ejemplares incluyen 6-maleimidocaproilo ("MC"), maleimidopropanoilo ("MP"), valina-citrulina ("val-cit"), alanina-fenilalanina ("ala-phe"), p-aminobenciloxicarbonilo ("PAB"), 4-(2-piridiltio)pentanoato de N-succinimidilo ("SPP"), 4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato de N-succinimidilo ("SMCC") y (4-yodo-acetil)aminobenzoato de N-succinimidilo ("SIAB"). Se conocen en la técnica componentes conectores adicionales y algunos se describen en el presente documento.

En algunos aspectos, el conector puede comprender residuos de aminoácido. Los componentes conectores aminoácidos ejemplares incluyen un dipéptido, un tripéptido, un tetrapéptido o un pentapéptido. Los dipéptidos ejemplares incluyen: valina-citrulina (vc o val-cit), alanina-fenilalanina (af o ala-phe). Los tripéptidos ejemplares incluyen: glicina-valina-citrulina (gly-val-cit) y glicina-glicina-glicina (gly-gly-gly). Los residuos de aminoácido que comprenden un componente conector aminoácido incluyen los naturales, así como los aminoácidos secundarios y los análogos de aminoácidos no naturales, tales como citrulina. Los componentes conectores de aminoácidos se pueden diseñar y optimizar su selectividad para la escisión enzimática por una enzima en particular, por ejemplo, una proteasa asociada a tumor, cathepsina B, C y D, o una proteasa plasmina.

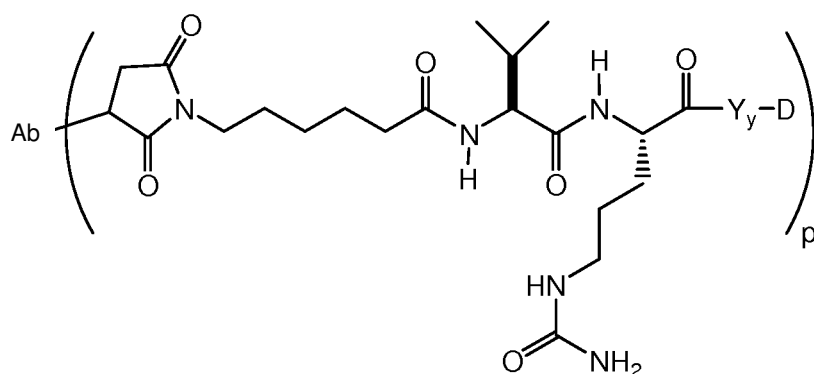
A continuación se muestran estructuras de componentes conectores ejemplares (en las que la línea ondulada indica sitios de fijación covalente a otros componentes del CAF):



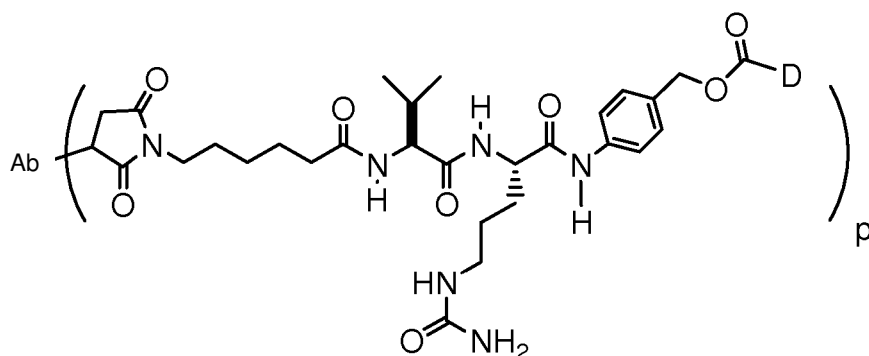
Los componentes conectores ejemplares adicionales y abreviaturas incluyen (en los que el anticuerpo (Ab) y el conector se representan, y p es de 1 a aproximadamente 8):



Val-cit



MC-val-cit



MC-val-cit-PAB

5

10

15

20

Los grupos nucleófilos en los anticuerpos incluyen, pero no se limitan a: (i) grupos amina de extremo N, (ii) grupos amina de cadena lateral, por ejemplo, lisina, (iii) grupos tiol de cadena lateral, por ejemplo, cisteína, y (iv) grupos hidroxilo o amino de glúcido donde el anticuerpo está glucosilado. Los grupos amina, tiol e hidroxilo son nucleófilos y pueden reaccionar para formar enlaces covalentes con grupos electrófilos en los restos de conector y de reactivos conectores que incluyen: (i) ésteres activos, tales como ésteres NHS, ésteres HOBt, haloformatos y haluros de ácido; (ii) haluros de alquilo y bencilo, tales como haloacetamidas; (iii) aldehídos, cetonas, grupos carboxílico y maleimido. Determinados anticuerpos tienen disulfuros intercatenarios reducibles, es decir, puentes de cisteína. Los anticuerpos se pueden hacer reactivos para su conjugación con reactivos conectores mediante tratamiento con un agente reductor, tal como DTT (ditiotreitolo). Cada puente de cisteína formará por tanto, teóricamente, dos nucleófilos de tiol reactivos. Se pueden introducir grupos nucleófilos adicionales en los anticuerpos a través de la reacción de lisinas con 2-iminotiolano (reactivo de Traut) lo que da como resultado la conversión de una amina en un tiol. Grupos tiol reactivos se pueden introducir en el anticuerpo (o fragmento del mismo) mediante la introducción de uno, dos, tres, cuatro o más residuos de cisteína (por ejemplo, preparando anticuerpos mutantes que comprenden uno o más residuos de aminoácido de cisteína no naturales).

25

Los conjugados de anticuerpo y fármaco de la invención para su combinación con un anticuerpo anti-CD20 como se define en el presente documento, también se pueden producir mediante modificación del anticuerpo para introducir restos electrófilos, que pueden reaccionar con los sustituyentes nucleófilos en el reactivo conector o fármaco. Los glúcidos de anticuerpos glucosilados se pueden oxidar, por ejemplo, con reactivos oxidantes de peryodato, para formar grupos aldehído o cetona que pueden reaccionar con el grupo amina de reactivos conectores o restos de fármaco. Los grupos de base de Schiff imina resultantes pueden formar un enlace

estable, o se pueden reducir, por ejemplo, mediante reactivos de borohidruro para formar enlaces de amina estables. En un aspecto, la reacción de la porción glucídica de un anticuerpo glucosilado con galactosa oxidasa o bien metaperyodato de sodio puede generar grupos carbonilo (aldehído y cetona) en la proteína que pueden reaccionar con grupos apropiados en el fármaco (Hermanson, *Bioconjugate Techniques*). En otro aspecto, las proteínas que contienen residuos de serina o treonina N terminales pueden reaccionar con metaperyodato de sodio, lo que da como resultado la producción de un aldehído en lugar del primer aminoácido (Geoghegan & Stroh, (1992) *Bioconjugate Chem.* 3:138-146; documento US 5362852). Dicho aldehído se puede hacer reaccionar con un resto de fármaco o nucleófilo conector.

Asimismo, los grupos nucleófilos en un resto de fármaco incluyen, pero no se limitan a: amina, tiol, hidroxilo, hidracida, oxima, hidracina, tiosemicarbazona, carboxilato de hidracina, y grupos arilhidracida que pueden reaccionar para formar enlaces covalentes con grupos electrófilos en los restos de conector y reactivos conectores que incluyen: (i) ésteres activos, tales como ésteres NHS, ésteres HOBt, haloformatos y haluros de ácido; (ii) haluros de alquilo y bencilo, tales como haloacetamidas; (iii) aldehídos, cetonas, grupos carboxílico y maleimido.

Todavía en otro aspecto, el anticuerpo tiene uno o más residuos de lisina que se pueden modificar químicamente para introducir uno o más grupos sulfhidrilo. La unidad de anticuerpo se enlaza a la unidad de conector por medio de un átomo de azufre del grupo sulfhidrilo. Los reactivos que se pueden usar para modificar lisinas incluyen, pero no se limitan a, S-acetiltioacetato de N-succinimidilo (SATA) y clorhidrato de 2-iminotiolano (reactivo de Traut).

En otro modo de realización, el anticuerpo puede tener uno o más grupos glucídicos que se pueden modificar químicamente para tener uno o más grupos sulfhidrilo. La unidad de anticuerpo se enlaza a la unidad de conector, tal como la unidad de extensión, por medio de un átomo de azufre del grupo sulfhidrilo, como se divulga en el presente documento.

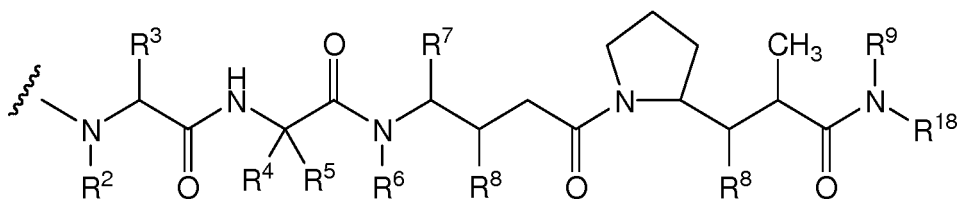
Todavía en otro aspecto, el anticuerpo puede tener uno o más grupos glucídicos que se pueden oxidar para proporcionar un grupo aldehído (-CHO) (véase, por ejemplo, Laguzza, *et al.*, *J. Med. Chem.* 1989, 32(3), 548-55). El aldehído correspondiente puede formar un enlace con un sitio reactivo en un extensor. Los sitios reactivos en un extensor que pueden reaccionar con un grupo carbonilo en un anticuerpo incluyen, pero no se limitan a, hidracina e hidroxilamina. Otros protocolos para la modificación de proteínas para la fijación o asociación de unidades de medicamento se describen en Coligan *et al.*, *Current Protocols in Protein Science*, vol. 2, John Wiley & Sons (2002).

Los procedimientos para la conjugación de restos de conector-fármaco a las proteínas dirigidas a células tales como anticuerpos, inmunoglobulinas o fragmentos de las mismas se encuentran, por ejemplo, en los documentos US5.208.020; US6.441.163; WO2005037992; WO2005081711; y WO2006/034488.

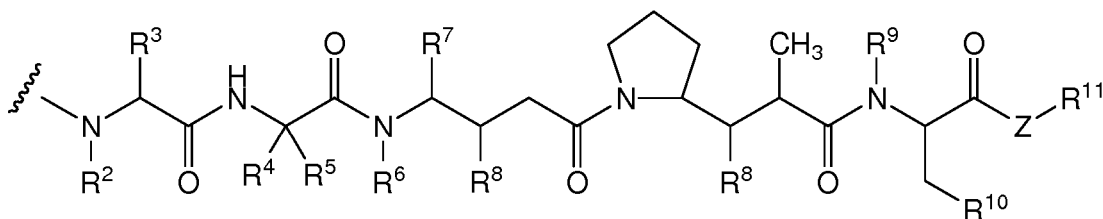
De forma alternativa, se pueden preparar una proteína de fusión que comprende el anticuerpo y agente citotóxico, por ejemplo, mediante técnicas recombinantes o síntesis de péptidos. La longitud del ADN puede comprender regiones respectivas que codifican las dos porciones del conjugado, adyacentes entre sí o bien separadas por una región que codifica un péptido conector que no destruye las propiedades deseadas del conjugado.

Todavía en otro aspecto, el anticuerpo se puede conjugar a un "receptor" (tal como estreptavidina) para su utilización en la preselección como diana de tumores, en el que el conjugado de anticuerpo-receptor se administra al paciente, seguido de la eliminación del conjugado no unido de la circulación usando un agente de aclaramiento y, a continuación, la administración de un "ligando" (por ejemplo, avidina) que se conjuga a un agente citotóxico (por ejemplo, un radionúclido).

