

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 744 275**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

C07K 16/30 (2006.01)

A61K 39/39 (2006.01)

A61P 37/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.10.2003 E 17179855 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.06.2019 EP 3284753**

54 Título: **Anticuerpos monoclonales humanos contra CD20 para su uso en el tratamiento de esclerosis múltiple**

30 Prioridad:

17.10.2002 US 419163 P

02.04.2003 US 460028 P

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

24.02.2020

73 Titular/es:

GENMAB A/S (100.0%)

Kalvebod Brygge 43

1560 Copenhagen V, DK

72 Inventor/es:

TEELING, JESSICA;

RUULS, SIGRID;

GLENNIE, MARTIN;

VAN DE WINKEL, JAN G J;

PARREN, PAUL;

PETERSEN, JORGEN;

BAADSGAARD, OLE D M SC. y

HUANG, HAICHUN

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 744 275 T3

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

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos monoclonales humanos contra CD20 para su uso en el tratamiento de esclerosis múltiple

5 **Antecedentes de la invención**

La molécula CD20 (también llamado antígeno de diferenciación restringido a linfocitos B humanos o Bp35) es una proteína transmembrana hidrófoba con un peso molecular de aproximadamente 35 kD localizada en linfocitos B maduros y pre linfocitos B (Valentine *et al.* (1989) J. Biol. Chem. 264(19): 11282-11287; y Einfield *et al.* (1988) EMBO J. 7(3): 711 -717). CD20 se encuentra en la superficie de más del 90 % de linfocitos B de sangre periférica u órganos linfoides y se expresa durante el desarrollo de prelinfocitos B temprano y permanece hasta la diferenciación de células plasmáticas. CD20 está presente tanto en linfocitos B normales como en linfocitos B malignos. En particular, CD20 se expresa en más del 90 % de linfomas no de Hodgkin de linfocitos B (NHL) (Anderson *et al.* (1984) Blood 63(6): 1424-1433), pero no se encuentra en células madre hematopoyéticas, prolinfocitos B, células plasmáticas normales u otros tejidos normales (Tedder *et al.* (1985) J. Immunol. 135(2): 973-979).

La región carboxilo terminal de 85 aminoácidos de la proteína CD20 se localiza dentro del citoplasma. La longitud de esta región contrasta con la de otras estructuras de superficie específicas de linfocitos B tales como cadenas pesadas de IgM, IgD e IgG o cadenas α o β de antígenos de histocompatibilidad de clase II, que tienen regiones intracitoplásmicas relativamente cortas de 3, 3, 28, 15 y 16 aminoácidos, respectivamente (Komaromy *et al.* (1983) NAR 11: 6775-6785). De los últimos 61 aminoácidos carboxilo terminales, 21 son restos ácidos, mientras que solamente 2 son básicos, lo que indica que esta región tiene una fuerte carga neta negativa. El N° de Acceso de GenBank es NP_690605.

Se cree que CD20 podría estar implicada en la regulación de una etapa o etapas tempranas en el proceso de activación y diferenciación de linfocitos B (Tedder *et al.* (1986) Eur. J. Immunol. 16: 881-887) y podría actuar como un canal iónico de calcio (Tedder *et al.* (1990) J. Cell. Biochem. 14D: 195).

A pesar de la incertidumbre acerca de la función real de CD20 en la promoción de la proliferación y/o diferenciación de linfocitos B, esta proporciona una importante diana para terapia mediada por anticuerpos para controlar o destruir linfocitos B implicados en cánceres y trastornos autoinmunes. En particular, la expresión de CD20 en células tumorales, por ejemplo, NHL, la hace una diana importante para terapia mediada por anticuerpos para dirigir específicamente agentes terapéuticos contra células neoplásicas positivas para CD20. Sin embargo, aunque los resultados obtenidos hasta la fecha claramente establecen CD20 como una diana útil para inmunoterapia, también muestran que los anticuerpos murinos y quiméricos disponibles en la actualidad no constituyen agentes terapéuticos ideales.

El documento WO 02/22212 desvela el uso de un anticuerpo anti-CD20 en el tratamiento de esclerosis múltiple.

En consecuencia, existe la necesidad de anticuerpos terapéuticos mejorados contra CD20 que sean eficaces en la prevención y/o tratamiento de una serie de enfermedades que implican células que expresan CD20.

Sumario de la invención

La invención se define en las reivindicaciones adjuntas. La presente invención usa agentes terapéuticos de anticuerpos mejorados para tratar y/o prevenir la esclerosis múltiple. Los anticuerpos usados en la invención están mejorados porque son completamente humanos, y, por lo tanto, son potencialmente menos inmunogénicos en pacientes.

Como se ejemplifica en este documento, los anticuerpos humanos de la divulgación median en la destrucción de linfocitos B que expresan CD20 por una diversidad de mecanismos. En una realización, los anticuerpos humanos de la divulgación inducen citotoxicidad dependiente de complemento (CDC), por ejemplo, al menos 20 % de lisis mediada por CDC, preferiblemente aproximadamente 30 % de lisis mediada por CDC, y más preferiblemente 40-50 % de lisis mediada en células, tales como células de leucemia linfocítica B crónica (B-CLL). En otra realización, los anticuerpos humanos de la divulgación inducen apoptosis de células que expresan CD20. En otra realización, los anticuerpos humanos de la divulgación inducen adhesión homotípica de células que expresan CD20. Además, los anticuerpos humanos de la divulgación pueden inducir citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC) de células que expresan CD20 en presencia de células efectoras humanas (por ejemplo, monocitos, células mononucleares, linfocitos NK y PMN). Además, los anticuerpos humanos de la divulgación pueden inducir fagocitosis de células que expresan CD20 en presencia de macrófagos. Los anticuerpos monoclonales humanos de la divulgación pueden actuar por uno o más de estos mecanismos. Los ejemplos de células que pueden destruirse por anticuerpos humanos de la presente invención incluyen, pero sin limitación, linfocitos B que expresan CD20, tales como linfocitos B tumorigénicos y linfocitos B implicados en enfermedades inmunes. En una realización particular, los anticuerpos humanos se usan para mediar en la destrucción de linfocitos B en el tratamiento de linfoma, por ejemplo, linfoma no de Hodgkin de linfocitos B.

Los anticuerpos humanos de la divulgación incluyen anticuerpos IgG1 (por ejemplo, IgG1, κ), IgG3 (por ejemplo, IgG3, κ) e IgG4 (por ejemplo, IgG4, κ). Sin embargo, otros isotipos de anticuerpo están abarcados por la divulgación, incluyendo IgG2, IgM, IgA1, IgA2, IgA secretora, IgD e IgE. Los anticuerpos pueden ser anticuerpos completos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que incluyen, por ejemplo, fragmentos Fab, F(ab')₂, Fv, Fv de cadena sencilla o anticuerpos biespecíficos. Además, los fragmentos de unión a antígeno incluyen proteínas de fusión de inmunoglobulina de dominio de unión que comprenden (i) un polipéptido de dominio de unión (tal como una región variable de cadena pesada o una región variable de cadena ligera) que se fusiona con un polipéptido de región bisagra de inmunoglobulina, (ii) una región constante CH2 de cadena pesada de inmunoglobulina fusionada con la región bisagra, y (iii) una región constante CH3 de cadena pesada de inmunoglobulina fusionada con la región constante CH2. Tales proteínas de fusión de inmunoglobulina de dominio de unión se describen adicionalmente en los documentos US 2003/0118592 y US 2003/0133939.

Los anticuerpos humanos particulares de la presente divulgación incluyen los denominados 11B8, 2F2 y 7D8, codificados por ácidos nucleicos de cadena pesada humana y cadena ligera kappa humana que comprenden secuencias de nucleótidos en sus regiones variables como se expone en SEQ ID N°: 1, 5 o 9 y SEQ ID N°: 3, 7 u 11, respectivamente y modificaciones conservativas de secuencia de las mismas. En otra realización, los anticuerpos humanos se caracterizan por tener regiones variables de cadena pesada humana y cadena ligera kappa humana que comprenden las secuencias de aminoácidos que se exponen en SEQ ID N°: 2, 6 o 10 y SEQ ID N°: 4, 8 o 12, respectivamente y modificaciones conservativas de secuencia de las mismas.

En otra realización más, los anticuerpos humanos se caracterizan por tener regiones variables de cadena ligera kappa humana y cadena pesada humana que son al menos 90 % homólogas, preferiblemente al menos 95 % homólogas y más preferiblemente al menos 98 % o al menos 99 % homólogas de las secuencias de aminoácidos expuestas en SEQ ID N°: 2 y SEQ ID N°: 4, respectivamente; SEQ ID N°: 6 y SEQ ID N°: 8, respectivamente, o SEQ ID NO: 10 y SEQ ID NO: 12, respectivamente.

Otros anticuerpos humanos particulares de la invención incluyen aquellos que comprenden un dominio CDR que tiene una región de CDR1 de cadena ligera y cadena pesada humana, una región de CDR2 de cadena pesada y cadena ligera humana, y una región de CDR3 de cadena pesada y cadena ligera humana, en donde

(a) las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena humana pesada comprenden una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las secuencias de aminoácidos CDR1, CDR2 y CDR3 mostradas en las Figuras 53, 55 o 57 (SEQ ID NO:13-15, 19-21 y 25-27) y las modificaciones conservativas de secuencia de las mismas, y

(b) las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena ligera humana comprenden una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las secuencias de aminoácidos CDR1, CDR2 y CDR3 mostradas en las Figuras 53, 55 o 57 (SEQ ID NO: 16-18, 22-24 y 28-30) y las modificaciones conservativas de secuencia de las mismas.

También se incluyen dentro de la presente divulgación anticuerpos que se disocian de CD20 con una constante de disociación en equilibrio (K_D) de aproximadamente 1 -10 nM o menos. Tales anticuerpos también incluyen los que no reaccionan de forma cruzada con antígenos de superficie celular relacionados y por lo tanto no inhiben su función.