En un aspecto del inmunoconjugado, el agente citotóxico, D, es una auristatina de fórmula D_E o D_F



D_E



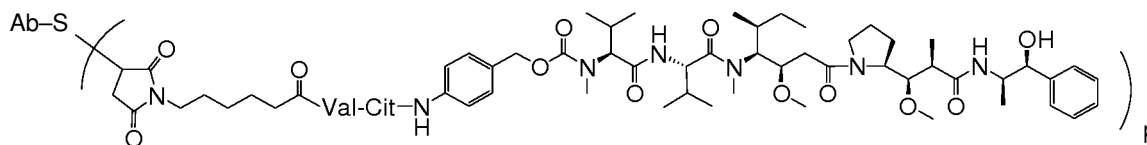
D_F

y en la que R² y R⁶ son cada uno metilo, R³ y R⁴ son cada uno isopropilo, R⁷ es *sec*-butilo, cada R⁸ se selecciona independientemente de CH₃, O-CH₃, OH y H; R⁹ es H; R¹⁰ es arilo; Z es -O- o -NH-; R¹¹ es H, alquilo C₁-C₈, o - (CH₂)₂-O-(CH₂)₂-O-(CH₂)₂-O-CH₃; y R¹⁸ es -C(R⁸)₂-C(R⁸)₂-arilo; y

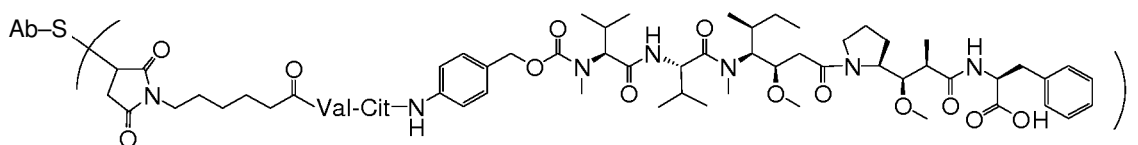
(d) p varía de aproximadamente 1 a 8.

Se proporcionan además los siguientes aspectos para cualquiera de los immunoconjugados anteriores. En un aspecto, un immunoconjugado tiene actividad de destrucción celular *in vitro* o *in vivo*. En un aspecto, el conector se fija al anticuerpo a través de un grupo tiol en el anticuerpo. En un aspecto, el conector es escindible por una proteasa. En un modo de realización, el conector comprende un dipéptido val-cit. En un aspecto, el conector comprende una unidad de p-aminobencilo. En un aspecto, la unidad de p-aminobencilo se dispone entre el fármaco y un sitio de escisión de proteasa en el conector. En un modo de realización, la unidad de p-aminobencilo es p-aminobenciloxycarbonilo (PAB). En un modo de realización, el conector comprende 6-maleimidocaproilo. En un modo de realización, el 6-maleimidocaproilo se dispone entre el anticuerpo y un sitio de escisión de proteasa en el conector. Los modos de realización anteriores se pueden producir individualmente o en cualquier combinación entre sí.

En un modo de realización, el fármaco se selecciona de MMAE y MMAF. En un modo de realización, el immunoconjugado tiene la fórmula



en la que Ab es cualquiera de los anticuerpos anti-CD22 anteriores, S es un átomo de azufre y p varía de 2 a 5. En un modo de realización, el immunoconjugado tiene la fórmula



en la que Ab es cualquiera de los anticuerpos anti-CD22 anteriores, S es un átomo de azufre y p varía de aproximadamente 1 a aproximadamente 6, de aproximadamente 2 a aproximadamente 5, de aproximadamente 2 a aproximadamente 6, de aproximadamente 2 a aproximadamente 4, de aproximadamente 2 a aproximadamente 3, de aproximadamente 3 a aproximadamente 4, de aproximadamente 3 a aproximadamente 5, de aproximadamente 3 a aproximadamente 6, o de aproximadamente 4 a aproximadamente 6.

Ensayo de actividad *in vitro* para la determinación de CI50 de un conjugado de anticuerpo CD22-fármaco de acuerdo con la invención

"CI50" se refiere a la concentración de un compuesto particular requerido para inhibir un 50 % de una actividad medida específica. La CI50 de los agentes que inhiben la interacción de CD22 se puede medir, entre otras cosas, como se describe posteriormente.

El término "actividad citotóxica" se refiere a un efecto destructor de células, citostático o inhibidor del crecimiento de un conjugado de anticuerpo-fármaco o un metabolito intracelular de un conjugado de anticuerpo-fármaco. La actividad citotóxica se puede expresar como el valor CI₅₀, que es la concentración (molar o en masa) por unidad de volumen a la que la mitad de las células sobreviven.

Expresión en la superficie de CD22 humano en múltiples líneas celulares de linfoma

Se cultivaron y obtuvieron diecinueve líneas celulares de linfoma que expresaban cantidades variables de CD22 en su superficie en crecimiento en fase logarítmica. Las células se resuspendieron en tampón de lavado FACS (PBS, albúmina sérica bovina al 0,5 %, acida sódica al 0,1 %) que contenía 100 µg/ml de IgG de ratón normal e IgG humana normal y se mantuvieron en hielo. Aproximadamente 1×10^6 células/100 µl se tiñeron con APC anti-huCD22 (mIgG1, clon RFB4, Southern Biotech n.º 9361-11) o isotipo IgG1 APC murino (BD Pharmingen n.º 555751) durante 30 minutos en hielo. Las células muertas se tiñeron con 7-AAD (BD Pharmingen n.º 559925). Los datos se adquirieron en un citómetro de flujo BD FACS Calibur™ y se analizaron con el programa informático FlowJo™. La determinación de la CI50 para hu10F4v3-SMCC-DM1 o cada uno de los fármacos libres (DM1, MMAF o MMAE) se determinó cultivando células de linfoma como anteriormente, obteniendo las células cultivadas en fase logarítmica y sembrando 5.000 células en 90 µl de medio de cultivo por pocillo en placas de 96 pocillos. El CAF y el fármaco libre se diluyeron en serie dentro del intervalo de detección (empezando a 300 µg/ml para CAF, o 90 nM para fármaco libre y diluyendo hasta una diana de ensayo esencialmente nula). Se añadieron alícuotas de 10 µl de CAF diluido o fármaco libre para replicar los pocillos que contenían células y se incubaron durante 3 días a 37 °C. A cada pocillo se añadieron 100 µl de CellTiter Glo™ y se incubó durante 30 min. La quimioluminiscencia se detectó y se analizaron los datos usando el programa informático Prism™.

El componente oligosacárido puede afectar significativamente a las propiedades relevantes para la eficacia de una glucoproteína terapéutica, incluyendo la estabilidad física, la resistencia al ataque de las proteasas, las interacciones con el sistema inmunitario, la farmacocinética y la actividad biológica específica. Dichas propiedades pueden depender no solamente de la presencia o ausencia de los oligosacáridos, sino también de sus estructuras específicas. Se pueden hacer algunas generalizaciones entre la estructura de los oligosacáridos y la función de las glucoproteínas. Por ejemplo, determinadas estructuras de los oligosacáridos median en el aclaramiento rápido de la glucoproteína del torrente sanguíneo a través de interacciones con proteínas de unión a hidratos de carbono específicos, mientras que otras se pueden unir por anticuerpos y desencadenar reacciones inmunitarias no deseadas (Jenkins, N. *et al.*, Nature Biotechnol. 14 (1996) 975-981).

Las células de mamífero son huéspedes excelentes para la producción de glucoproteínas terapéuticas, debido a su capacidad para glucosilar proteínas de la forma más compatible para la aplicación humana (Cumming, D.A. *et al.*, Glycobiology 1 (1991) 115-130; Jenkins, N. *et al.*, Nature Biotechnol. 14 (1996) 975-981). Las bacterias muy raramente glucosilan proteínas y, al igual que otros tipos de huéspedes comunes, tales como levaduras, hongos filamentosos, células de insectos y vegetales, generan patrones de glucosilación asociados al rápido aclaramiento del torrente sanguíneo, interacciones inmunitarias no deseadas y, en algunos casos específicos, una actividad biológica reducida. Entre las células de mamífero, las células de ovario de hámster chino (CHO) se han usado lo más comúnmente durante los dos últimos decenios. Además de dar patrones de glucosilación adecuados, estas células permiten la generación consistente de líneas celulares clónicas altamente productivas, genéticamente estables. Se pueden cultivar hasta densidades altas en biorreactores simples usando medios libres de suero y permiten el desarrollo de bioprocesos seguros y reproducibles. Otras células animales comúnmente usadas incluyen las células de riñón de cría de hámster (BHK) y las células de mieloma de ratón NSO y SP2/0. Más recientemente también se ha sometido a prueba la producción a partir de animales transgénicos (Jenkins, N. *et al.*, Nature Biotechnol. 14 (1996) 975-981).

Todos los anticuerpos contienen estructuras glucídicas en posiciones conservadas de las regiones constantes de la cadena pesada, teniendo cada isotipo un ordenamiento distinto de estructuras glucídicas unidas por enlaces N, lo cual afecta de modo variable el ensamblamiento, la secreción o la actividad funcional de la proteína (Wright, A. y Morrison, S.L., Trends Biotech. 15 (1997) 26-32). La estructura del hidrato de carbono unido por enlaces N fijado varía considerablemente en función del grado de procesamiento y puede incluir oligosacáridos de alto contenido en manosa, con ramificaciones múltiples, así como complejos biantenarios (Wright, A. y Morrison, S.L., Trends Biotech. 15 (1997) 26-32). Típicamente, hay un procesamiento heterogéneo de las estructuras de los oligosacáridos de núcleo fijadas en un sitio de glucosilación particular, de tal manera que incluso los anticuerpos monoclonales existan como glucoformas múltiples. Asimismo, se ha demostrado que se producen diferencias importantes en la glucosilación de anticuerpos entre líneas celulares e incluso se han observado diferencias de escasa importancia en una línea celular dada cultivada en condiciones de cultivo diferentes (Lifely, M.R. *et al.*, Glycobiology 5 (1995), 813-822).

Una manera de obtener grandes aumentos de potencia, mientras se mantiene un procedimiento de producción sencillo y que evita posiblemente efectos secundarios indeseables significativos consiste en potenciar las funciones efectoras naturales mediadas por células de los anticuerpos monoclonales manipulando su componente oligosacárido, como se describe en Umana, P. *et al.*, Nature Biotechnol. 17 (1999) 176-180 y el documento US 6.602.684. Los anticuerpos de tipo IgG1, los anticuerpos más comúnmente usados en la inmunoterapia contra el cáncer, son glucoproteínas que tienen un sitio de glucosilación unido por enlaces N conservado en la Asn297 de cada dominio CH2. Los dos oligosacáridos biantenarios complejos fijados a Asn297 están ocultos entre los dominios CH2, formando contactos extensivos con la cadena principal polipeptídica y su presencia es esencial para que el anticuerpo medie en funciones efectoras, tales como la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) (Lifely, M.R., *et al.*, Glycobiology 5 (1995) 813-822; Jefferis, R., *et al.*, Immunol Rev. 163 (1998) 59-76; Wright, A. y Morrison, S. L., Trends Biotechnol. 15 (1997) 26-32).

Se ha demostrado previamente que la sobreexpresión de la $\beta(1,4)$ -N-acetilglucosaminiltransferasa 111 ("GnTII17y"), una glucosiltransferasa que cataliza la formación de oligosacáridos bisecados, en células de ovario de hámster chino (CHO) aumenta significativamente la actividad ADCC *in vitro* de un anticuerpo monoclonal quimérico antineuroblastoma (chCE7) producido por células CHO manipuladas (véase Umana, P. *et al.*, Nature Biotechnol. 17 (1999) 176-180; and WO 99/154342). El anticuerpo chCE7 pertenece a una gran clase de anticuerpos monoclonales no conjugados que tienen una alta afinidad y especificidad tumorales, pero tienen una potencia insuficiente para ser clínicamente útiles cuando se producen en líneas celulares industriales estándar que carecen de la enzima GnTIII (Umana, P. *et al.*, Nature Biotechnol. 17 (1999) 176-180). Ese estudio fue el primero en demostrar que se podrían obtener grandes aumentos en la actividad ADCC manipulando las células productoras de anticuerpos para expresar GnTIII, lo que dio lugar también a un aumento en la proporción de oligosacáridos bisecados asociados a la región constante (Fc), incluyendo oligosacáridos bisecados no fucosilados, por encima de los niveles encontrados en anticuerpos naturales.

El término "cáncer", como se usa en el presente documento, incluye linfomas, leucemias linfocíticas, cáncer de pulmón, carcinomas broncopulmonares no microcíticos (CBPNM), carcinoma bronquioloalveolar, cáncer de huesos, cáncer de páncreas, cáncer de piel, cáncer de cabeza o cuello, melanoma cutáneo o intraocular, cáncer uterino, cáncer ovárico, cáncer rectal, cáncer de la región anal, cáncer de estómago, cáncer gástrico, cáncer de colon, cáncer de mama, cáncer uterino, carcinoma de las trompas de Falopio, carcinoma endometrial, carcinoma del cuello uterino, carcinoma de la vagina, carcinoma de la vulva, enfermedad de Hodgkin, cáncer de esófago, cáncer de intestino delgado, cáncer del sistema endocrino, cáncer de la glándula tiroidea, cáncer de la glándula paratiroidea, cáncer de la glándula suprarrenal, sarcoma de partes blandas, cáncer de uretra, cáncer de pene, cáncer de próstata, cáncer de vejiga, cáncer de riñón o uréter, carcinoma de células renales, carcinoma de la pelvis renal, mesotelioma, cáncer hepatocelular, cáncer biliar, neoplasias del sistema nervioso central (SNC), tumores del eje espinal, glioma del tronco encefálico, glioblastoma multiforme, astrocitomas, schwannomas, ependimomas, meduloblastomas, meningiomas, carcinomas epidermoides, adenoma hipofisario, incluyendo versiones resistentes al tratamiento de cualquiera de los cánceres anteriores, o una combinación de uno o más de los cánceres anteriores. En un modo de realización, el término cáncer se refiere a un cáncer que expresa CD20.

El término "expresión del antígeno CD20" pretende indicar un nivel significativo de expresión del antígeno CD20 en una célula, preferentemente en la superficie celular de un linfocito T o B, más preferentemente de un linfocito B, de un tumor o cáncer, respectivamente, un tumor no sólido preferentemente. Los pacientes que tienen un "cáncer que expresa CD20" se pueden determinar mediante ensayos estándar conocidos en la técnica. Por ejemplo, la expresión del antígeno CD20 se puede medir usando detección inmunohistoquímica (IHQ), FACS o por medio de detección basada en PCR del ARNm correspondiente.

El término "cáncer que expresa CD20", como se usa en el presente documento, se refiere a todos los cánceres en los que las células cancerosas muestran una expresión del antígeno CD20. Preferentemente, cáncer que expresa CD20, como se usa en el presente documento, se refiere a linfomas (preferentemente linfomas no hodgkinianos (LNH) de linfocitos B) y leucemias linfocíticas. Dichos linfomas y leucemias linfocíticas incluyen, por ejemplo, a) linfomas foliculares, b) linfomas de células pequeñas no hendidas/linfoma de Burkitt (incluyendo linfoma de Burkitt endémico, linfoma de Burkitt esporádico y linfoma no Burkitt), c) linfomas de la zona marginal (incluyendo linfoma de linfocitos B de la zona marginal extraganglionar (linfomas de tejido linfático asociado a las mucosas, TLAM), linfoma de linfocitos B de la zona marginal ganglionar y linfoma esplénico de la zona marginal), d) linfoma de células del manto (LCM), e) linfoma de células grandes (incluyendo linfoma difuso de células grandes (DLCL) de linfocitos B, linfoma difuso de células mixtas, linfoma inmunoblástico, linfoma primario mediastínico de linfocitos B, linfoma angiocéntrico-linfoma pulmonar de linfocitos B), f) tricoleucemia, g) linfoma linfocítico, macroglobulinemia de Waldenstrom, h) leucemia linfocítica aguda (LLA), leucemia linfocítica crónica (LLC)/linfoma linfocítico de células pequeñas (LLCP), leucemia prolinfocítica de linfocitos B, i) neoplasias de células plasmáticas, mieloma de células plasmáticas, mieloma múltiple, plasmocitoma, j) enfermedad de Hodgkin.

En un modo de realización, el cáncer que expresa CD20 es un linfoma no hodgkiniano (LNH) de linfocitos B. En otro modo de realización, el cáncer que expresa CD20 es un linfoma de células del manto (LCM), leucemia linfocítica aguda (LLA), leucemia linfocítica crónica (LLC), linfoma difuso de células grandes (DLCL) de linfocitos B, linfoma de Burkitt, tricoleucemia, linfoma folicular, mieloma múltiple, linfoma de la zona marginal, trastorno linfoproliferativo postrasplante (TLPPT), linfoma asociado al VIH, macroglobulinemia de Waldenstrom o linfoma primario del SNC.

El término "un procedimiento de tratamiento" o la formulación respectiva como una reivindicación de uso, cuando se aplica, por ejemplo, al cáncer, se refiere a un procedimiento o tratamiento que se diseña para reducir o eliminar el número de células cancerosas de un paciente, o para aliviar los síntomas de un cáncer. "Un procedimiento de tratamiento" del cáncer o de otro trastorno proliferativo no significa necesariamente que las células cancerosas u otro trastorno se eliminarán realmente, que el número de células o el trastorno se reducirán realmente, o que los síntomas de un cáncer o de otro trastorno se aliviarán realmente. A menudo, un

procedimiento de tratamiento del cáncer se realizará incluso cuando tenga poca probabilidad de éxito, pero que, dado el historial médico y la esperanza de supervivencia estimada de un paciente, se considere que a pesar de todo inducirá un tratamiento beneficioso en su conjunto.

Los términos "coadministración" o "coadministrar" se refieren a la administración de dicho anti-CD20 afucosilado y dicho conjugado de anticuerpo CD22-fármaco como dos formulaciones separadas (o como una formulación única). La coadministración puede ser simultánea o secuencial en cualquier orden, en la que preferentemente hay un período de tiempo en el que ambos (o todos) los agentes activos ejercen simultáneamente sus actividades biológicas. Dicho anticuerpo afucosilado anti-CD20 y dicho conjugado de anticuerpo CD22-fármaco se coadministran simultáneamente o bien secuencialmente (por ejemplo, por vía intravenosa (i.v.) a través de una infusión continua (una para el anticuerpo anti-CD20 y finalmente una para dicho conjugado de anticuerpo CD22-fármaco; o por ejemplo, el anticuerpo anti-CD20 se administra por vía intravenosa (i.v.) a través de una infusión continua y dicho conjugado de anticuerpo CD22-fármaco se administra por vía oral). Cuando ambos agentes terapéuticos se coadministran secuencialmente, la dosis se administra el mismo día en dos administraciones separadas, o bien uno de los agentes se administra el día 1 y el segundo se coadministra del día 2 al día 7, preferentemente del día 2 al 4. Por tanto, en un modo de realización el término "secuencialmente" significa dentro de los 7 días siguientes a la dosis del primer componente (anticuerpo anti-CD20 o conjugado de anticuerpo CD22-fármaco), preferentemente dentro de los 4 días siguientes a la dosis del primer componente; y el término "simultáneamente" significa al mismo tiempo. El término "coadministración", con respecto a las dosis de mantenimiento de dicho anticuerpo anti-CD20 afucosilado y dicho conjugado de anticuerpo CD22-fármaco, significa que las dosis de mantenimiento se pueden coadministrar simultáneamente, si el ciclo de tratamiento es apropiado para ambos fármacos, por ejemplo, cada semana. O bien, el conjugado de anticuerpo CD22-fármaco se administra, por ejemplo, cada uno a tres días y dicho anticuerpo afucosilado se administra cada semana. O bien, las dosis de mantenimiento se coadministran secuencialmente, en el transcurso de un día o bien dentro de varios días.

Es evidente que los anticuerpos se administran al paciente en una "cantidad terapéuticamente eficaz" (o simplemente "cantidad eficaz") que es la cantidad del compuesto o combinación respectiva que provocará la respuesta biológica o médica de un tejido, sistema, animal o ser humano que el investigador, veterinario, médico u otro facultativo están buscando.

La cantidad de dicho anticuerpo anti-CD20 afucosilado y dicho conjugado de anticuerpo CD22-fármaco que se van a coadministrar y el momento de la coadministración dependerán del tipo (especie, sexo, edad, peso, etc.) y del estado del paciente que se está tratando y de la gravedad de la enfermedad o afección que se está tratando. Dicho anticuerpo anti-CD20 afucosilado y dicho conjugado de anticuerpo CD22-fármaco se coadministran de manera adecuada al paciente de una vez o durante una serie de tratamientos, por ejemplo, el mismo día o al día siguiente.

Si la administración es por vía intravenosa, el tiempo de infusión inicial para dicho anticuerpo anti-CD20 afucosilado o dicho conjugado de anticuerpo CD22-fármaco puede ser más prolongado que los tiempos de infusión posteriores, por ejemplo, aproximadamente 90 minutos para la infusión inicial y aproximadamente 30 minutos para infusiones posteriores (si la infusión inicial se tolera bien).

En función del tipo y gravedad de la enfermedad, una dosis inicial candidata para la coadministración de ambos fármacos al paciente es de aproximadamente 0,1 mg/kg a 50 mg/kg (por ejemplo, 0,1-20 mg/kg) de dicho anticuerpo anti-CD20 afucosilado y de 1 µg/kg a 50 mg/kg (por ejemplo, 0,1-20 mg/kg) de dicho conjugado de anticuerpo CD22-fármaco. En un aspecto, la dosis preferente de dicho anticuerpo anti-CD20 afucosilado (preferentemente el anticuerpo B-Ly1 humanizado afucosilado) estará en el intervalo de aproximadamente 0,05 mg/kg a aproximadamente 30 mg/kg. Por tanto, se puede coadministrar al paciente una o más dosis de aproximadamente 0,5 mg/kg, 2,0 mg/kg, 4,0 mg/kg, 10 mg/kg o 30 mg/kg (o cualquier combinación de las mismas). En un aspecto, la dosis preferente de dicho conjugado de anticuerpo CD22-fármaco estará en el intervalo de aproximadamente 0,05 mg/kg a aproximadamente 30 mg/kg. Por tanto, se puede coadministrar al paciente una o más dosis de aproximadamente 0,5 mg/kg, 2,0 mg/kg, 4,0 mg/kg, 10 mg/kg o 30 mg/kg (o cualquier combinación de las mismas).

Para tratar estos cánceres, en un aspecto, dicho conjugado de anticuerpo CD22-fármaco se administra por infusión intravenosa, como se menciona anteriormente. La dosis administrada por infusión está en el intervalo de aproximadamente 1 µg/m² a aproximadamente 10.000 µg/m² por dosis, en general una dosis por semana para un total de una, dos, tres o cuatro dosis. De forma alternativa, el intervalo de dosificación es de aproximadamente 1 µg/m² a aproximadamente 1000 µg/m², de aproximadamente 1 µg/m² a aproximadamente 800 µg/m², de aproximadamente 1 µg/m² a aproximadamente 600 µg/m², de aproximadamente 1 µg/m² a aproximadamente 400 µg/m², de aproximadamente 10 µg/m² a aproximadamente 500 µg/m², de aproximadamente 10 µg/m² a aproximadamente 300 µg/m², de aproximadamente 10 µg/m² a aproximadamente 200 µg/m² y de aproximadamente 1 µg/m² a aproximadamente 200 µg/m². La dosis se puede administrar una vez al día, una vez a la semana, varias veces a la semana pero menos de una vez al día, varias veces al mes pero menos de una vez al día, varias veces al mes pero menos de una vez a la semana, una vez al mes o intermitentemente para

remediar o aliviar los síntomas de la enfermedad. La administración puede continuar en cualquiera de los intervalos divulgados hasta la remisión del tumor o de los síntomas del linfoma o la leucemia que se está tratando. La administración puede continuar después de que se logra la remisión o el alivio de los síntomas cuando dicha remisión o alivio se prolonga con dicha administración continua.

En función del tipo (especie, sexo, edad, peso, etc.) y afección del paciente y del tipo de anticuerpo anti-CD20 afucosilado, la dosis y la pauta de administración de dicho anticuerpo anti-CD20 afucosilado pueden diferir de las de dicho conjugado de anticuerpo CD22-fármaco. Por ejemplo, dicho anticuerpo anti-CD20 afucosilado se puede administrar, por ejemplo, cada una a tres semanas y dicho conjugado de anticuerpo CD22-fármaco se puede administrar diariamente o cada 2 a 10 días. También se puede administrar una dosis de carga inicial más alta, seguida de una o más dosis más bajas.