En otra realización, los anticuerpos anti-CD20 humano de la presente divulgación pueden caracterizarse por una o más de las siguientes propiedades:

- a) especificidad para CD20 humano;
- b) una afinidad de unión con CD20 (K_D) de aproximadamente 10 nM o menos, preferiblemente, aproximadamente 5 nM o menos y, más preferiblemente, aproximadamente 1-3 nM o menos como se determina por el experimento de unión descrito en el Ejemplo 5 (Figura 9) en este documento;
- c) una constante de tasa de disociación (k_d) de CD20 de aproximadamente 10^{-4} s⁻¹ o menos, preferiblemente, aproximadamente 10^{-5} s⁻¹ o menos y, más preferiblemente, aproximadamente 10^{-6} s⁻¹ o menos, como se determina por el experimento de tasa de disociación descrito en el Ejemplo 5 (Figura 9) en este documento;
- d) la capacidad para mediar en un nivel alto de CDC en células positivas para CD55/59 o negativas para CD55/59;
- e) la capacidad para traslocar a balsas lipídicas tras la unión a CD20;
- f) la capacidad para inhibir el crecimiento de células que expresan CD20;
- g) la capacidad para inducir apoptosis de células que expresan CD20;
- h) la capacidad para inducir adhesión homotípica de células que expresan CD20;
- i) la capacidad para inducir ADCC de células que expresan CD20 en presencia de células efectoras;
- j) la capacidad para prolongar la supervivencia de un sujeto que tenga células tumorales que expresan CD20;
- k) la capacidad para reducir el número de células que expresan CD20; y/o
- l) la capacidad para reducir el número de células que expresan bajos niveles de CD20 (células CD20^{bajo}).

Los anticuerpos anti-CD20 humano de la presente divulgación pueden derivatizarse, ligarse o coexpresarse con otras especificidades de unión. En una realización particular, la divulgación proporciona una molécula biespecífica o

multiespecífica que comprende al menos una primera especificidad de unión para CD20 (por ejemplo, un anticuerpo anti-CD20 humano o mimético del mismo) y una segunda especificidad de unión para una célula efectora humana, tal como una especificidad de unión para un receptor de Fc (por ejemplo, un receptor de Fc γ , tal como Fc γ RI, o un receptor de Fc α humano) o un receptor de linfocitos T, por ejemplo, CD3.

5 En consecuencia, la presente divulgación incluye moléculas biespecíficas y multiespecíficas que se unen tanto a CD20 humano como a un receptor de Fc o un receptor de linfocitos T, por ejemplo, CD3. Los ejemplos de receptores de Fc son, por ejemplo, un receptor de IgG humano, por ejemplo, un receptor de Fc-gamma (Fc γ R), tal como Fc γ RI (CD64), Fc γ RI I (CD32) y Fc γ RIII (CD16). Otros receptores de Fc, tales como receptores de IgA humanos (por ejemplo, Fc α RI), también pueden marcarse como dianas. El receptor de Fc se localiza preferiblemente en la superficie de una célula efectora, por ejemplo, un monocito, macrófago o una célula mononuclear activada. En una realización preferida, las moléculas biespecíficas y multiespecíficas se unen a un receptor de Fc en un sitio que es distinto del sitio de unión de Fc de inmunoglobulina (por ejemplo, IgG o IgA) del receptor. Por lo tanto, la unión de las moléculas biespecíficas y multiespecíficas no se bloquea por niveles fisiológicos de inmunoglobulinas.

10 En otro aspecto más, se derivatizan anticuerpos anti-CD20 humano de la divulgación, se ligan a o coexpresan con otra molécula funcional, por ejemplo, otro péptido o proteína (por ejemplo, un fragmento Fab'). Por ejemplo, un anticuerpo de la divulgación puede ligarse funcionalmente (por ejemplo, por acoplamiento químico, fusión genética, asociación no covalente o de otro modo) con una o más entidades moleculares distintas tales como otro anticuerpo (por ejemplo, para producir un anticuerpo biespecífico o multiespecífico), una citotoxina, ligando celular o antígeno (por ejemplo, para producir un inmunconjugado, tal como una inmunotoxina). Un anticuerpo de la presente divulgación puede ligarse a otros restos terapéuticos, por ejemplo, un radioisótopo, una molécula pequeña farmacológica antineoplásica, un agente antiinflamatorio o un agente inmunosupresor. En consecuencia, la presente descripción abarca una gran diversidad de conjugados de anticuerpo, moléculas biespecíficas o multiespecíficas y proteínas de fusión, todas las cuales se unen a células que expresan CD20 y que pueden usarse para dirigir otras moléculas a tales células.

15 En otro aspecto más, la divulgación proporciona composiciones, por ejemplo, composiciones/kits farmacéuticos y de diagnóstico, que comprenden un vehículo farmacéuticamente aceptable formulado junto con uno o una combinación de anticuerpos monoclonales humanos de la divulgación. En una realización particular, la composición incluye una combinación de anticuerpos que se unen a distintos epítomos o que poseen distintas características funcionales, tales como inducción de CDC e inducción de apoptosis.

20 Los anticuerpos humanos, inmunconjugados, moléculas biespecíficas y multiespecíficas y composiciones de la presente divulgación pueden usarse en una diversidad de métodos para inhibir el crecimiento de células que expresan CD20 y/o destruyen células que expresan CD20 poniendo en contacto las células con una cantidad eficaz del anticuerpo, inmunconjugado, molécula o composición biespecífica/multiespecífica, de modo que el crecimiento de la célula se inhibe y/o la célula se destruye. En una realización, el método incluye destruir la célula que expresa CD20 en presencia de células afectoras, por ejemplo, por CDC, apoptosis, ADCC, fagocitosis, o por una combinación de dos o más de estos mecanismos. Las células se destruyen preferiblemente o se inhiben sin destrucción o inhibición de la actividad de células que no expresan CD20 pero que pueden, por ejemplo, expresar un antígeno de superficie celular relacionado estructuralmente (es decir, sin reactividad cruzada con antígenos de superficie celular relacionados pero funcionalmente distintos). Las células que expresan CD20 que pueden inhibirse o destruirse usando los anticuerpos humanos de la divulgación incluyen, por ejemplo, linfocitos B tumorigénicos.

25 En consecuencia, pueden usarse anticuerpos humanos de la presente divulgación para tratar y/o prevenir una diversidad de enfermedades que implican células que expresan CD20 administrando los anticuerpos a pacientes que padecen tales enfermedades. Las enfermedades ejemplares que pueden tratarse (por ejemplo, aliviarse) o prevenirse incluyen, pero sin limitación, enfermedades tumorigénicas y enfermedades inmunes, por ejemplo, enfermedades autoinmunes. Los ejemplos de enfermedades tumorigénicas que pueden tratarse y/o prevenirse incluyen linfoma de linfocitos B, por ejemplo, NHL, incluyendo linfoma/leucemia linfoblástica de linfocitos B precursores y neoplasias de linfocitos B maduros, tales como leucemia linfocítica crónica de linfocitos B (CLL)/linfoma linfocítica pequeña (SLL), leucemia prolinfocítica de linfocitos B, linfoma linfoplasmácítico, linfoma de células de manto (MCL), linfoma folicular (FL), incluyendo FL de grado alto, grado intermedio y grado bajo, linfoma de centro folicular cutáneo, linfoma de linfocitos B de zona marginal (tipo MALT, nodal y tipo esplénico), tricoleucemia, linfoma de linfocitos B grandes difuso, linfoma de Burkitt, plasmacitoma, mieloma de células plasmáticas, trastorno linfoproliferativo postrasplante, macroglobulinemia de Waldenström y linfoma de células grandes anaplásico (ALCL). Los ejemplos de trastornos inmunes en los que están implicados linfocitos B que expresan CD20 que pueden tratarse y/o prevenirse incluyen psoriasis, artritis psoriásica, dermatitis, esclerodermia sistémica y esclerosis, enfermedad inflamatoria del intestino (IBD), enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, síndrome de dificultad respiratoria, meningitis, encefalitis, uveítis, glomerulonefritis, eccema, asma, aterosclerosis, deficiencia de adhesión de leucocitos, síndrome de Raynaud, síndrome de Sjögren, diabetes de aparición juvenil, enfermedad de Reiter, enfermedad de Behçet, nefritis de complejos inmunes, nefropatía de IgA, polineuropatías de IgM, trombocitopenias mediadas por sistema inmune, tales como púrpura trombocitopénica idiopática y púrpura trombocitopénica idiopática crónica, anemia hemolítica, miastenia grave, nefritis lúpica, lupus eritematoso sistémico,

artritis reumatoide (RA), dermatitis atópica, pénfigo, enfermedad de Graves, tiroiditis de Hashimoto, granulomatosis de Wegener, síndrome de Omenn, insuficiencia renal crónica, mononucleosis infecciosa aguda, VIH y enfermedades asociadas con virus del herpes. Son ejemplos adicionales síndrome de dificultad respiratoria aguda grave y coriorretinitis. Son más ejemplos adicionales enfermedades y trastornos causados por infección de linfocitos B con virus, tales como virus de Epstein-Barr (VEB).

La invención se refiere a un tratamiento de esclerosis múltiple que usa un anticuerpo anti-CD20 tal como se desvela.

En una realización particular de la divulgación, el sujeto al que se administra el anticuerpo se trata adicionalmente con un agente quimioterapéutico, radiación o un agente que modula, por ejemplo, potencia o inhibe, la expresión o actividad de un receptor de Fc, por ejemplo, un receptor de Fc α o un receptor de Fc γ , tal como una citocina. Las citocinas típicas para administración durante el tratamiento incluyen factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), factor estimulante de colonias de macrófagos y granulocitos (GM-CSF), interferón- γ (IFN- γ) y factor de necrosis tumoral (TNF). Los agentes terapéuticos típicos incluyen, entre otros, agentes antineoplásicos tales como doxorubicina, cisplatino, bleomicina, carmustina, clorambucilo y ciclofosfamida.

En otro aspecto más, la presente divulgación proporciona un método para detectar *in vitro* o *in vivo* la presencia de CD20 en una muestra o individuo, por ejemplo, para diagnosticar una enfermedad relacionada con CD20, preferiblemente en una etapa temprana. Esto también puede ser útil para controlar la enfermedad y efecto de tratamiento y para determinar y ajustar la dosis del anticuerpo para administrar. El método *in vivo* puede realizarse usando técnica de formación de imágenes tal como PET (tomografía de emisión de positrones) o SPECT (tomografía informatizada de emisión de fotón sencillo). En una realización, esto se consigue poniendo en contacto una muestra a ensayar, opcionalmente junto con una muestra de control, con un anticuerpo monoclonal humano de la divulgación en condiciones que permitan la formación de un complejo entre el anticuerpo y CD20. La formación de complejo se detecta después (por ejemplo, usando un análisis de FACS o transferencia de Western). Cuando se usa una muestra de control junto con la muestra de ensayo, se detecta el complejo en ambas muestras y cualquier diferencia estadísticamente significativa en la formación de complejos entre las muestras es indicativa de la presencia de CD20 en la muestra de ensayo.

En otro aspecto más, la divulgación proporciona un animal transgénico no humano, tal como un ratón transgénico, que expresa anticuerpos monoclonales humanos que se unen a CD20. En una realización particular, el animal no humano transgénico es un ratón transgénico que tiene un genoma que comprende un transgén de cadena pesada humana y un transgén de cadena ligera humana que codifica todo o una parte de un anticuerpo de la divulgación. El animal no humano transgénico puede inmunizarse con una preparación purificada o enriquecida de antígeno CD20 y/o células que expresan CD20. Preferiblemente, el animal no humano transgénico, por ejemplo, el ratón transgénico, es capaz de producir múltiples isotipos de anticuerpos monoclonales humanos para CD20 (por ejemplo, IgG, IgA y/o IgM) experimentando recombinación V-D-J y conmutación de isotipo. Los cambios de isotipo pueden producirse, por ejemplo, por conmutación de isotipo clásico o no clásico.

En consecuencia, en otro aspecto más, la divulgación proporciona linfocitos B aislados a partir de un animal no humano transgénico como se ha descrito anteriormente, por ejemplo, un ratón transgénico, que expresa anticuerpos anti-CD20 humano. Los linfocitos B aislados pueden después immortalizarse por fusión con una célula immortalizada para proporcionar una fuente (por ejemplo, un hibridoma) de anticuerpos anti-CD20 humano. Tales hibridomas (es decir, que producen anticuerpos anti-CD20 humano) también se incluyen dentro del alcance de la divulgación.

Como se ejemplifica en este documento, los anticuerpos humanos de la divulgación pueden obtenerse directamente a partir de hibridomas que expresan el anticuerpo, o pueden clonarse y expresarse de forma recombinante en una célula hospedadora (por ejemplo, una célula CHO, una célula NS/0 o una célula linfocítica). Son ejemplos adicionales de células hospedadoras microorganismos, tales como *E. coli*, y hongos, tales como levadura. Como alternativa, pueden producirse de forma recombinante en un animal no humano o planta transgénica. En consecuencia, en otro aspecto, la presente divulgación proporciona métodos para producir anticuerpos monoclonales humanos que se unen a CD20 humano. En una realización, el método incluye inmunizar un animal transgénico no humano, por ejemplo, un ratón transgénico, como se ha descrito previamente (por ejemplo, que tenga un genoma que comprende un transgén de cadena pesada humano y un transgén de cadena ligera humano que codifica todo o una parte de un anticuerpo anti-CD20), con una preparación purificada o enriquecida de antígeno CD20 humano y/o células que expresan CD20 humano. Los linfocitos B (por ejemplo, linfocitos B esplénicos) del animal se obtienen después y se fusionan con células de mieloma para formar células inmortales de hibridoma que secretan anticuerpos monoclonales humanos contra CD20.

En otro aspecto más, la divulgación proporciona moléculas de ácido nucleico que codifican anticuerpos anti-CD20 humano (por ejemplo, regiones variables de los mismos), así como vectores de expresión recombinante que incluyen los ácidos nucleicos de la divulgación, y células hospedadoras transfectadas con tales vectores. Los métodos para producir los anticuerpos cultivando estas células hospedadoras también se abarcan por la divulgación. Los ácidos nucleicos particulares proporcionados por la divulgación comprenden las secuencias de nucleótidos mostradas en SEQ ID N°: 1, 5 o 9 y SEQ ID N°: 3, 7 u 11, que codifican las cadenas pesadas y ligeras, respectivamente, de anticuerpos anti-CD20 humano 2F2 y 7D8 y 11B8.

Otras características y ventajas de la presente invención resultarán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada y reivindicaciones.

5 Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra el vector pesado variable/pCON γ lf usado para producción recombinante de los anticuerpos monoclonales humanos 2F2 y 11B8.

La Figura 2 muestra el vector ligero variable/pCON κ usado para producción recombinante de 2F2 y 11B8.

10 La Figura 3 muestra el vector de clonación de doble gen (pCON γ 1f/ κ 2F2) usado para producción recombinante de 2F2 y 11B8.

La Figura 4 es un gráfico que compara la unión de anticuerpos monoclonales humanos 2F2, 7D8 y 11B8 con células NS/0 transfectadas con Raji, Daudi y CD20 y células NS/0 parentales usando citometría de flujo.

15 Las Figuras 5A y 5B muestran la unión de 2F2 con PBMC a partir de tres donantes humanos usando citometría de flujo.

La Figura 6 es un gráfico que compara la afinidad de unión de 2F2 marcado con 125 I y 11B8 marcado con 125 I con células Ramos EHRB.

20 Las Figuras 7A y 7B muestran la unión de 2F2 marcado con 125 I y 11B8 marcado con 125 I en comparación con rituximab marcado con 125 I (anticuerpo anti-CD20 quimérico, IDEC) y B1 marcado con 125 I (el término B1 corresponde a la forma no marcada de BexxarTM, que es un anticuerpo anti-CD20 humano murino marcado con 131 I, Coulter) con células Ramos-EHRB (A) y células Daudi (B).

La Figura 8 es un gráfico que compara las tasas de disociación de 11B8T marcado con 125 I, 2F2 marcado con 125 I, rituximab marcado con 125 I (RIT) y B1 marcado con 125 I.

25 La Figura 9 muestra las tasas de disociación de los fragmentos F(ab')₂ de 2F2, 11B8T y rituximab en células Ramos-EHRB.

Las Figuras 10A y 10B muestran la CDC por 2F2T, 11B8T, 7D8, rituximab y un anticuerpo de control de isotipo (HuMab-KLH) de células Daudi (A) y células SU-DHL-4 (B) en diferentes puntos temporales (tasa de disociación funcional) usando citometría de flujo.

30 Las Figuras 11A-E muestran la cinética de CDC inducida por 2F2 y rituximab en diferentes líneas celulares usando citometría de flujo.

Las Figuras 12A-D muestra CDC inducida por 2F2 y rituximab en diferentes líneas celulares en función de la concentración de complemento (suero humano normal (NHS)) a dos concentraciones de anticuerpo diferentes usando citometría de flujo.

35 Las Figuras 13A-D muestran inducción dependiente de concentración de CDC por 2F2 y rituximab en diferentes líneas celulares usando citometría de flujo.

Las Figuras 14A y 14B muestran inducción de CDC dependiente de concentración por 2F2, 2F2T, 11B8T, B1 y rituximab en células Daudi (A) y células Raji (B).

40 Las Figuras 15A y 15B son gráficos que comparan CDC de células Daudi (células que expresan niveles bajos de CD55/59) por anticuerpos monoclonales humanos 2F2, 7D8 y 11B8 y rituximab; (A) muestra el porcentaje de lisis de células no lavadas y (B) muestra el porcentaje de lisis de células que se lavaron antes de la adición de suero.

Las Figuras 16A y 16B son gráficos que comparan CDC de células Raji (células que expresan altos niveles de CD55/59) por anticuerpos monoclonales humanos 2F2, 7D8 y 11B8 y rituximab; (A) muestra el porcentaje de lisis de células no bloqueadas con anticuerpos anti-CD55 y anti-CD59 y (B) muestra el porcentaje de lisis con células bloqueadas con anticuerpos anti-CD55 y anti-CD59.

45 Las Figuras 17A-C muestran el papel de CD55 y CD59 en CDC inducida por 2F2 y rituximab en células Raji. (A) muestra el porcentaje de células lisadas tras la adición de anticuerpo anti-CD55, (B) muestra el porcentaje de células lisadas tras adición de anticuerpo anti-CD59, y (C) muestra el porcentaje de células lisadas tras la adición tanto de anticuerpo anti-CD55 como de anticuerpo anti-CD59.

50 Las Figuras 18A-D muestran la unión de factor de complemento C1q por 2F2 y rituximab en diferentes líneas celulares como se determinó por citometría de flujo.

Las Figuras 19A-D muestran la deposición de fragmento de factor de complemento C4c por 2F2 y rituximab en diferentes líneas celulares como se determinó por citometría de flujo.

La Figura 20 muestra lisis de células ARH-77 por 2F2, rituximab y 11B8T en presencia de PMN, MNC, plasma o sangre completa.

55 La Figura 21 muestra lisis de células B-CLL por 2F2, rituximab y 11B8T en presencia de PMN, MNC, plasma o sangre completa.

La Figura 22 muestra lisis de células HCL (tricoleucemia) por 2F2, rituximab y 11B8T en presencia de PMN, MNC, plasma o sangre completa.

60 La Figura 23 muestra lisis de células B-ALL por 2F2 y rituximab, en presencia de PMN, MNC, plasma o sangre completa.

La Figura 24 muestra lisis de células de linfoma folicular (FL) por 2F2, rituximab y 11B8T en presencia de PMN, MNC, plasma o sangre completa.

La Figura 25 muestra lisis de células de linfoma de células de manto por 2F2, rituximab y 11B8T en presencia de PMN, MNC, plasma o sangre completa.

65 La Figura 26 muestra lisis dependiente de concentración de células ARH-77 por 2F2 y rituximab en presencia de sangre completa.