En un aspecto, la dosificación preferente de dicho anticuerpo anti-CD20 afucosilado (preferentemente el anticuerpo B-Ly1 humanizado afucosilado) en la combinación con dicho conjugado de anticuerpo CD22-fármaco de acuerdo con la invención será de 800 a 1600 mg (en un aspecto de 800 a 1200 mg) el día 1, 8, 15 de un ciclo de dosificación de 3 a 6 semanas y a continuación, en una dosis de 400 a 1200 (en un aspecto de 800 a 1200 mg el día 1 de hasta nueve ciclos de dosificación de 3 a 4 semanas). Lo más preferentemente, la dosis es una dosis fija de 1000 mg en una pauta de administración de tres semanas, con la posibilidad de un ciclo adicional de una dosis fija de 1000 mg en la segunda semana.

Todavía en otro aspecto, la dosis de dicho conjugado de anticuerpo CD22-fármaco en la combinación con el anticuerpo anti-CD20 afucosilado de acuerdo con la invención es de aproximadamente 1,5 mg/kg a aproximadamente 3 mg/kg en una pauta de administración de tres semanas, preferentemente de aproximadamente 1,7 mg/kg a aproximadamente 2,5 mg/kg, lo más preferentemente de aproximadamente 1,8 mg/kg o de aproximadamente 2,4 mg/kg. Dichas dosis más preferentes se están sometiendo a prueba actualmente en ensayos clínicos para monoterapia con conjugado de anticuerpo CD22-fármaco.

Todavía en otro aspecto, la dosis del anticuerpo anti-CD20 afucosilado en combinación con dicho conjugado de anticuerpo CD22-fármaco de acuerdo con la invención es una dosis fija de aproximadamente 1000 mg el día 1 (ciclo 1 día 1 (C1D1)), otra dosis fija de aproximadamente 1000 mg el día 8 (C1D8) y otra dosis fija de aproximadamente 1000 mg el día 15 (C1D15), seguidas de seis dosis fijas más de aproximadamente 1000 mg de dicho anticuerpo anti-CD20 afucosilado (ciclo 2) cada tres semanas: día 22 (C2D1), día 43 (C2D2), día 64 (C2D3), día 85 (C2D4), día 106 (C2D5) y día 127 (C2D6). En dicho aspecto, la dosis del conjugado de anticuerpo CD22-fármaco en la combinación con el anticuerpo anti-CD20 afucosilado de acuerdo con la invención es de aproximadamente 2,4 mg/kg cada tres semanas o de forma alternativa de 1,8 mg/kg cada tres semanas. En dicho aspecto, la administración de dicho conjugado de anticuerpo CD22-fármaco en la combinación con el anticuerpo anti-CD20 afucosilado de acuerdo con la invención es el día 1 (C1D1), día 22 (C2D1), día 43 (C2D2), día 64 (C2D3), día 85 (C2D4), día 106 (C2D5) y día 127 (C2D6).

Preferentemente, en dichas pautas de administración como se ha descrito anteriormente, el anticuerpo anti-CD20 afucosilado es obinutuzumab o GA101. También preferentemente, en dichas pautas posológicas como se describe anteriormente, dicho conjugado de anticuerpo CD22-fármaco es anti-CD22-MC-vc-PAB-MMAE.

La invención también proporciona un procedimiento para aliviar una enfermedad autoinmunitaria, que comprende administrar a un paciente que padece la enfermedad autoinmunitaria, una cantidad terapéuticamente eficaz de dicho anticuerpo anti-CD20 afucosilado como se divulga en el presente documento y un conjugado de anticuerpo 10F4 humanizado-fármaco de uno cualquiera de los aspectos precedentes. En aspectos preferentes, el anticuerpo se administra por vía intravenosa o subcutánea. El conjugado de anticuerpo-fármaco se administra por vía intravenosa en una dosis en el intervalo de aproximadamente $1 \mu\text{g}/\text{m}^2$ a aproximadamente $100 \text{ mg}/\text{m}^2$ por dosis y, en un aspecto específico, la dosis es de $1 \mu\text{g}/\text{m}^2$ a aproximadamente $500 \mu\text{g}/\text{m}^2$. La dosis se puede administrar una vez al día, una vez a la semana, varias veces a la semana pero menos de una vez al día, varias veces al mes pero menos de una vez al día, varias veces al mes pero menos de una vez a la semana, una vez al mes o intermitentemente para remediar o aliviar los síntomas de la enfermedad. La administración puede continuar en cualquiera de los intervalos divulgados hasta el alivio de los síntomas de la enfermedad autoinmunitaria que se está tratando. La administración puede continuar después de que se logra el alivio de los síntomas cuando dicho alivio se prolonga con dicha administración continuada.

La invención también proporciona un procedimiento de tratamiento de un trastorno de linfocitos B que comprende administrar a un paciente que padece un trastorno de linfocitos B, tal como un trastorno proliferativo de linfocitos B (incluyendo sin limitación linfoma y leucemia) o una enfermedad autoinmunitaria, una cantidad terapéuticamente eficaz de dicho anticuerpo anti-CD20 afucosilado como se divulga en el presente documento y un anticuerpo 10F4 humanizado de uno cualquiera de los aspectos precedentes, en el que el anticuerpo no está conjugado a una molécula citotóxica o una molécula detectable. El anticuerpo típicamente se administrará en un intervalo de dosificación de aproximadamente $1 \mu\text{g}/\text{m}^2$ a aproximadamente $1000 \text{ mg}/\text{m}^2$.

La dosis recomendada puede variar si hay una coadministración adicional de agente quimioterápico y basándose en el tipo de agente quimioterápico.

En un modo de realización, el medicamento es útil para prevenir o reducir la metástasis o la diseminación adicional en dicho paciente que padece cáncer, preferentemente un cáncer que expresa CD20. El medicamento es útil para aumentar la duración de la supervivencia de dicho paciente, aumentar la supervivencia sin progresión de dicho paciente, aumentar la duración de la respuesta, lo que da como resultado una mejoría estadísticamente significativa y clínicamente trascendente del paciente tratado, que se mide por la duración de la supervivencia, la supervivencia sin progresión, la tasa de respuesta o la duración de la respuesta. En un modo de realización preferente, el medicamento es útil para aumentar la tasa de respuesta en un grupo de pacientes.

En el contexto de la presente invención, se pueden usar otros agentes citotóxicos, quimioterápicos o antineoplásicos adicionales, o compuestos que potencian los efectos de dichos agentes (por ejemplo, citocinas) en el tratamiento combinado del cáncer con el anticuerpo anti-CD20 afucosilado y dicho conjugado de anticuerpo CD22-fármaco. Dichas moléculas están presentes de manera adecuada en combinación en cantidades que son eficaces para el fin pretendido. En un modo de realización, el tratamiento combinado con dicho anticuerpo anti-CD20 afucosilado y dicho conjugado de anticuerpo CD22-fármaco se usa sin dichos agentes citotóxicos, quimioterápicos o antineoplásicos adicionales, o compuestos que potencian los efectos de dichos agentes.

Dichos agentes incluyen, por ejemplo: agentes alquilantes o agentes con acción alquilante, tales como ciclofosfamida (CTX; por ejemplo, Cytosan®), clorambucilo (CHL; por ejemplo, Leukeran®), cisplatino (CisP; por ejemplo, Platinol®), busulfano (por ejemplo, Myleran®), melfalán, carmustina (BCNU), estreptozotocina, trietilenmelamina (TEM), mitomicina C y similares; antimetabolitos tales como metotrexato (MTX), etopósido (VP16; por ejemplo, Vepesid®), 6-mercaptopurina (6MP), 6-tioguanina (6TG), citarabina (Ara-C), 5-fluoruracilo (5-FU), capecitabina (por ejemplo, Xeloda®), dacarbacina (DTIC) y similares; antibióticos tales como actinomicina D, doxorubicina (DXR; por ejemplo, Adriamicina®), daunorubicina (daunomicina), bleomicina, mitramicina y similares; alcaloides tales como alcaloides de la vinca tales como vincristina (VCR), vinblastina y similares; y otros agentes antineoplásicos tales como paclitaxel (por ejemplo, Taxol®) y derivados de paclitaxel; los agentes citostáticos, glucocorticoides tales como dexametasona (DEX; por ejemplo, Decadron®) y corticosteroides tales como prednisona, inhibidores enzimáticos nucleosídicos tales como hidroxiurea, enzimas que disminuyen aminoácidos tales como asparaginasa, leucovorina y otros derivados de ácido fólico y agentes antineoplásicos similares diversos. Los siguientes agentes se pueden usar también como agentes adicionales: arnifostina (por ejemplo, Ethyl®), dactinomicina, mecloretamina (mostaza nitrogenada), estreptozotocina, ciclofosfamida, lomustina (CCNU), doxorubicina lipo (por ejemplo, Doxil®), gemcitabina (por ejemplo, Gemzar®), daunorubicina lipo (por ejemplo, Daunoxome®), procarbacin, mitomicina, docetaxel (por ejemplo, Taxotere®), aldesleucina, carboplatino, oxaliplatino, cladribina, campotecina, CPT 11 (irinotecán), 10-hidroxi-7-etil-camptotecina (SN38), floxuridina, fludarabina, ifosfamida, idarrubicina, mesna, interferón beta, interferón alfa, mitoxantrona, topotecán, leuprolida, megestrol, melfalán, mercaptopurina, plicamicina, mitotano, pegaspargasa, pentostatina, pipobromano, plicamicina, tamoxifeno, tenipósido, testolactona, tioguanina, tiotepa, mostaza de uracilo, vinorelbina, clorambucilo. En un modo de realización, el tratamiento combinado con anticuerpo anti-CD20 afucosilado y dicho conjugado de anticuerpo CD22-fármaco se usa sin dichos agentes adicionales.

El uso de los agentes citotóxicos y antineoplásicos descritos anteriormente, así como de fármacos antineoplásicos antiproliferativos específicos de diana como inhibidores de proteína-quinasas, en regímenes quimioterápicos está en general bien caracterizado en las técnicas de tratamiento contra el cáncer y su uso en el presente documento está sujeto a las mismas consideraciones de vigilancia de la tolerabilidad y de la eficacia y de control de las vías de administración y de las dosificaciones, con algunos ajustes. Por ejemplo, las dosificaciones reales de los agentes citotóxicos pueden variar en función de la respuesta de las células cultivadas del paciente determinada usando procedimientos de histocultivo. En general, la dosificación se reducirá en comparación con la cantidad usada en ausencia de otros agentes adicionales.

Las dosificaciones típicas de un agente citotóxico eficaz se pueden encontrar en los intervalos recomendados por el fabricante y, cuando lo indiquen las respuestas *in vitro* o las respuestas de modelos animales, se pueden reducir en hasta aproximadamente un orden de magnitud de concentración o cantidad. Por tanto, la dosificación real dependerá del criterio del médico, del estado del paciente y de la eficacia del procedimiento terapéutico basado en el grado de respuesta *in vitro* del cultivo primario de células malignas o de la muestra de tejido histocultivado, o de las respuestas observadas en modelos animales apropiados.

En el contexto de la presente invención, se puede aplicar una cantidad eficaz de radiación ionizante y/o se puede usar un radiofármaco además del tratamiento combinado con anticuerpo anti-CD20 afucosilado y dicho conjugado de anticuerpo CD22-fármaco de un cáncer que expresa CD20. La fuente de radiación puede ser interna o bien externa al paciente que se está tratando. Cuando la fuente es externa al paciente, el tratamiento se conoce como radioterapia externa (RTE). Cuando la fuente de radiación es interna al paciente, el tratamiento se denomina braquiritradioterapia (BT). Los átomos radioactivos para su uso en el contexto de la presente invención se pueden seleccionar del grupo que incluye, pero no se limita a, radio, cesio-137, iridio-192, americio-241, oro-198, cobalto-57, cobre-67, tecnecio-99, yodo-123, yodo-131 e indio-111. También es posible marcar el

anticuerpo con dichos isótopos radioactivos. En un modo de realización, el tratamiento combinado con anticuerpo anti-CD20 afucosilado y dicho conjugado de anticuerpo CD22-fármaco se usa sin dicha radiación ionizante.