- La Figura 27 muestra lisis mediada por MNC de células ARH-77 por 2F2T, 11B8T y rituximab.
- La Figura 28 muestra lisis mediada por MNC de células Raji por 2F2T, 11B8T y rituximab.
- Las Figuras 29A, B, y C son gráficos que muestran el agrupamiento de CD20 en las balsas lipídicas tras incubación con 2F2, 7D8, o 11B8 usando análisis de FRET y ensayo de insolubilidad de Triton-X.
- 5 La Figura 30 muestra agrupamiento de CD20 en las balsas lipídicas tras incubación con 2F2, rituximab u 11B8T usando análisis de FRET.
- La Figura 31 muestra la proporción de CD20 que permanece en la fracción de balsa insoluble tras tratamiento con Triton X-100 (TX) e incubación con 2F2, rituximab, u 11B8T.
- La Figura 32 muestra la distribución de CD20 entre las fracciones de membrana de balsa y no de balsa tras estimular células Daudi con 2F2, rituximab, u 11B8T.
- 10 Las Figuras 33A-G muestran apoptosis de células Daudi por 2F2, 7D8 y 11B8 usando citometría de flujo.
- La Figura 34 muestra inducción de apoptosis de células Raji por 2F2, 11B8T, rituximab o B1 usando citometría de flujo.
- La Figura 35A muestra inducción de apoptosis de células Daudi por 2F2T, 11B8T, rituximab o B1 usando citometría de flujo.
- 15 La Figura 35B muestra apoptosis de etapa temprana y etapa tardía de células Daudi por anticuerpos monoclonales humanos 2F2T, 11B8T, rituximab y B1 usando citometría de flujo.
- Las Figuras 36A-E muestran adhesión homotípica de células Ramos-EHRB por 2F2, 7D8 y 11B8 usando microscopía óptica.
- 20 La Figura 37 muestra adhesión homotípica de células Daudi por 2F2, rituximab y B1 usando microscopía óptica.
- La Figura 38 es un gráfico que muestra el porcentaje de supervivencia de ratones SCID a los que se inyectaron células Daudi y que se trataron con 2F2 o 7D8.
- La Figura 39 muestra el porcentaje de supervivencia de ratones SCID a los que se inyectaron células Tanoue y que se trataron con 2F2, rituximab o B1.
- 25 La Figura 40 muestra el porcentaje de supervivencia de ratones SCID a los que se inyectaron células Daudi y que se trataron con diferentes concentraciones de 2F2 o rituximab.
- La Figura 41 muestra el porcentaje de supervivencia de ratones SCID a los que se inyectaron células Daudi y que se trataron con 11B8T o B1.
- La Figura 42 muestra formación de imágenes por bioluminiscencia de células tumorales en ratones SCID el día 39 (31 días después del tratamiento con 10 µg de B1, rituximab, 11B8T, 2F2T, o hulGI). La bioluminiscencia se representa en color rojo (las áreas oscuras en los ratones) (intensidad de luz > 50 fotones durante 5 minutos) con una superposición sobre la imagen del cuerpo en blanco y negro de los ratones.
- 30 La Figura 43 muestra la masa del tumor en cada ratón cuantificada el día 25, 32, 39 y 46 después de la administración, el día 8, de 10 µg de B1, rituximab, 11B8T, 2F2T o hulGI integrando las señales luminosas sobre la superficie del cuerpo.
- Las Figuras 44A-C muestran análisis de citometría de flujo de células CD20+ en sangre periférica de monos cynomolgus después de administración intravenosa de 2F2 o rituximab a diferentes dosificaciones, 4 x 1,25 mg/kg (A), 4 x 6,25 mg/kg (B), o 4 x 12,50 mg/kg(C).
- 40 Las Figuras 45A-C muestran análisis de citometría de flujo de células CD21+ en sangre periférica de monos cynomolgus después de administración intravenosa de 2F2 o rituximab a diferentes dosificaciones, 4 x 1,25 mg/kg (A), 4 x 6,25 mg/kg (B), o 4 x 12,50 mg/kg (C).
- Las Figuras 46A-C muestran análisis de citometría de flujo de células CD20+ en ganglio linfático de monos cynomolgus después de administración intravenosa de 2F2 o rituximab a diferentes dosificaciones, 4 x 1,25 mg/kg (A), 4 x 6,25 mg/kg (B), o 4 x 12,50 mg/kg (C).
- 45 Las Figuras 47A-C muestran análisis de citometría de flujo de células que expresan CD20^{bajo}CD23^{alto}CD40^{alto} en sangre periférica de monos cynomolgus después de administración intravenosa de 2F2 o rituximab a diferentes dosificaciones, 4 x 1,25 mg/kg (A), 4 x 6,25 mg/kg (B), o 4 x 12,50 mg/kg (C).
- Las Figuras 48A-E muestran unión de rituximab (A), 2F2 (B), 11B8 (C), B1 (D), o un anticuerpo de control de isotipo (E) con células CHO que expresan CD20 de tipo silvestre (WT), CD20 mutante (AxP), o tanto CD20 WT como CD20 mutante (AxP) como se determina por citometría de flujo.
- 50 Las Figuras 49A-F muestran porcentaje de unión de 2F2, 11B8T, B1 o rituximab con P172S mutante frente a CD20 WT (A), porcentaje de unión de 2F2T, 11B8T, B1, CAT (CAT 13,6x10¹², un anticuerpo anti-CD20 de IgG2A monoclonal de ratón, Diatec.Com), un anticuerpo de isotipo de control (KLH) o rituximab con CD20 mutante (AxP) frente a CD20 WT (B), porcentaje de unión de 2F2, 11B8T, B1 o rituximab con N166D mutante frente a CD20 WT (C), porcentaje de unión de 2F2T, CAT o rituximab con N166D mutante frente a CD20 WT (D), porcentaje de unión de 2F2T, 2F2, 11B8T, B1 o rituximab con N163D mutante frente a CD20 WT (E) y porcentaje de unión de 2F2T, CAT o rituximab con N163D mutante frente a CD20 WT (F).
- La Figura 50 muestra unión de 2F2T, 7D8, y anticuerpo de control de isotipo, como se determina por ELISA, con tres anticuerpos antiidiotípicos, sab anti-2F2 1.1, sab anti-2F2 1.2 y sab anti-2F2 1.3, inducidos contra 2F2.
- 60 La Figura 51 muestra unión de 11B8T, como se determina por ELISA, con anticuerpos antiidiotípicos, sab anti-11B8T 2.2, sab anti-11B8T 2.3, sab anti-11B8T 2.4, sab anti-11B8T 2.5 y sab anti-11B8T 2.6, inducidos contra 11B8T, pero no muestra unión de los anticuerpos anti-2F2 antiidiotípicos.
- Las Figuras 52A-C muestran unión dependiente de dosis de 2F2T, como se determina por ELISA, con tres anticuerpos antiidiotípicos, sab anti-2F2 1.1 (A), sab anti-2F2 1.2 (B) y sab anti-2F2 1.3 (C), inducidos contra 2F2.
- 65 La Figura 53 muestra la secuencia de aminoácidos (SEQ ID N°: 2) de la región V de cadena pesada y la secuencia de aminoácidos (SEQ ID N°: 4) de la región V de cadena ligera (kappa) de anticuerpo monoclonal

humano 2F2 con regiones CDR designadas.

La *Figura 54* muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID N°: 1) de la región V de cadena pesada y la secuencia de nucleótidos (SEQ ID N°:3) de la región V de cadena ligera (kappa) de anticuerpo monoclonal humano 2F2.

5 La *Figura 55* muestra la secuencia de aminoácidos (SEQ ID N°: 6) de la región V de cadena pesada y la secuencia de aminoácidos (SEQ ID N°: 8) de la región V de cadena ligera (kappa) de anticuerpo monoclonal humano 7D8 con regiones CDR designadas.

10 La *Figura 56* muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID N°: 5) de la región V de cadena pesada y la secuencia de nucleótidos (SEQ ID N°: 7) de la región V de cadena ligera (kappa) de anticuerpo monoclonal humano 7D8.

La *Figura 57* muestra la secuencia de aminoácidos (SEQ ID N°: 10) de la región V de cadena pesada y la secuencia de aminoácidos (SEQ ID N°: 12) de la región V de cadena ligera (kappa) de anticuerpo monoclonal humano 11B8 con regiones CDR designadas.

15 La *Figura 58* muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID N°: 9) de la región V de cadena pesada y la secuencia de nucleótidos (SEQ ID N°: 11) de la región V de cadena ligera (kappa) de anticuerpo monoclonal humano 11B8.

Descripción detallada de la invención

20 La presente divulgación proporciona terapias basadas en anticuerpos mejoradas para tratar y diagnosticar una diversidad de trastornos que implican células que expresan CD20. Las terapias de la divulgación emplean anticuerpos monoclonales humanos aislados que se unen específicamente a un epítipo presente en CD20. Los anticuerpos monoclonales humanos aislados abarcados por la presente divulgación incluyen anticuerpos IgA, IgG1-4, IgE, IgM e IgD.

25 En una realización el anticuerpo es un anticuerpo IgG1, más particularmente un isotipo IgG1, κ o IgG1, λ . En otra realización el anticuerpo es un anticuerpo IgG3, más particularmente un isotipo IgG3, κ o IgG3, λ . En otra realización más, el anticuerpo es un anticuerpo IgG4, más particularmente un isotipo IgG4, κ o IgG4, λ . En otra realización más, el anticuerpo es un anticuerpo IgA1 o IgA2.

30 En otra realización más, el anticuerpo es un anticuerpo IgM.

35 En una realización, los anticuerpos humanos se producen en un animal transgénico no humano, por ejemplo, un ratón transgénico, capaz de producir múltiples isotipos de anticuerpos monoclonales humanos para CD20 sometiendo a recombinación de V-D-J y conmutación de isotipo. En consecuencia, los aspectos de la divulgación incluyen no solamente anticuerpos, fragmentos de anticuerpo y composiciones farmacéuticas de los mismos, sino también animales transgénicos no humanos, Linfocitos B, transfectomas de células hospedadoras e hibridomas que producen anticuerpos monoclonales. Tal animal transgénico también puede ser un conejo transgénico para producir anticuerpos policlonales tales como los desvelados en el documento US 2003/0017534. Por consiguiente, la divulgación también abarca anticuerpos policlonales humanos que se unen de manera específica a CD20. En una realización, la divulgación se refiere a anticuerpos policlonales que se unen a un epítipo en CD20 (i) que no comprende o requiere el resto de aminoácido prolina en la posición 172; (ii) que no comprende o requiere el resto de aminoácido alanina en la posición 170 o prolina en la posición 172; (iii) que comprende o requiere los restos de aminoácido asparagina en la posición 163 y asparagina en la posición 166; (iv) que no comprende o requiere el resto de aminoácido prolina en la posición 172, pero que comprende o requiere los restos de aminoácido asparagina en la posición 163 y asparagina en la posición 166; o (v) que no comprende o requiere los restos de aminoácido alanina en la posición 170 o prolina en la posición 172, pero que comprende o requiere los restos de aminoácido asparagina en la posición 163 y asparagina en la posición 166.