La radioterapia es un tratamiento estándar para controlar tumores irresecables o inoperables y/o metástasis tumorales. Se han observado resultados mejorados cuando la radioterapia se ha combinado con quimioterapia. La radioterapia se basa en el principio de que la radiación en dosis altas suministrada a una zona diana dará como resultado la muerte de las células reproductoras tanto en los tejidos tumorales como en los normales. El régimen de dosificación de radiación se define, en general, en términos de dosis de radiación absorbida (Gy), tiempo y fraccionamiento y el oncólogo deberá definirlo cuidadosamente. La cantidad de radiación que recibe un paciente dependerá de diversas consideraciones, pero las dos más importantes son la localización del tumor con respecto a otras estructuras u órganos críticos del organismo y el grado de diseminación del tumor. Un tratamiento típico para un paciente sometido a radioterapia será un programa de tratamiento durante un período de 1 a 6 semanas, con una dosis total comprendida entre 10 y 80 Gy, administrada al paciente en una única fracción diaria de aproximadamente 1,8 a 2,0 Gy, 5 días a la semana. En un modo de realización preferente de la presente invención hay sinergia cuando los tumores de pacientes humanos se tratan con el tratamiento combinado de la invención y radiación. En otras palabras, la inhibición del crecimiento tumoral mediante los agentes que comprenden la combinación de la invención se potencia cuando se combina con radiación, opcionalmente con agentes quimioterápicos o antineoplásicos adicionales. Los parámetros de las radioterapias adyuvantes se incluyen, por ejemplo, en el documento WO 99/60023.

Los anticuerpos anti-CD20 afucosilados y/o el conjugado de anticuerpo CD22-fármaco de acuerdo con la invención se administran a un paciente de acuerdo con procedimientos conocidos, mediante administración intravenosa como un bolo o mediante infusión continua durante un período de tiempo, por vías intramuscular, intraperitoneal, intracerebroespinal, subcutánea, intraarticular, intrasinovial o intratecal. En un modo de realización, la administración del anticuerpo es intravenosa o subcutánea.

Como se usa en el presente documento, se pretende que un "vehículo farmacéuticamente aceptable" incluya cualquiera y todos los materiales compatibles con la administración farmacéutica, incluyendo disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardadores de la absorción, y otros materiales y compuestos compatibles con la administración farmacéutica. Excepto en la medida en que cualquier agente o medio convencional sea incompatible con el compuesto activo, se contempla su uso en las composiciones de la invención. En las composiciones también se pueden incorporar compuestos activos complementarios.

Composiciones farmacéuticas:

Las composiciones farmacéuticas se pueden obtener procesando el anticuerpo anti-CD20 y/o el conjugado de anticuerpo CD22-fármaco de acuerdo con la presente invención con vehículos inorgánicos u orgánicos farmacéuticamente aceptables. Se puede usar lactosa, almidón de maíz o derivados del mismo, talco, ácido esteárico o sus sales y similares, por ejemplo, como dichos vehículos para comprimidos, comprimidos recubiertos, grageas y cápsulas de gelatina dura. Por ejemplo, los vehículos adecuados para cápsulas de gelatina blanda son aceites vegetales, ceras, grasas, polioles semisólidos y líquidos y similares. Sin embargo, en función de la naturaleza de la sustancia activa, habitualmente no se requieren vehículos en el caso de cápsulas de gelatina blanda. Por ejemplo, los vehículos adecuados para la producción de soluciones y jarabes son agua, polioles, glicerol, aceite vegetal y similares. Por ejemplo, los vehículos adecuados para supositorios son aceites naturales o endurecidos, ceras, grasas, polioles semilíquidos o líquidos y similares.

Además, las composiciones farmacéuticas pueden contener conservantes, solubilizantes, estabilizantes, agentes humectantes, emulsionantes, edulcorantes, colorantes, saborizantes, sales para variar la presión osmótica, tampones, agentes de enmascaramiento o antioxidantes. También pueden contener aún otras sustancias terapéuticamente valiosas.

En un aspecto de la invención, la composición comprende tanto dicho anticuerpo anti-CD20 afucosilado con una cantidad de fucosa que es un 60 % o menos (preferentemente dicho anticuerpo B-Ly1 humanizado afucosilado) como dicho conjugado de anticuerpo CD22-fármaco para su uso en el tratamiento del cáncer, en particular, de cáncer que expresa CD20 (preferentemente un linfoma o leucemia linfocítica, por ejemplo, un linfoma no hodgkiniano (LNH) de linfocitos B.

Dicha composición farmacéutica puede comprender además uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables.

La presente invención proporciona además una composición farmacéutica, por ejemplo, para su uso en cáncer, que comprende (i) una primera cantidad eficaz de un anticuerpo anti-CD20 afucosilado con una cantidad de fucosa que es un 60 % o menos (preferentemente un anticuerpo B-Ly1 humanizado afucosilado), y (ii) una segunda cantidad eficaz de un conjugado de anticuerpo CD22-fármaco. Dicha composición opcionalmente comprende vehículos y/o excipientes farmacéuticamente aceptables.

Las composiciones farmacéuticas del anticuerpo anti-CD20 afucosilado solo usadas de acuerdo con la presente invención se preparan para almacenamiento mezclando un anticuerpo que tenga el grado deseado de pureza con los vehículos, excipientes o estabilizantes farmacéuticamente aceptables opcionales (Remington's Pharmaceutical Sciences, 16.^a edición, Osol, A., (ed.) (1980)), en forma de formulaciones liofilizadas o de soluciones acuosas. Los vehículos, excipientes o estabilizantes aceptables no son tóxicos para los destinatarios a las dosis y concentraciones empleadas, e incluyen tampones tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes incluyendo ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbencilamonio; cloruro de hexametanio; 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); polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 residuos); proteínas, tales como seroalbúmina, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros hidratos de carbono incluyendo glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; glúcidos tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones formadores de sales tales como sodio; complejos metálicos (por ejemplo, complejos de Zn-proteína) y/o tensioactivos no iónicos tales como TWEENTM, PLURONICSTM o polietilenglicol (PEG).

Las composiciones farmacéuticas de conjugados de anticuerpo CD22-fármaco pueden ser similares a las descritas anteriormente para el anticuerpo anti-CD20 afucosilado.

Las composiciones farmacéuticas del conjugado de anticuerpo CD22-fármaco con fármacos tradicionales incluyen las adecuadas para su administración oral, nasal, tópica (incluyendo bucal y sublingual), rectal, vaginal y/o parenteral. Las composiciones se pueden presentar convenientemente en una forma de dosificación unitaria y se pueden preparar por cualquiera de los procedimientos bien conocidos en la técnica de farmacia. La cantidad de ingrediente activo que se puede combinar con un material de vehículo para producir una forma de dosificación individual variará en función del huésped que se está tratando, así como del modo de administración particular. La cantidad de ingrediente activo que se puede combinar con un material de vehículo para producir una forma de dosificación individual será en general esa cantidad de un compuesto de fórmula I que produzca un efecto terapéutico. En general, de un cien por ciento, esta cantidad variará de aproximadamente un 1 por ciento a aproximadamente un noventa y nueve por ciento de ingrediente activo, preferentemente de aproximadamente un 5 por ciento a aproximadamente un 70 por ciento, lo más preferentemente de aproximadamente un 10 por ciento a aproximadamente un 30 por ciento. Los procedimientos de preparación de estas composiciones incluyen la etapa de mezclar un conjugado de anticuerpo CD22-fármaco con el vehículo y, opcionalmente, uno o más ingredientes secundarios. En general, las composiciones farmacéuticas del conjugado de anticuerpo CD22-fármaco se preparan mezclando uniforme e íntimamente un conjugado de anticuerpo CD22-fármaco con vehículos líquidos, o vehículos sólidos finamente divididos, o ambos, y a continuación, si es necesario, conformando al producto. Las composiciones adecuadas para administración oral pueden estar en forma de cápsulas, sellos, bolsitas, píldoras, comprimidos, pastillas (que usan una base aromatizada, habitualmente sacarosa y goma arábiga o tragacanto), polvos, gránulos, o como una solución o una suspensión en un líquido acuoso o no acuoso, o como una emulsión líquida de aceite en agua o agua en aceite, o como un elixir o jarabe, o como pastillas (usando una base inerte, tal como gelatina y glicerina, o sacarosa y goma arábiga) y/o como enjuagues bucales y similares, conteniendo cada uno una cantidad predeterminada de un compuesto de la presente invención como ingrediente activo. Un compuesto de la presente invención también se puede administrar como un bolo, electuario o pasta.

En otro modo de realización de la invención, el anticuerpo anti-CD20 afucosilado y el conjugado de anticuerpo CD22-fármaco se formulan en dos composiciones farmacéuticas separadas.

Los ingredientes activos también se pueden atrapar en microcápsulas preparadas, por ejemplo, por técnicas de coacervación o por polimerización interfacial, por ejemplo, hidroximetilcelulosa o microcápsulas de gelatina y microcápsulas de poli(metilmetakrilato), respectivamente, en sistemas de administración de fármacos coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Dichas técnicas se divulgan en Remington's Pharmaceutical Sciences 16.^a edición, Osol, A. (ed.) (1980).

Se pueden preparar preparaciones de liberación sostenida. Los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el anticuerpo, en las que dichas matrices se encuentran en forma de artículos conformados, por ejemplo, películas o microcápsulas. Los ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(2-hidroxietil-metakrilato) o poli(alcohol vinílico)), poliláctidos (documento US 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutámico y gamma-etil-L-glutamato, copolímeros no degradables de etileno-acetato de vinilo, copolímeros degradables de ácido láctico-ácido glicólico tales como el LUPRON DEPOTTM (microesferas inyectables compuestas por copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolida) y ácido poli-D-(-)-3-hidroxibutírico.

Las formulaciones que se van a usar para su administración *in vivo* deben ser estériles. Esto se consigue fácilmente por filtración a través de membranas de filtración estériles.

5 Un modo de realización es una composición que comprende un anticuerpo B-Ly1 humanizado que está afucosilado con una cantidad de fucosa de un 60 % o menos de la cantidad total de oligosacáridos (glúcidos) en Asn297, y el conjugado de anticuerpo CD22-fármaco como se divulga en el presente documento, para el tratamiento del cáncer.

10 La presente invención proporciona además un procedimiento para el tratamiento del cáncer, que comprende administrar a un paciente que necesite dicho tratamiento (i) una primera cantidad eficaz de un anticuerpo anti-CD20 afucosilado con una cantidad de fucosa que es un 60 % o menos (preferentemente, un anticuerpo B-Ly1 humanizado afucosilado) y (ii) una segunda cantidad eficaz de un conjugado de anticuerpo CD22-fármaco.

15 En un aspecto, la cantidad de fucosa está entre un 40 % y un 60 %.

Preferentemente, dicho cáncer es un cáncer que expresa CD20.

Preferentemente, dicho cáncer que expresa CD20 es un linfoma o leucemia linfocítica.

20 Preferentemente, dicho anticuerpo anti-CD20 afucosilado es un anticuerpo anti-CD20 de tipo II.

Preferentemente, dicho anticuerpo es un anticuerpo B-Ly1 humanizado. Preferentemente, dicho anticuerpo B-Ly1 humanizado es obinutuzumab.

25 Preferentemente, dicho conjugado de anticuerpo CD22-fármaco es anti-CD22-MC-vc-PAB-MMAE.

Preferentemente, dicho anticuerpo anti-CD20 afucosilado es un anticuerpo B-Ly1 humanizado y dicho conjugado de anticuerpo CD22-fármaco es anti-CD22-MC-vc-PAB-MMAE y dicho cáncer es un cáncer que expresa CD20, preferentemente un linfoma o leucemia linfocítica.

30 Como se usa en el presente documento, el término "paciente" se refiere preferentemente a un ser humano que necesita tratamiento con un anticuerpo anti-CD20 afucosilado (por ejemplo, un paciente que padece un cáncer que expresa CD20) para cualquier fin y, más preferentemente, un ser humano que necesita dicho tratamiento para tratar el cáncer, o una afección o lesión precancerosa. Sin embargo, el término "paciente" también se puede referir a animales no humanos, preferentemente mamíferos tales como perros, gatos, caballos, vacas, cerdos, ovejitas y primates no humanos, entre otros.

La invención comprende además un anticuerpo anti-CD20 afucosilado con una cantidad de fucosa que es un 60 % o menos, y un conjugado de anticuerpo CD22-fármaco para su uso en el tratamiento del cáncer.

40 Preferentemente, dicho anticuerpo anti-CD20 afucosilado es un anticuerpo B-Ly1 humanizado.

Preferentemente, dicho conjugado de anticuerpo CD22-fármaco, en un modo de realización del procedimiento de acuerdo con la invención, es el conjugado de anticuerpo CD22-fármaco que es anti-CD22-MC-vc-PAB-MMAE.