50 En otra realización, la divulgación se refiere a anticuerpos policlonales humanos que tienen una o más de las siguientes características: (i) se une al mutante P172S CD20 (prolina en la posición 172 mutada a serina) con al menos la misma afinidad que a la CD20 humana; (ii) se une al mutante AxP (alanina en la posición 170 mutada a serina, y prolina en la posición 172 mutada a serina) con al menos la misma afinidad que la CD20 humana; (iii) presenta una unión reducida del 50 % o más al mutante N166D (asparagina en la posición 166 mutada a ácido aspártico) a la CD20 humana a una concentración de anticuerpo de 10 mg/ml; y/o (iv) presenta una unión reducida del 50 % o más al mutante N163D (asparagina en la posición 163 mutada a ácido aspártico) en comparación con la CD20 humana a una concentración de anticuerpo de 10 mg/ml.

60 En otra realización más, la divulgación se refiere a anticuerpos policlonales humanos que se unen a un epítipo en el primer bucle extracelular pequeño de la CD20 humana. En otra realización, la divulgación también abarca anticuerpos policlonales humanos que se unen a un epítipo discontinuo en CD20. En una realización más, la divulgación se refiere a anticuerpos policlonales humanos que se unen a un epítipo discontinuo en CD20 que tiene parte del primer bucle extracelular pequeño y parte del segundo bucle extracelular pequeño. En otra realización adicional, la divulgación se refiere a anticuerpos policlonales humanos que se unen a un epítipo discontinuo en CD20, que tiene los restos AGIYAP del primer bucle extracelular pequeño y los restos MESLNFI RAHTPYI del segundo bucle extracelular.

Están abarcados por la divulgación métodos para usar los anticuerpos de la divulgación para detectar una célula que expresa CD20. También se proporcionan métodos para usar los anticuerpos de la divulgación para bloquear o inhibir actividades inducidas por CD20, por ejemplo, actividades proliferativas y/o de diferenciación, y son útiles en el tratamiento de trastornos asociados con CD20, tales como enfermedades tumorigénicas (por ejemplo, linfoma de linfocitos B) y enfermedades autoinmunes (por ejemplo, R.A, enfermedad de Crohn y granulomatosis de Wegener).

Para que la presente invención pueda entenderse más fácilmente se definen en primer lugar ciertos términos. Se exponen definiciones adicionales en toda la descripción detallada.

Las expresiones "CD20" y "antígeno CD20" se usan de forma intercambiable en este documento, e incluyen cualquier variante, isoforma y homólogo de especie de CD20 humano que se exprese de forma natural por células o se exprese en células transfectadas con el gen de CD20. La unión de un anticuerpo de la divulgación con el antígeno CD20 media en la destrucción de células que expresan CD20 (por ejemplo, una célula tumoral) inactivando CD20. La destrucción de células que expresan CD20 puede producirse por uno o más de los siguientes mecanismos:

- citotoxicidad dependiente de complemento (CDC) de células que expresan CD20;
- apoptosis de células que expresan CD20;
- fagocitosis de célula efectora de células que expresan CD20; o
- citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo de células efectoras (ADCC) de células que expresan CD20.

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

Como se usa en este documento, la expresión "inhibe el crecimiento" (por ejemplo, en referencia a células) pretende incluir cualquier reducción medible en el crecimiento celular cuando se pone en contacto con un anticuerpo anti-CD20 en comparación con el crecimiento de las mismas células no en contacto con un anticuerpo anti-CD20, por ejemplo, la inhibición de crecimiento de un cultivo celular en al menos aproximadamente 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 99 % o 100 %. Una reducción tal del crecimiento celular puede producirse por una diversidad de mecanismos, por ejemplo, fagocitosis de células efectoras, ADCC, CDC y/o apoptosis.

El término "balsa" se refiere a los microdominios de membrana ricos en esfingolípidos y colesterol localizados en el área de la monocapa exterior de la membrana plasmática de una célula. La capacidad de ciertas proteínas para asociarse con tales dominios puede afectar a la función de la proteína. Por ejemplo, la traslocación de moléculas CD20 a balsas lipídicas, después de unirse por anticuerpos humanos de la presente divulgación, crea una alta densidad de complejos de anticuerpo-antígeno CD20 en las membranas plasmáticas. Una densidad alta tal de complejos antígeno CD20-anticuerpo puede permitir la activación eficaz del sistema de complemento durante CDC.

El término "anticuerpo" como se hace referencia en este documento incluyen anticuerpos completos y cualquier fragmento de unión a antígeno (es decir, "parte de unión a antígeno") o cadena sencilla del mismo. Un "anticuerpo" se refiere a una glucoproteína que comprende al menos dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas por enlaces disulfuro, o una parte de unión a antígeno de las mismas. Cada cadena pesada está comprendida por una región variable de cadena pesada (abreviada en este documento como V_H) y una región constante de cadena pesada. Cada cadena ligera está comprendida por una región variable de cadena ligera (abreviada en este documento como V_L) y una región constante de cadena ligera. Las regiones V_H y V_L pueden subdividirse adicionalmente en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas regiones flanqueantes (FR). Cada V_H y V_L está compuesta por tres CDR y cuatro FR, dispuestas de extremo amino terminal a carboxilo terminal en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Las regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras contienen un dominio de unión que interacciona con un antígeno. Las regiones constantes de los anticuerpos pueden mediar en la unión de la inmunoglobulina con tejidos o factores del hospedador, incluyendo diversas células del sistema inmune (por ejemplo, células efectoras) y el primer componente (C1q) del sistema de complemento clásico.

La expresión "parte de unión a antígeno" de un anticuerpo (o simplemente "parte de anticuerpo"), como se usa en este documento, se refiere a uno o más fragmentos de un anticuerpo que conserva la capacidad para unirse específicamente a un antígeno (por ejemplo, CD20). Se ha mostrado que la función de unión a antígeno de un anticuerpo puede realizarse por fragmentos de un anticuerpo de longitud completa. Los ejemplos de fragmentos de unión abarcadas dentro de la expresión "parte de unión a antígeno" de un anticuerpo incluyen (i) un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consiste en dominios V_L, V_H, C_L y C_{H1}; (ii) un fragmento F(ab')₂, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab enlazados por un puente disulfuro en la región bisagra; (iii) un fragmento Fd que consiste en los dominios V_H y C_{H1}; (iv) un fragmento Fv que consiste en los dominios V_L y V_H de una rama sencilla de un anticuerpo, (v) un fragmento dAb (Ward *et al.*, (1989) Nature 341: 544-546), que consiste en un dominio V_H; (vi) una región determinante de complementariedad aislada (CDR) y (vii) una combinación de dos o más CDR aisladas que pueden opcionalmente unirse por un enlazador sintético. Además, aunque los dos dominios

del fragmento Fv, V_L y V_H, están codificados por genes separados, pueden unirse, usando métodos recombinantes, por un enlazador sintético que permite que se compongan como una cadena proteica sencilla en la que las regiones V_L y V_H se emparejan para formar moléculas monovalentes (conocidas como Fv de cadena sencilla (scFv); véase por ejemplo, Bird *et al.* (1988) *Science* 242: 423-426; y Huston *et al.* (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 5879-5883). También se pretende que tales anticuerpos de cadena sencilla estén abarcados dentro de la expresión “parte de unión a antígeno” de un anticuerpo. Un ejemplo adicional es proteínas de fusión de inmunoglobulina de dominio de unión que comprenden (i) un polipéptido de dominio de unión que se fusiona con un polipéptido de región bisagra de inmunoglobulina, (ii) una región constante CH2 de cadena pesada de inmunoglobulina fusionada con la región bisagra y (iii) una región constante CH3 de cadena pesada de inmunoglobulina fusionada con la región constante CH2. El polipéptido de dominio de unión puede ser una región variable de cadena pesada o una región variable de cadena ligera. Las proteínas de fusión de inmunoglobulina de dominio de unión se describen adicionalmente en los documentos US 2003/0118592 y US 2003/0133939. Estos fragmentos de anticuerpo se obtienen usando técnicas convencionales conocidas por los expertos en la materia, y los fragmentos se exploran con respecto a utilidad de la misma manera que los anticuerpos intactos.

El término “epítipo” significa un determinante proteico capaz de unión específica con un anticuerpo. Los epítipos habitualmente consisten en agrupamientos químicamente tensioactivos de moléculas tales como aminoácidos o cadenas laterales de azúcares y habitualmente tienen características estructurales tridimensionales específicas, así como características de carga específicas. Los epítipos conformacionales y no conformacionales se distinguen porque la unión con los primeros pero no con los segundos se pierde en presencia de disolventes desnaturizantes.

La expresión “epítipo discontinuo”, como se usa en este documento, significa un epítipo conformacional en un antígeno proteico que se forma a partir de al menos dos regiones separadas en la secuencia primaria de la proteína.

Se pretende que la expresión “molécula biespecífica” incluya cualquier agente, por ejemplo, una proteína, péptido o complejo proteico o peptídico, que tenga dos especificidades de unión diferentes. Por ejemplo, la molécula puede unirse, o interactuar con, (a) un antígeno de superficie celular y (b) un receptor de Fc en la superficie de una célula efectora. La expresión “molécula multiespecífica” o “molécula heteroespecífica” pretende incluir cualquier agente, por ejemplo, una proteína, péptido o complejos proteico o peptídico, que tenga más de dos especificidades de unión diferentes. Por ejemplo, la molécula puede unirse, o interactuar, con (a) un antígeno de superficie celular, (b) un receptor de Fc en la superficie de una célula efectora y (c) al menos otro componente. En consecuencia, la divulgación incluye, pero sin limitación, moléculas biespecíficas, trispecíficas, tetraespecíficas y otras multiespecíficas que se dirigen a antígenos de superficie celular, tales como CD20, y a otras dianas, tales como receptores de Fc en células efectoras.