45 Preferentemente, dicho anticuerpo anti-CD20 afucosilado es un anticuerpo B-Ly1 humanizado y dicho conjugado de anticuerpo CD22-fármaco es anti-CD22-MC-vc-PAB-MMAE.

50 Preferentemente, dicho cáncer es un cáncer que expresa CD20, preferentemente un linfoma o leucemia linfocítica.

Se proporcionan los siguientes ejemplos y figuras para ayudar a la comprensión de la presente invención, el verdadero alcance de la cual se expone en las reivindicaciones adjuntas.

55 **Procedimientos experimentales**

El objetivo principal del estudio fue investigar el efecto de GA101 (obinutuzumab), como se define en el presente documento, en combinación con un conjugado de anticuerpo CD22 y fármaco (CAF CD22) en el modelo de xenoinjerto de LBDCG de WSU-DLCL2 diseminado en ratones SCID transgénicos para CD16 humano en comparación con monoterapia con GA101, monoterapia con rituximab y la combinación de rituximab con CAF CD22. El diseño del estudio se representa en la tabla 3.

Tabla 3: Diseño del estudio

Grupo	Número de animales	Compuesto	Dosis (µg)	Vía de administración	N.º de tratamientos
1	10	vehículo	-	i.v., una vez/semana	3
2	10	GA101 en histidina 20 mM, NaCl 140 mM, pH 6,0, 65 % de afucosilación	600 µg (30 mg/kg)	i.v., una vez/semana	3
3	10	Rituximab en NaCitrato 25 mM, NaCl 154 mM, Tween80 al 0,07 % p/v, pH 6,5 ± 0,3, 8 % de afucosilación	600 µg (30 mg/kg)	i.v., una vez/semana	3
4	10	CAF CD22 en acetato de histidina 20 mM, sacarosa 240 mM, PS 20 al 0,02 %, pH 5,5	80 µg (4 mg/kg)	i.v., una vez	1
5	10	GA101	600 µg	i.v., una vez/semana	3
		CAF CD22	80 µg	i.v., una vez	1
6	10	Rituximab	600 µg	i.v., una vez/semana	3
		CAF CD22	80 µg	i.v., una vez	1

Cultivo celular y aplicación celular

Las células de linfoma difuso de linfocitos B grandes humano de WSU-DLCL se obtuvieron originalmente de Wayne-State University y después de la expansión se depositaron en el banco de células interno Roche Glycart. La línea celular tumoral se cultivó de manera rutinaria en DMEM que contenía FCS al 10 % (Gibco) a 37 °C en una atmósfera saturada en agua con CO₂ al 5 %. Se usó el paso 15 para el trasplante en ratones Scid transgénicos para CD16 humano. En una viabilidad de un 96 % se inyectaron i.v. 5x10⁶ células por animal en la vena de la cola en 200 µl de medio de cultivo celular Aim V (GIBCO). La expresión de CD20 y CD22 se confirmó en células de linfoma de WSU-DLCL2 mediante FACS. Para este fin, se tiñeron 0,2 Mio de células por triplicado con PE anti-CD20 humano (BD Bioscience n.º 555623), PE anti-CD22 humano (BD Bioscience n.º 337899) o los controles de isotipo IgG1 de ratón (BD Bioscience n.º 555749) o IgG2b de ratón (BD Bioscience n.º 555743). La fluorescencia media se midió usando el protocolo de placa en FACS Cantoll (programa informático FACS Diva).

Animales

60 ratones SCID hembra transgénicos para FcγR3 (ratones SCID tg para CD16), de 7-8 semanas de edad al inicio del experimento (adquiridos de Charles River) se mantuvieron en condiciones libres de patógenos específicos con ciclos diarios de 12 h de luz/12 h de oscuridad de acuerdo con las directrices acordadas (GV-Solas, Felasa, TierschG). El protocolo de estudio experimental se revisó y aprobó por la oficina veterinaria local, licencia n.º P2008016. Después de su llegada, los animales se mantuvieron durante una semana para que se acostumbraran a un nuevo entorno y para su observación. La vigilancia continua de la salud se llevó a cabo de manera regular.

Tratamiento

Los animales se aleatorizaron para la expresión de CD16 en las células NK murinas con un promedio de un 70 %. El tratamiento empezó 12 días después del trasplante de células. Los anticuerpos terapéuticos GA101 y rituximab y el vehículo correspondiente se administraron por vía i.v. los días 12, 19 y 26 del estudio a la dosis de 30 mg/kg como agente único. El CAF CD22 se administró una vez el día 12 del estudio a la dosis de 4 mg/kg. Las diluciones de anticuerpos se preparaban recientemente a partir de la solución madre antes de su uso. El estudio se finalizó el día 273.

Vigilancia, criterios de sacrificio y autopsia

Los animales se controlaron diariamente para determinar síntomas clínicos y la detección de efectos adversos. Los criterios de sacrificio para los animales fueron la enfermedad visible: pelaje desaliñado, espalda arqueada, respiración fuerte, disfunción locomotora, HLP (parálisis de las patas traseras). Los ratones se sacrificaron de acuerdo con los criterios de sacrificio.

Datos estadísticos

Los datos de supervivencia se analizaron estadísticamente mediante la prueba de Wilcoxon por pares y la prueba del orden logarítmico por pares.

Resultados

La línea celular de linfoma difuso de linfocitos B grandes WSU-DLCL2 se inoculó por vía intravenosa (5×10^6 células) en la vena de la cola de los ratones SCID transgénicos para CD16 humano. Los ratones se aleatorizaron para igual expresión de CD16 de células NK y el tratamiento empezó el día 12 después del trasplante de células. El conjugado de anticuerpo CD22 y fármaco se administró una vez el día 12 a una dosis de 4 mg/kg, mientras que GA101, rituximab y el vehículo correspondiente se administraron por vía i.v. los días 12, 19 y 26 del estudio a una dosis de 30 mg/kg. Los animales del grupo de control recibieron PBS. Todos los animales se controlaron diariamente para determinar síntomas clínicos y la detección de efectos adversos y se sacrificaron de acuerdo con los criterios de sacrificio establecidos. La finalización del estudio fue el día 273 del estudio. Los datos de supervivencia se representaron con la curva de supervivencia (figura 1) y se analizaron estadísticamente mediante la prueba de Wilcoxon por pares y la prueba del orden logarítmico por pares (figura 2). Los valores marcados con * en la figura 2 indican una diferencia significativa. Los valores de la mediana de supervivencia y supervivencia global para los diferentes grupos de tratamiento se dan en la tabla 4 y la tabla 5. Para la combinación de GA101 + CAF CD22 y rituximab + CAF CD22 no se alcanzó la mediana de supervivencia. Todos los animales que sobrevivieron hasta el día 273 cuando se terminó el experimento estaban libres de tumor durante la biopsia.

Tabla 4: Mediana de supervivencia

Grupo	PBS	Rituximab	Rituximab + CAF CD22	GA101 + CAF CD22	CAF CD22	GA101
Mediana de supervivencia [días]	40	75	-	-	80	86,5

Tabla 5: Supervivencia global al final del experimento (día 273):

Grupo	PBS	Rituximab	Rituximab + CAF CD22	GA101 + CAF CD22	CAF CD22	GA101
Supervivencia global	0/10	2/10	6/10	6/10	3/10	1/10

Todos los grupos son significativamente diferentes del grupo de vehículo excepto de GA101 en la prueba de Wilcoxon por pares aunque GA101 y rituximab no muestran ninguna diferencia significativa. Ambas combinaciones, GA101 más CAF CD22, así como rituximab más CAF CD22, muestran una supervivencia significativamente aumentada en comparación con las respectivas monoterapias en la prueba de Wilcoxon. En la prueba del orden logarítmico las combinaciones no muestran ninguna diferencia significativa con la monoterapia de CAF anti-CD22, sin embargo, para ambas combinaciones no se alcanzó la mediana de supervivencia de todos los grupos y no se pudo analizar debido a que en las combinaciones, GA101 más CAF CD22 y rituximab más CAF CD22, 6 de cada 10 animales estaban libres de tumor cuando se terminó el experimento. Por el contrario, en los grupos tratados con GA101, rituximab y CAF anti-CD22 como agente único solamente 1, 2 y 3 animales respectivamente estuvieron libres de tumor al final del estudio. Por tanto, la combinación de GA101 y CAF CD22 y la combinación de rituximab y CAF CD22 presentaron una eficacia aumentada en comparación con las respectivas monoterapias en términos de supervivencia global.

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> F. Hoffmann-La Roche AG
- 5 <120> Politerapia de un anticuerpo CD20 afucosilado con un conjugado de anticuerpo CD22-fármaco
- <130> 31512 y PR5606
- 10 <140>
<141>
- <150> Documento US 61/818810
<151> 02-05-2013
- 15 <160> 51
- <170> PatentIn versión 3.2
- 20 <210> 1
<211> 25
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
- <220>
25 <223> se sintetiza la secuencia
- <400> 1
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
 1 5 10 15
 Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
 20 25
- 30 <210> 2
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
- 35 <220>
<223> se sintetiza la secuencia
- <400> 2
 Gly Tyr Glu Phe Ser Arg Ser Trp Met Asn
 5 10
- 40 <210> 3
<211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
- 45 <220>
<223> se sintetiza la secuencia
- <400> 3
 Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 5 10
- 50 <210> 4
<211> 18
<212> PRT
55 <213> Secuencia artificial
- <220>
<223> se sintetiza la secuencia

<400> 4
 Gly Arg Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr Ser Gly Lys
 1 5 10 15

Phe Lys Gly

5 <210> 5
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> se sintetiza la secuencia

<400> 5
 Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu
 1 5 10 15

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

Ala Arg

15 <210> 6
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> se sintetiza la secuencia

<400> 6
 Asp Gly Ser Ser Trp Asp Trp Tyr Phe Asp Val
 5 10

25 <210> 7
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> se sintetiza la secuencia

<400> 7
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 5 10

35 <210> 8
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> se sintetiza la secuencia

45 <400> 8
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
 1 5 10 15

Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys
 20

<210> 9

<211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> se sintetiza la secuencia

<400> 9
Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Asn Gly Asn Thr Phe Leu
 1 5 10 15
Glu

10 <210> 10
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> se sintetiza la secuencia

<400> 10
Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Val Gly Asn Thr Phe Leu
 1 5 10 15
Glu

20 <210> 11
 <211> 15
 <212> PRT

25 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> se sintetiza la secuencia

30 <400> 11
Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
 1 5 10 15

<210> 12
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> se sintetiza la secuencia

40 <400> 12
Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
 5

<210> 13
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> se sintetiza la secuencia

50 <400> 13

ES 2 693 370 T3

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
1 5 10 15

Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr
20 25 30

Tyr Cys

<210> 14

<211> 9

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> se sintetiza la secuencia

10

<400> 14

Phe Gln Gly Ser Gln Phe Pro Tyr Thr
5

<210> 15

15 <211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

20 <223> se sintetiza la secuencia

<400> 15

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
5 10

25 <210> 16

<211> 120

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

30 <220>

<223> se sintetiza la secuencia

<400> 16

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

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Glu Phe Ser
20 25 30

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

Glu Trp Val Gly Arg Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr
50 55 60

Ser Gly Lys Phe Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser
65 70 75

Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp

ES 2 693 370 T3

		80		85		90									
	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Asp	Gly	Ser	Ser	Trp	Asp	Trp
					95					100				105	
	Tyr	Phe	Asp	Val	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser
					110					115				120	

5 <210> 17
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> se sintetiza la secuencia

15 <400> 17
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
 1 5 10 15
 Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val
 20 25 30
 His Ser Asn Gly Asn Thr Phe Leu Glu Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
 35 40 45
 Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe
 50 55 60
 Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Asp
 65 70 75
 Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr
 80 85 90
 Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser Gln Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gln
 95 100 105
 Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 110

20 <210> 18
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> se sintetiza la secuencia

20 <400> 18
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
 1 5 10 15
 Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val
 20 25 30
 His Ser Val Gly Asn Thr Phe Leu Glu Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
 35 40 45
 Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe
 50 55 60
 Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Asp

ES 2 693 370 T3

					65					70					75
	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Thr
					80					85					90
	Tyr	Tyr	Cys	Phe	Gln	Gly	Ser	Gln	Phe	Pro	Tyr	Thr	Phe	Gly	Gln
					95					100					105
	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys								
					110										

5 <210> 19
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> se sintetiza la secuencia

<400> 19
 Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Ala Gly Asn Thr Phe Leu
 1 5 10 15

Glu

15 <210> 20
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> se sintetiza la secuencia

<400> 20
 Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Gln Gly Asn Thr Phe Leu
 1 5 10 15

Glu

25 <210> 21
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> se sintetiza la secuencia

<400> 21
 Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Ser Gly Asn Thr Phe Leu
 1 5 10 15

Glu

35 <210> 22
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> se sintetiza la secuencia

<400> 22

	Arg	Ser	Ser	Gln	Ser	Ile	Val	His	Ser	Asp	Gly	Asn	Thr	Phe	Leu
	1				5					10					15
	Glu														
	<210> 23														
	<211> 16														
5	<212> PRT														
	<213> Secuencia artificial														
	<220>														
	<223> se sintetiza la secuencia														
10	<400> 23														
	Arg	Ser	Ser	Gln	Ser	Ile	Val	His	Ser	Ile	Gly	Asn	Thr	Phe	Leu
	1				5					10					15
	Glu														
	<210> 24														
15	<211> 16														
	<212> PRT														
	<213> Secuencia artificial														
	<220>														
20	<223> se sintetiza la secuencia														
	<400> 24														
	Arg	Ser	Ser	Gln	Ser	Ile	Val	His	Ser	Ile	Gly	Ala	Thr	Phe	Leu
	1				5					10					15
	Glu														
25	<210> 25														
	<211> 16														
	<212> PRT														
	<213> Secuencia artificial														
30	<220>														
	<223> se sintetiza la secuencia														
	<400> 25														
	Arg	Ser	Ser	Gln	Ser	Ile	Val	His	Ser	Ile	Gly	Gln	Thr	Phe	Leu
	1				5					10					15
	Glu														
35	<210> 26														
	<211> 120														
	<212> PRT														
	<213> Secuencia artificial														
40	<220>														
	<223> se sintetiza la secuencia														
	<400> 26														
	Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Gln	Ser	Gly	Pro	Glu	Leu	Val	Lys	Pro	Gly
	1				5					10					15
45															

ES 2 693 370 T3

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

<210> 27
<211> 112
5 <212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
10 <223> se sintetiza la secuencia

<400> 27
Asp Ile Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu
1 5 10 15
Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val
20 25 30
His Ser Asn Gly Asn Thr Phe Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro
35 40 45
Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe
50 55 60
Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
65 70 75
Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val
80 85 90
Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser Gln Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gly
95 100 105
Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
110

15 <210> 28
<211> 112
<212> PRT
<213> Mus sp.

20 <220>
<221> MISC_FEATURE
<223> secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada (VH) del anticuerpo monoclonal murino anti-CD20 B-Ly1

ES 2 693 370 T3

<400> 28

Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys
1 5 10 15

Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Tyr Ser Trp Met Asn Trp Val Lys Leu
20 25 30

Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp
35 40 45

Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr
50 55 60

Ala Asp Lys Ser Ser Asn Thr Ala Tyr Met Gln Leu Thr Ser Leu Thr
65 70 75 80

Ser Val Asp Ser Ala Val Tyr Leu Cys Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly
85 90 95

Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
100 105 110

- 5 <210> 29
<211> 103
<212> PRT
<213> Mus sp.

- 10 <220>
<221> MISC_FEATURE
<223> secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera (VL) del anticuerpo monoclonal murino anti-CD20 B-Ly1

- 15 <400> 29
Asn Pro Val Thr Leu Gly Thr Ser Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser
1 5 10 15

Lys Ser Leu Leu His Ser Asn Gly Ile Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Leu
20 25 30

Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gln Met Ser Asn
35 40 45

Leu Val Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Ser Ser Gly Ser Gly Thr
50 55 60

Asp Phe Thr Leu Arg Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val

ES 2 693 370 T3

65 70 75 80

Tyr Tyr Cys Ala Gln Asn Leu Glu Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly
85 90 95

Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100

<210> 30
<211> 119
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> secuencias de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada (VH) del anticuerpo B-Ly1 humanizado (B-HH2)

<400> 30
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Tyr Ser
20 25 30

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

Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 31
<211> 119
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> secuencias de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada (VH) del anticuerpo B-Ly1 humanizado (B-HH3)

<400> 31

ES 2 693 370 T3

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Tyr Ser
20 25 30

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

Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 32
<211> 119
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> secuencias de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada (VH) del anticuerpo B-Ly1 humanizado (B-HH4)

<400> 32
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Val Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Tyr Ser
20 25 30

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

Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

ES 2 693 370 T3

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

Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 33
<211> 119
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> secuencias de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada (VH) del anticuerpo B-Ly1 humanizado (B-HH5)

<400> 33
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Tyr Ser
20 25 30

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

Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 34
<211> 119
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> secuencias de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada (VH) del anticuerpo B-Ly1 humanizado (B-HH6)

<400> 34

ES 2 693 370 T3

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Tyr Ser
20 25 30

Trp Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 35
<211> 119
5 <212> PRT
<213> Artificial

<220>
10 <223> secuencias de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada (VH) del anticuerpo B-Ly1 humanizado (B-HH7)

<400> 35
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Tyr Ser
20 25 30

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

Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe
50 55 60

ES 2 693 370 T3

Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 36
<211> 119
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> secuencias de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada (VH) del anticuerpo B-Ly1 humanizado (B-HH8)

<400> 36
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Tyr Ser
20 25 30

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

Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 37
<211> 119
<212> PRT
<213> Artificial

<220>

ES 2 693 370 T3

<223> secuencias de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada (VH) del anticuerpo B-Ly1 humanizado (B-HH9)

<400> 37

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ser Tyr Ser
20 25 30

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

Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

5

<210> 38

<211> 119

<212> PRT

10 <213> Artificial

<220>

<223> secuencias de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada (VH) del anticuerpo B-Ly1 humanizado (B-HL8)

15

<400> 38

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

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

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

ES 2 693 370 T3

Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 39
<211> 119
5 <212> PRT
<213> Artificial

<220>
10 <223> secuencias de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada (VH) del anticuerpo B-Ly1 humanizado (B-HL10)

<400> 39
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

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

Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

15 <210> 40
<211> 119
<212> PRT

<213> Artificial

<220>

5 <223> secuencias de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada (VH) del anticuerpo B-Ly1 humanizado (B-HL11)

<400> 40

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

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

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

Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

10 <210> 41
<211> 119
<212> PRT
<213> Artificial

15 <220>

<223> secuencias de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada (VH) del anticuerpo B-Ly1 humanizado (B-HL12)

<400> 41

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

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

20 Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met

ES 2 693 370 T3

35

40

45

Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 42
<211> 119
5 <212> PRT
<213> Artificial

<220>
10 <223> secuencias de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada (VH) del anticuerpo B-Ly1 humanizado (B-HL13)

<400> 42
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

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

Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 43
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>

<223> secuencias de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada (VH) del anticuerpo B-Ly1 humanizado (B-HL14)

<400> 43

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

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

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

Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe
 50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 44
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>

<223> secuencias de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada (VH) del anticuerpo B-Ly1 humanizado (B-HL15)

<400> 44

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

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

ES 2 693 370 T3

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

Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 45
<211> 119
5 <212> PRT
<213> Artificial

<220>
10 <223> secuencias de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada (VH) del anticuerpo B-Ly1 humanizado (B-HL16)

<400> 45
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

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

Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

ES 2 693 370 T3

<210> 46
 <211> 119
 <212> PRT
 5 <213> Artificial

<220>
 <223> secuencias de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada (VH) del anticuerpo B-Ly1 humanizado (B-HL17)

10 <400> 46
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Tyr Ser
 20 25 30
 Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe
 50 55 60
 Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

15 <210> 47
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> secuencias de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera (VL) del anticuerpo B-Ly1 humanizado B-KV1

<400> 47
 Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15

ES 2 693 370 T3

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser
20 25 30

Asn Gly Ile Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gln Met Ser Asn Leu Val Ser Gly Val Pro
50 55 60

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ala Gln Asn
85 90 95

Leu Glu Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

Arg Thr Val
115

<210> 48
<211> 113
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> se sintetiza la secuencia

<400> 48
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
1 5 10 15

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

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

Glu Trp Val Ser Val Ile Ser Gly Asp Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr
50 55 60

Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser
65 70 75

Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
80 85 90

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
95 100 105

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
110

<210> 49
<211> 107
<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> se sintetiza la secuencia

5

<400> 49

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

<210> 50

<211> 219

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> se sintetiza la secuencia

15

<400> 50

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

Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala
				125					130					135
Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	Lys
				140					145					150
Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln
				155					160					165
Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu
				170					175					180
Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His	Lys
				185					190					195
Val	Tyr	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	Val
				200					205					210
Thr	Lys	Ser	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys						
				215										

<210> 51
 <211> 450
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> se sintetiza la secuencia

<400> 51

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

ES 2 693 370 T3

Leu Thr Ser Gly Val	His Thr Phe Pro	Ala Val Leu Gln Ser Ser
170		175 180
Gly Leu Tyr Ser	Leu Ser Ser Val Val	Thr Val Pro Ser Ser Ser
185		190 195
Leu Gly Thr Gln	Thr Tyr Ile Cys Asn	Val Asn His Lys Pro Ser
200		205 210
Asn Thr Lys Val	Asp Lys Lys Val Glu	Pro Lys Ser Cys Asp Lys
215		220 225
Thr His Thr Cys	Pro Pro Cys Pro Ala	Pro Glu Leu Leu Gly Gly
230		235 240
Pro Ser Val Phe	Leu Phe Pro Pro Lys	Pro Lys Asp Thr Leu Met
245		250 255
Ile Ser Arg Thr	Pro Glu Val Thr Cys	Val Val Val Asp Val Ser
260		265 270
His Glu Asp Pro	Glu Val Lys Phe Asn	Trp Tyr Val Asp Gly Val
275		280 285
Glu Val His Asn	Ala Lys Thr Lys Pro	Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
290		295 300
Ser Thr Tyr Arg	Val Val Ser Val Leu	Thr Val Leu His Gln Asp
305		310 315
Trp Leu Asn Gly	Lys Glu Tyr Lys Cys	Lys Val Ser Asn Lys Ala
320		325 330
Leu Pro Ala Pro	Ile Glu Lys Thr Ile	Ser Lys Ala Lys Gly Gln
335		340 345
Pro Arg Glu Pro	Gln Val Tyr Thr Leu	Pro Pro Ser Arg Glu Glu
350		355 360
Met Thr Lys Asn	Gln Val Ser Leu Thr	Cys Leu Val Lys Gly Phe
365		370 375
Tyr Pro Ser Asp	Ile Ala Val Glu Trp	Glu Ser Asn Gly Gln Pro
380		385 390
Glu Asn Asn Tyr	Lys Thr Thr Pro Pro	Val Leu Asp Ser Asp Gly
395		400 405
Ser Phe Phe Leu	Tyr Ser Lys Leu Thr	Val Asp Lys Ser Arg Trp
410		415 420
Gln Gln Gly Asn	Val Phe Ser Cys Ser	Val Met His Glu Ala Leu
425		430 435
His Asn His Tyr	Thr Gln Lys Ser Leu	Ser Leu Ser Pro Gly Lys
440		445 450

REIVINDICACIONES

1. Obinutuzumab, para su uso en el tratamiento del cáncer en combinación con el conjugado de anticuerpo CD22-fármaco anti-CD22-MC-vc-PAB-MMAE, en el que el anticuerpo anti-CD22 en dicho conjugado de anticuerpo CD22-fármaco comprende el dominio variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 50 y el dominio variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 51.
5
2. Obinutuzumab, para su uso en el tratamiento del cáncer en combinación con el conjugado de anticuerpo CD22-fármaco anti-CD22-MC-vc-PAB-MMAE de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado por que dicho cáncer es un cáncer que expresa CD20.
10
3. Obinutuzumab, para su uso en el tratamiento del cáncer en combinación con el conjugado de anticuerpo CD22-fármaco anti-CD22-MC-vc-PAB-MMAE de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, caracterizado por que dicho cáncer que expresa CD20 es un linfoma o leucemia linfocítica.
15
4. Obinutuzumab, para su uso en el tratamiento del cáncer en combinación con el conjugado de anticuerpo CD22-fármaco anti-CD22-MC-vc-PAB-MMAE de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado por que se administran uno o más de otros agentes citotóxicos, quimioterápicos o antineoplásicos adicionales, o compuestos o radiación ionizante que potencian los efectos de dichos agentes.
20
5. Una composición para su uso en el tratamiento del cáncer que comprende obinutuzumab y el conjugado de anticuerpo CD22-fármaco anti-CD22-MC-vc-PAB-MMAE, en la que el anticuerpo anti-CD22 en dicho conjugado de anticuerpo CD22-fármaco comprende el dominio variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 50 y el dominio variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 51.
25
6. La composición para su uso en el tratamiento del cáncer de acuerdo con la reivindicación 5, caracterizada por que se administran uno o más de otros agentes citotóxicos, quimioterapéuticos o antineoplásicos adicionales, o compuestos o radiación ionizante que potencian los efectos de dichos agentes.
30