La expresión “anticuerpos biespecíficos” también incluye diacuerpos. Los diacuerpos son anticuerpos bivalentes, biespecíficos en los que los dominios V_H y V_L se expresan en una cadena polipeptídica sencilla, pero usando un enlazador que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios de la misma cadena, obligando de este modo a los dominios a emparejarse con dominios complementarios de otra cadena y creando dos sitios de unión a antígeno (véase por ejemplo, Holliger, P., *et al.* (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 6444-6448; Poljak, R. J., *et al.* (1994) *Structure* 2: 1121-1123).

La expresión “derivados de anticuerpos humanos” se refiere a cualquier forma modificada del anticuerpo, por ejemplo, un conjugado del anticuerpo y otro agente o anticuerpo.

Como se usa en este documento, un anticuerpo humano “deriva de” una secuencia de línea germinal particular si el anticuerpo se obtiene de un sistema que usa secuencias de inmunoglobulina humanas, por ejemplo, inmunizando un ratón transgénico que porta genes de inmunoglobulina humana o explorando una biblioteca génica de inmunoglobulina humana, y en el que el anticuerpo humano seleccionado es al menos 90 %, más preferiblemente al menos 95 %, incluso más preferiblemente al menos 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntico en secuencia de aminoácidos a la secuencia de aminoácidos codificada por el gen de inmunoglobulina de línea germinal. Típicamente, un anticuerpo humano derivado de una secuencia de línea germinal humana particular presentará no más de 10 diferencias de aminoácidos, más preferiblemente, no más de 5, o incluso más preferiblemente, no más de 4, 3, 2 o 1 diferencia de aminoácidos con respecto a la secuencia de aminoácidos codificada por el gen de inmunoglobulina de línea germinal.

Como se usa en este documento, el término “heteroanticuerpos” se refiere a dos o más anticuerpos, derivados de los mismos, o regiones de unión a antígeno enlazadas entre sí, al menos dos de los cuales tienen diferentes especificidades. Estas especificidades diferentes incluyen una especificidad de unión para un receptor de Fc en una célula efectora, y una especificidad de unión para un antígeno o epítipo en una célula diana, por ejemplo, una célula tumoral.

La expresión “anticuerpo humano”, como se usa en este documento, pretende incluir anticuerpos que tienen regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana. Los anticuerpos humanos de la invención pueden incluir restos aminoácidos no codificados por secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana (por ejemplo, mutaciones introducidas por mutagénesis aleatoria o

específica de sitio *in vitro* o por mutación somática *in vivo*). Sin embargo, la expresión “anticuerpo humano”, como se usa en este documento, no pretende incluir anticuerpos en los que las secuencias CDR derivadas de la línea germinal de otra especie de mamífero, tal como un ratón, se hayan injertado en secuencias flanqueantes humanas.

5 Las expresiones “anticuerpo monoclonal” o “composición de anticuerpo monoclonal” como se usan en este documento se refieren a una preparación de moléculas de anticuerpo de composición molecular sencilla. Una composición de anticuerpo monoclonal presenta una especificidad de unión sencilla y afinidad por un epítipo particular. En consecuencia, la expresión “anticuerpo monoclonal humano” se refiere a anticuerpos que presentan una especificidad de unión sencilla que tiene regiones constantes y variables derivadas de secuencias de
10 inmunoglobulina de línea germinal humana. En una realización, los anticuerpos monoclonales humanos se producen por un hibridoma que incluye un linfocito B obtenido a partir de un animal no humano transgénico o transcromosómico, por ejemplo, un ratón transgénico, que tenga un genoma que comprende un transgén de cadena pesada y un transgén de cadena ligera humanos fusionados con una célula inmortalizada.

15 La expresión “anticuerpo humano recombinante”, como se usa en este documento, incluye todos los anticuerpos humanos que se preparan, expresan, crean o aíslan por medios recombinantes, tales como (a) anticuerpos aislados de un animal (por ejemplo, un ratón) que es transgénico o transcromosómico para genes de inmunoglobulina humana o un hibridoma preparado a partir de los mismos (descrito adicionalmente en la Sección I, posteriormente), (b) anticuerpos aislados de una célula hospedadora transformada para expresar el anticuerpo, por ejemplo, a partir
20 de un transfectoma, (c) anticuerpos aislados de una biblioteca de anticuerpos humanos recombinante combinatoria, y (d) anticuerpos preparados, expresados, creados o aislados por cualquier otro medio que implique corte y empalme de secuencias génicas de inmunoglobulina humana con otras secuencias de ADN. Tales anticuerpos humanos recombinantes tienen regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana. En ciertas realizaciones, sin embargo, tales anticuerpos humanos recombinantes pueden someterse a mutagénesis *in vitro* (o, cuando se usa un animal transgénico para secuencias de Ig humanas, mutagénesis humana *in vivo*) y por lo tanto las secuencias de aminoácidos de las regiones V_H y V_L de los anticuerpos recombinantes son secuencias que, aunque derivan de y están relacionadas con secuencias de V_H y V_L
25 de línea germinal humana, pueden no existir en la naturaleza dentro del repertorio de línea germinal de anticuerpos humanos *in vivo*.

30 El término “transfectoma”, como se usa en este documento, incluye células hospedadoras eucariotas recombinantes que expresan el anticuerpo, tales como células CHO, células NS/O, células HEK293, células vegetales u hongos, incluyendo células de levadura.

35 Como se usa en este documento, un “anticuerpo heterólogo” se define en relación con el organismo no humano transgénico que produce un anticuerpo tal. Esta expresión se refiere a un anticuerpo que tiene una secuencia de aminoácidos o una secuencia de ácido nucleico codificante correspondiente a la hallada en un organismo que no consiste en el animal no humano transgénico, y generalmente de una especie distinta de la del animal no humano transgénico.

40 Como se usa en este documento, un “anticuerpo heterohíbrido” se refiere a un anticuerpo que tiene una cadena ligera y pesada de diferentes orígenes de organismos. Por ejemplo, un anticuerpo que tiene una cadena pesada humana asociada con una cadena ligera murina es un anticuerpo heterohíbrido. Los ejemplos de anticuerpos heterohíbridos incluyen anticuerpos quiméricos y humanizados, analizados anteriormente.

45 Un “anticuerpo aislado”, como se usa en este documento, pretende referirse a un anticuerpo que está sustancialmente sin otros anticuerpos que tienen diferentes especificidades antigénicas (por ejemplo, un anticuerpo aislado que se une específicamente a CD20 está sustancialmente sin anticuerpos que se unen específicamente a antígenos distintos de CD20). Un anticuerpo aislado que se une específicamente a un epítipo, isoforma o variante de CD20 humano puede, sin embargo, tener reactividad cruzada con otros antígenos relacionados, por ejemplo, de otras especies (por ejemplo, homólogos de especie de CD20). Además, un anticuerpo aislado puede estar sustancialmente sin otro material celular y/o compuestos químicos. En una realización de la divulgación, una combinación de anticuerpos monoclonales “aislados” que tienen diferentes especificidades se combinan en una composición bien definida.

55 Como se usa en este documento, “unión específica” se refiere a unión de anticuerpo con un antígeno predeterminado. Típicamente, el anticuerpo se une con una afinidad correspondiente a una K_D de aproximadamente 1 x 10⁻⁷ M o menos, y se une con la región predeterminada con una afinidad correspondiente a una K_D que es al menos dos órdenes de magnitud más baja que su afinidad para unión con un antígeno no específico (por ejemplo, BSA, caseína) distinta del antígeno predeterminado o un antígeno cercanamente relacionado. Las frases “un anticuerpo que reconoce un antígeno” y “un anticuerpo específico para un antígeno” se usan de forma intercambiable en este documento con la expresión “un anticuerpo que se une específicamente con un antígeno”.

65 Como se usa en este documento, el término “k_d” (s⁻¹), como se usa en este documento, pretende referirse a la constante de tasa de disociación de una relación anticuerpo-antígeno particular. Dicho valor también se denomina el valor k_{off}.

El término “ k_a ” ($M^{-1} \times s^{-1}$), como se usa en este documento, pretende referirse a la constante de tasa de asociación de una interacción anticuerpo-antígeno particular.

- 5 El término “ K_d ” (M), como se usa en este documento, pretende referirse a la constante de disociación en equilibrio de una interacción anticuerpo-antígeno particular.

El término “ K_A ” (M^{-1}), como se usa en este documento, pretende referirse a la constante de asociación en equilibrio de una interacción anticuerpo-antígeno particular y se obtiene dividiendo la k_a por la k_d .

- 10 Como se usa en este documento, “isotipo” se refiere a la clase de anticuerpo (por ejemplo, IgM o IgG1) que se codifica por los genes de región constante de cadena pesada.

- 15 Como se usa en este documento, “conmutación de isotipo” se refiere al fenómeno por el que la clase, o isotipo, de un anticuerpo cambia de una clase Ig a una de las otras clases Ig.

- 20 Como se usa en este documento, “isotipo no conmutado” se refiere a la clase isotópica de cadena pesada que se produce cuando no ha tenido lugar conmutación de isotipo; el gen CH que codifica el isotipo no conmutado es típicamente el primer gen CH inmediatamente cadena abajo desde el gen VDJ funcionalmente reordenado. La conmutación de isotipo se ha clasificado como conmutación de isotipo clásica o no clásica. La conmutación de isotipo clásica se produce por acontecimientos de recombinación que implican al menos una región de secuencia de cambio en el transgén. Pueden producirse conmutación de isotipo no clásica por, por ejemplo, recombinación homóloga entre σ_μ humana y Σ_μ humana (deleción asociada con δ). Pueden aparecer mecanismos de conmutación no clásica alternativos, tales como recombinación intertransgén y/o intercromosómica, entre otros, y efectuar conmutación de isotipo.