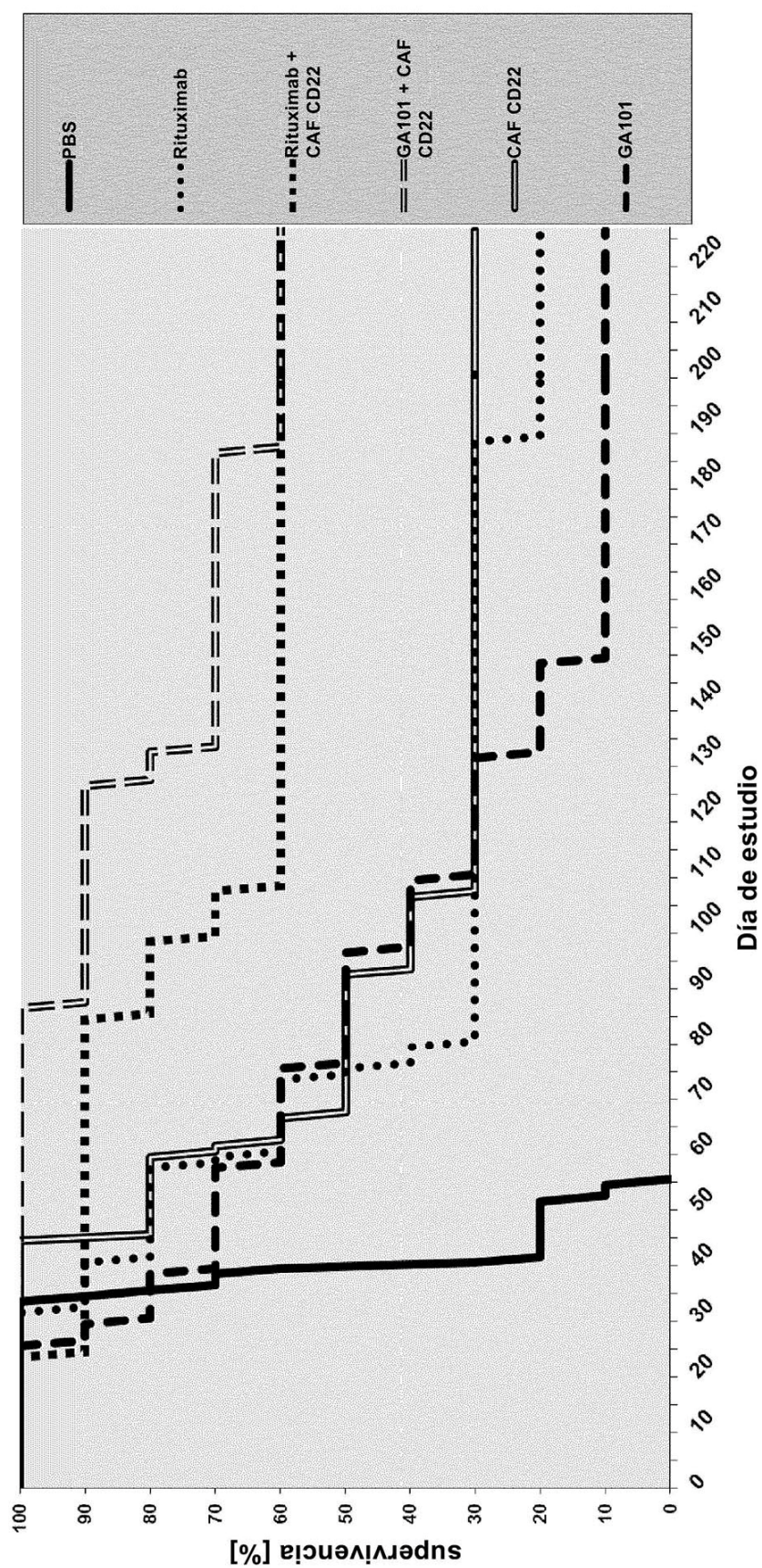


Fig. 1

Prueba del orden logarítmico por pares (nivel de prueba múltiple = 0,00333)						
Grupo	PBS	CAF CD22	GA101	GA101 + CAF CD22	Rituximab	Rituximab + CAF CD22
PBS	1,0000	<0,0001*	0,0084*	<0,0001*	0,0004*	0,0001*
CAF CD22	<0,0001*	1,0000	0,5022	0,0601	0,6193	0,1355
GA101	0,0084*	0,5022	1,0000	0,0041*	0,6962	0,0322*
GA101 + CAF CD22	<0,0001*	0,0601	0,0041*	1,0000	0,0198*	0,7848
Rituximab	0,0004*	0,6193	0,6962	0,0198*	1,0000	0,0435*
Rituximab + CAF CD22	0,0001*	0,1355	0,0322*	0,7848	0,0435*	1,0000

Prueba de Wilcoxon por pares (nivel de prueba múltiple = 0,00333)						
Grupo	PBS	CAF CD22	GA101	GA101 + CAF CD22	Rituximab	Rituximab + CAF CD22
PBS	1,0000	0,0001*	0,0667	<0,0001*	0,0026*	0,0011*
CAF CD22	0,0001*	1,0000	0,5711	0,0278*	0,6226	0,1285
GA101	0,0667	0,5711	1,0000	0,0038*	0,7634	0,0615
GA101 + CAF CD22	<0,0001*	0,0278*	0,0038*	1,0000	0,0096*	0,6085
Rituximab	0,0026*	0,6226	0,7634	0,0096*	1,0000	0,0465*
Rituximab + CAF CD22	0,0011*	0,1285	0,0615	0,6085	0,0465*	1,0000

Fig. 2

Alineación de secuencias de dominio variable
de la cadena pesada de variantes de 10F4 anti-CD22

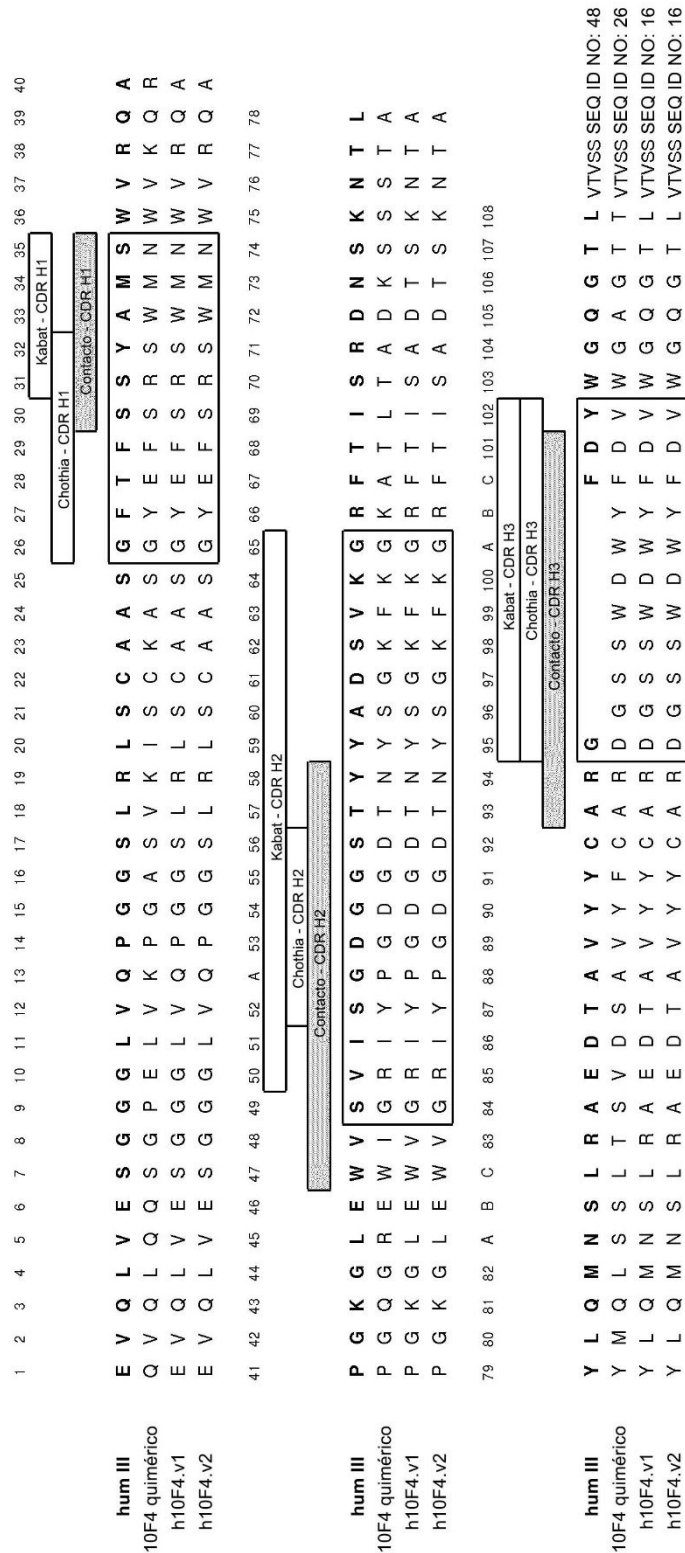


Figura 3A

huK1 OF4 quimérico h10F4.v1 h10F4.v2	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	C	R	A	S	Q	S	I	S	N	Y	L	A	W	Y	Q										
	D	I	L	M	T	Q	T	P	L	S	L	P	V	S	L	G	D	Q	A	S	I	S	C	R	S	S	Q	S	I	V	H	S	N	G	N	T	F	L	E	W	Y	L				
	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	S	S	Q	S	I	V	H	S	N	G	N	T	F	L	E	W	Y	Q				
	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	S	S	Q	S	I	V	H	S	V	G	N	T	F	L	E	W	Y	Q				
38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80																																														
huK1 OF4 quimérico h10F4.v1 h10F4.v2	Q	K	P	G	K	A	P	K	L	L	I	Y	A	A	S	S	L	E	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P			
	Q	K	P	G	Q	S	P	K	L	L	I	Y	K	V	S	N	R	F	S	G	V	P	D	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	K	I	S	R	V	E	A			
	Q	K	P	G	K	A	P	K	L	L	I	Y	K	V	S	N	R	F	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P			
	Q	K	P	G	K	A	P	K	L	L	I	Y	K	V	S	N	R	F	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P			
81 82 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 96 97 98 99																																														
huK1 OF4 quimérico h10F4.v1 h10F4.v2	E	D	F	A	T	Y	Y	C	Q	Q	Y	N	S	L	P	W	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	S	E	Q	I	D	N	O	:	49										
	E	D	L	G	V	Y	Y	C	F	Q	G	S	Q	F	P	Y	T	F	G	G	G	T	K	V	E	I	K	S	E	Q	I	D	N	O	:	27										
	E	D	F	A	T	Y	Y	C	F	Q	G	S	Q	F	P	Y	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	S	E	Q	I	D	N	O	:	17										
	E	D	F	A	T	Y	Y	C	F	Q	G	S	Q	F	P	Y	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	S	E	Q	I	D	N	O	:	18										

Figura 3B

Cadena ligera de h10F4v2 anti-CD22

DIQMTQSPSSLSASVGDRTTITCRSSQSIHVSNGNTFLEWYQQKPGKAP
 KLLIKVSNRFGVPSRFGSGGTDFTLTISSLQPEDFATYYCFQGSQF
 PYTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCCLNNFYPRE
AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYLSSTLTLSKADYEKHK
VYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 50)

Cadena pesada de h10F4v2 anti-CD22

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYEFSSWMNWVRQAPGKGLEWVGRIYPGDGTNYSGKFKGRFTISADTSKNTAYL
 QMNSLRAEDTAVYYCARDGSSWDWYFDVWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWN
SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCTPCPAPELLGGPSVFLFPP
KPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK
ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT
VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 51)

Figura 4