- 30 Como se usa en este documento, la expresión “secuencia de cambio” se refiere a las secuencias de ADN responsables de recombinación de conmutación. Una secuencia “donadora de conmutación”, típicamente una región de conmutación μ , estará 5' (es decir, cadena arriba) de la región de construcción para suprimir durante la recombinación de conmutación. La región “aceptora de conmutación” estará entre la región de construcción para suprimir y la región constante de reemplazo (por ejemplo, γ , ϵ , etc.). Como no hay un sitio específico en el que se produzca siempre recombinación, la secuencia génica final típicamente no será predecible a partir de la construcción.

- 35 Como se usa en este documento, “patrón de glucosilación” se define como el patrón de unidades de carbohidratos que se unen covalentemente con una proteína, más específicamente con una proteína de inmunoglobulina (anticuerpo). Un patrón de glucosilación de un anticuerpo heterólogo puede caracterizarse como sustancialmente similar a patrones de glucosilación que se producen de forma natural en anticuerpos producidos por la especie del animal transgénico no humano, cuando un experto habitual en la materia reconocería el patrón de glucosilación del anticuerpo heterólogo como más similar a dicho patrón de glucosilación en la especie del animal transgénico no humano que en la especie de la que derivaron los genes CH del transgén.

- 45 La expresión “de origen natural” como se usa en este documento según se aplica a un objeto se refiere al hecho de que un objeto pueda hallarse en la naturaleza. Por ejemplo, una secuencia polipeptídica o polinucleotídica que está presente en un organismo (incluyendo virus) que pueden aislarse de una fuente en la naturaleza y que no se ha modificado intencionalmente por el hombre en el laboratorio es de origen natural.

- 50 El término “reordenado” como se usan en este documento se refiere a una configuración de un locus de inmunoglobulina de cadena pesada o cadena ligera en el que un segmento V está situado inmediatamente adyacente a un segmento D-J o J en una conformación que codifica esencialmente un dominio V_H o V_L completo, respectivamente. Un locus de gen de inmunoglobulina reordenado (anticuerpo) puede identificarse por comparación con ADN de línea germinal; un locus reordenado tendrá al menos un elemento de homología de heptámero/nonámero recombinado.

- 55 La expresión “no reordenado” o “configuración de línea germinal”, como se usa en este documento, en referencia a un segmento V se refiere a la configuración en la que el segmento V no está recombinado de modo que sea inmediatamente adyacente a un segmento D o J.

- 60 La expresión “molécula de ácido nucleico”, como se usa en este documento, pretende incluir moléculas de ADN y moléculas de ARN. Una molécula de ácido nucleico puede ser bicatenaria o monocatenaria, pero preferiblemente es ADN bicatenario.

- 65 La expresión “molécula de ácido nucleico aislada”, como se usa en este documento en referencia a ácidos nucleicos que codifican anticuerpos completos o partes de anticuerpos (por ejemplo, V_H , V_L , CDR3) que se unen a CD20, pretende referirse a una molécula de ácido nucleico en la que las secuencias de nucleótidos que codifican el anticuerpo intacto o parte de anticuerpo están sin otras secuencias de nucleótidos que codifican anticuerpos

completos o partes de anticuerpo que se unen a antígenos distintos de CD20, pudiendo flanquear de forma natural dichas otras secuencias el ácido nucleico en ADN genómico humano. En una realización, el anticuerpo anti-CD20 humano incluye la secuencia de nucleótidos o aminoácidos de 2F2, 7D8 u 11B8, así como regiones variables de cadena pesada (V_H) y cadena ligera (V_L) que tienen las secuencias mostradas en SEQ ID N°: 1, 5 o 9, y SEQ ID N°: 3, 7 u 11, respectivamente.

Como se describe y se desvela en este documento, las secuencias expuestas en SEQ ID N°: 1-30 incluyen "modificaciones de secuencia conservativa", es decir, modificaciones de secuencia de nucleótidos y aminoácidos que no afectan o alteran significativamente las características de unión de los anticuerpos codificados por la secuencia de nucleótidos o que contienen la secuencia de aminoácidos. Tales modificaciones de secuencia conservativa incluyen sustituciones, adiciones y deleciones de nucleótidos y aminoácidos. Pueden introducirse modificaciones en SEQ ID N°: 1-30 por técnicas convencionales conocidas en la materia, tales como mutagénesis dirigida y mutagénesis mediada por PCR. Las sustituciones de aminoácidos conservativas incluyen en las que el resto aminoacídico se reemplaza con un resto aminoacídico que tiene una cadena lateral similar. Se han definido en la técnica familias de restos aminoacídicos que tienen cadenas laterales similares. Estas familias incluyen aminoácidos con cadenas laterales básicas (por ejemplo, lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares no cargadas (por ejemplo, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína, triptófano), cadenas laterales no polares (por ejemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina), cadenas laterales ramificadas beta (por ejemplo, treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (por ejemplo, tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina). Por lo tanto, un resto aminoacídico no esencial predicho en un anticuerpo anti-CD20 humano se reemplaza preferiblemente con otro resto aminoacídico de la misma familia de cadena lateral.

La presente divulgación también abarca "derivados" de las secuencias de aminoácidos tal como se establecen en las SEQ ID NO: 1-30 y modificaciones conservativas de secuencia de las mismas, en donde uno o más de los restos de aminoácido se han derivatizado, por ejemplo, mediante acilación o glucosilación, sin afectar o alterar de manera significativa las características de la unión del anticuerpo que contiene las secuencias de aminoácidos.

Además, la presente divulgación comprende anticuerpos en los que se han realizado alteraciones en la región Fc para cambiar las propiedades funcionales o farmacocinéticas de los anticuerpos. Tales alteraciones pueden dar como resultado una reducción o aumento de unión de C1 q y CDC o de unión de FcγR y ADCC. Pueden hacerse sustituciones, por ejemplo, en uno o más de los restos aminoacídicos en las posiciones 234, 235, 236, 237, 297, 318, 320 y 322 de la región constante de cadena pesada, provocando de este modo una alteración en una función efectora mientras que se conserva la capacidad para unirse con el antígeno en comparación con el anticuerpo no modificado, consúltese documentos US 5.624.821 y US 5.648.260.

La semivida *in vivo* de los anticuerpos también puede mejorarse modificando el epítipo de receptor de recuperación del dominio constante de Ig o un dominio constante de tipo Ig de modo que la molécula no comprenda un dominio CH2 intacto o una región Fc de Ig intacta, consúltese documentos US 6.121.022 y US 6.194.551. La semivida *in vivo* puede aumentarse además realizando mutaciones en la región Fc, por ejemplo, sustituyendo leucina por treonina en la posición 252, sustituyendo serina por treonina en la posición 254, o sustituyendo fenilalanina por treonina en la posición 256, consúltese documento US 6.277.375.

Además, el patrón de glucosilación de los anticuerpos puede modificarse para cambiar la función efectora de los anticuerpos. Por ejemplo, los anticuerpos pueden expresarse en un transfectoma que no añada la unidad de fucosa normalmente unida a Asn en la posición 297 de la región Fc para potenciar la afinidad de la región Fc para FcγR III que, a su vez, daría como resultado un aumento de ADCC de los anticuerpos en presencia de linfocitos NK, consúltese Shield *et al.* (2002) *JBC*, 277: 26733. Además, puede realizarse modificación de galactosilación para modificar CDC.

Como alternativa, en otra realización, pueden introducirse mutaciones aleatoriamente a lo largo de toda o parte de una secuencia codificante de anticuerpo anti-CD20, tal como por mutagénesis de saturación, y los anticuerpos anti-CD20 modificados resultantes pueden explorarse con respecto a actividad de unión.

En consecuencia, los anticuerpos codificados por las secuencias de nucleótidos (región variable de cadena pesada y ligera) descritas en este documento y/o que contienen las secuencias de aminoácidos (región variable de cadena pesada y ligera) descritas en este documento (es decir, SEQ ID N°: 1-30) incluyen anticuerpos sustancialmente similares codificados por o que contienen secuencias similares que se han modificado de forma conservativa. Se proporciona posteriormente análisis adicional sobre como pueden generarse tales anticuerpos sustancialmente similares basándose en las secuencias parciales (es decir, regiones variables de cadena pesada y ligera) descritas en este documento como SEQ ID N°: 1 -30.

Para ácidos nucleicos, la expresión "homología sustancial" indica que dos ácidos nucleicos, o secuencias designadas de los mismos, cuando se alinean óptimamente y se comparan, son idénticos, con inserciones o deleciones de nucleótidos apropiadas, en al menos aproximadamente 80 % de los nucleótidos, habitualmente al menos aproximadamente 90 % a 95 %, y más preferiblemente al menos aproximadamente 98 % a 99,5 % de los

nucleótidos. Como alternativa, existe homología sustancial cuando los segmentos hibriden en condiciones de hibridación selectivas, con el complemento de la cadena.

5 Para secuencias de nucleótidos aminoácidos, el término “homología” indica el grado de identidad entre dos secuencias de ácido nucleico o aminoácidos cuando se alinean óptimamente y se comparan con inserciones o deleciones apropiadas. Como alternativa, existe homología sustancial cuando los segmentos de ADN hibriden en condiciones de hibridación selectivas, con el complemento de la cadena.

10 El porcentaje de identidad entre dos secuencias es una función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias (es decir, porcentaje de homología = N° de posiciones idénticas/ N° total de posiciones x 100), teniendo en cuenta el número de huecos, y la longitud de cada hueco, que necesita introducirse para alineamiento óptimo de las dos secuencias. La comparación de secuencias y determinación de porcentaje de identidad entre dos secuencias puede conseguirse usando un algoritmo matemático, como se describe en los ejemplos no limitantes posteriores.

15 El porcentaje de identidad entre dos secuencias de nucleótidos puede determinarse usando el programa GAP en el paquete de software GCG (disponible en <http://www.gcg.com>), usando una matriz NNWSgapdna.CMP y un peso de hueco de 40, 50, 60, 70 o 80 y un peso de longitud de 1, 2, 3, 4, 5 o 6. El porcentaje de identidad entre dos secuencias de nucleótidos o aminoácidos también puede determinarse usando el algoritmo de E. Meyers y W. Miller (Comput. Appl. Biosci., 4: 11-17 (1988)) que se ha incorporado en el programa ALIGN (versión 2.0), usando una tabla de restos de peso PAM120, una penalización de longitud de hueco de 12 y una penalización de hueco de 4. Además, el porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos puede determinarse usando el algoritmo de Needleman y Wunsch (J. Mol. Biol. 48: 444-453 (1970)) que se ha incorporado en el programa GAP en el paquete de software GCG (disponible en <http://www.gcg.com>), usando una matriz Blossum 62 o una matriz PAM250, y un peso de hueco de 16, 14, 12, 10, 8, 6 o 4 y un peso de longitud de 1, 2, 3, 4, 5 o 6.

20 Las secuencias de ácido nucleico y proteínas de la presente divulgación pueden usarse adicionalmente como una “secuencia de consulta” para realizar una búsqueda en bases de datos públicas para, por ejemplo, identificar secuencias relacionadas. Tales búsquedas pueden realizarse usando los programas NBLAST y XBLAST (versión 2.0) de Altschul, *et al.* (1990) J. Mol. Biol. 215: 403-10. Las búsquedas de nucleótidos de BLAST pueden realizarse con el programa NBLAST, puntuación = 100, longitud de cadena = 12 para obtener secuencias de nucleótidos homólogas de las moléculas de ácido nucleico de la divulgación. Las búsquedas de proteína BLAST pueden realizarse con el programa XBLAST, puntuación = 50, longitud de palabra = 3 para obtener secuencias de aminoácidos homólogas de las moléculas de proteína de la divulgación. Para obtener alineamiento con huecos para fines de comparación, puede utilizarse BLAST con huecos como se describe en Altschul *et al.*, (1997) Nucleic Acids Res. 25(17): 3389-3402. Cuando se utilizan los programas de BLAST y BLAST con huecos, pueden usarse los parámetros por defecto de los programas respectivos (por ejemplo, XBLAST y NBLAST). Véase <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.

30 Los ácidos nucleicos pueden estar presentes en células completas, en un lisado celular, o en una forma sustancialmente pura o parcialmente purificada. Un ácido nucleico está “aislado” o “se hace sustancialmente puro” cuando se separa por purificación de otros componentes celulares u otros contaminantes, por ejemplo, otros ácidos nucleicos o proteínas celulares, por técnicas convencionales para proporcionar secuencias génicas. Para secuencias codificantes, estas mutaciones pueden afectar a la secuencia de aminoácidos según se desee. En particular, se contemplan secuencias de ADN sustancialmente homólogas de o derivadas de conmutaciones, constantes, V, D, J, nativas y otras secuencias tales descritas en este documento (en el que “derivado” indica que una secuencia es idéntica o modificada de otra secuencia).

35 Las composiciones de ácido nucleico de la presente divulgación, aunque con frecuencia están en una secuencia nativa (excepto para sitios de restricción modificados y similares), de ADNc, genómicos o mezclas de los mismos, pueden mutarse de acuerdo con técnicas convencionales para proporcionar secuencias génicas. Para secuencias codificantes, estas mutaciones pueden afectar a la secuencia de aminoácidos según se desee. En particular, se contemplan secuencias de ADN sustancialmente homólogas de o derivadas de conmutaciones, constantes, V, D, J, nativas y otras secuencias tales descritas en este documento (en el que “derivado” indica que una secuencia es idéntica o modificada de otra secuencia).

40 Un ácido nucleico está “ligado operativamente” cuando se sitúa en una relación funcional con otra secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, un promotor o potenciador está ligado operativamente a una secuencia codificante si afecta a la transcripción de la secuencia. Con respecto a transcripción de secuencias reguladoras, ligado operativamente significa que las secuencias de ADN que se ligan son contiguas y, cuando sea necesario para unir dos regiones codificantes proteicas, contiguas y en fase de lectura. Para secuencias de conmutación, ligado operativamente indica que las secuencias son capaces de efectuar recombinación de conmutación.

45 El término “vector”, como se usa en este documento, pretende referirse a una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico al que se ha ligado. Un tipo de vector es un “plásmido”, que se refiere a un bucle de ADN bicatenario circular en el que pueden ligarse segmentos de ADN adicionales. Otro tipo de vector es un vector viral, en el que pueden ligarse segmentos de ADN adicionales en el genoma viral. Ciertos vectores son capaces de

replicación autónoma en una célula hospedadora en la que se introducen (por ejemplo, vectores bacterianos que tienen un origen bacteriano de replicación y vectores de mamífero episomales). Otros vectores (por ejemplo, vectores de mamífero no episomales) pueden integrarse en el genoma de una célula hospedadora tras la introducción en la célula hospedadora, y de este modo se replican junto con el genoma hospedador. Además, ciertos
 5 vectores son capaces de dirigir la expresión de genes a los que se ligan de forma operativa. Tales vectores se denominan en este documento “vectores de expresión recombinantes” (o simplemente, “vectores de expresión”). En general, los vectores de expresión útiles en técnicas de ADN recombinante están con frecuencia en forma de plásmidos. En la presente memoria descriptiva, “plásmido” y “vector” pueden usarse de forma intercambiable puesto que el plásmido es la forma más habitualmente usada de vector. Sin embargo, la invención pretende incluir tales
 10 otras formas de vectores de expresión, como vectores virales (por ejemplo, retrovirus, adenovirus y virus adenoasociados defectuosos en replicación), que cumplen funciones equivalentes.

La expresión “célula hospedadora recombinante” (o simplemente “célula hospedadora”), como se usa en este documento, pretende referirse a una célula en la que se ha introducido un vector de expresión recombinante.
 15 Debería entenderse que tales términos pretenden referirse no solamente a la célula objeto particular sino a los descendientes de tal célula. Debido a que pueden producirse ciertas modificaciones en generaciones sucesivas debido a mutación o influencias ambientales, dicha descendencia puede, de hecho, no ser idéntica a la célula parental, pero aún se incluye dentro del alcance de la expresión “célula hospedadora” como se usa en este documento. Las células hospedadoras recombinantes incluyen, por ejemplo, transfectomas, tales como células
 20 CHO, células NS/0, y células linfocíticas.

Como se usa en este documento, el término “sujeto” incluye cualquier animal humano o no humano. La expresión “animal no humano” incluye todos los vertebrados, por ejemplo, mamíferos y no mamíferos, tales como primates no humanos, ovejas, perro, vaca, pollos, anfibios, reptiles, etc.
 25

Los términos “animal no humano transgénico” se refieren a un animal no humano que tiene un genoma que comprende uno o más transgenes o transcromosomas de cadena pesada y/o ligera humana (integrados o no integrados en el ADN genómico natural del animal) y que es capaz de expresar anticuerpos completamente humanos. Por ejemplo, un ratón transgénico puede tener un transgén de cadena ligera humana y un transgén de
 30 cadena pesada humana o transcromosoma de cadena pesada humana, de modo que el ratón produzca anticuerpos anti-CD20 humano cuando se inmuniza con antígeno CD20 y/o células que expresan CD20. El transgén de cadena pesada humana puede integrarse en el ADN cromosómico del ratón, como sucede para ratones transgénicos, por ejemplo, HuMAb, tales como ratones HCo7 o HCo12, o el transgén de cadena pesada humana puede mantenerse extracromosómicamente, como sucede para ratones transcromosómicos (por ejemplo, KM) como se describe en el
 35 documento WO 02/43478. Tales ratones transgénicos y transcromosómicos son capaces de producir múltiples isotipos de anticuerpos monoclonales humanos para CD20 (por ejemplo, IgG, IgA y/o IgE) experimentando recombinación V-D-J y conmutación de isotipo.

Se describen diversos aspectos de la divulgación en más detalle en las siguientes subsecciones.
 40

I. Producción de Anticuerpos Humanos para CD20

Pueden producirse anticuerpos monoclonales humanos de la invención por una diversidad de técnicas, incluyendo metodología de anticuerpos monoclonales convencional, por ejemplo, la técnica de hibridación de células somáticas
 45 convencionales de Kohler y Milstein, Nature 256: 495 (1975). Aunque se prefieren procedimientos de hibridación de células somáticas, en principio, pueden emplearse otras técnicas para producir anticuerpo monoclonal, por ejemplo, transformación viral u oncogénica de linfocitos B o técnicas de presentación de fagos usando bibliotecas de genes de anticuerpos humanos.

El sistema animal preferido para preparar hibridomas que secretan anticuerpos monoclonales humanos es el sistema murino. La producción de hibridoma en el ratón es un procedimiento muy bien establecido. Se conocen en la materia protocolos de inmunización y técnicas para aislamiento de esplenocitos inmunizados para fusión. También se conocen compañeros de fusión (por ejemplo, células de mieloma murino) y procedimientos de fusión.
 50

En una realización preferida, pueden generarse anticuerpos monoclonales humanos dirigidos contra CD20 usando ratones transgénicos o transcromosómicos que portan partes del sistema inmune humano en vez del sistema de ratón. Estos ratones transgénicos y transcromosómicos incluyen ratones que se denominan en este documento como ratones HuMAb y ratones KM, respectivamente, y se denominan colectivamente en este documento “ratones transgénicos”.
 55

El ratón HuMAb contiene un minilocus de gen de inmunoglobulina humana que codifica secuencias de inmunoglobulina de cadena pesada (μ y γ) y ligera κ humanas no reordenadas, junto con mutaciones dirigidas que inactivan los loci endógenos de cadena μ y κ (Lonberg, N. *et al.* (1994) Nature 368 (6474): 856-859). En consecuencia, los ratones muestran reducción de la expresión de IgM de ratón o κ y en respuesta a inmunización, los transgenes de cadena pesada y ligera humana introducidos, experimentan conmutación de clase y mutación
 60 somática para generar anticuerpos monoclonales de IgG κ humanos de alta afinidad (Lonberg, N. *et al.* (1994),
 65

mencionado anteriormente; revisado en Lonberg, N. (1994) Handbook of Experimental Pharmacology 113: 49-101; Lonberg, N. y Huszar, D. (1995) Intern. Rev. Immunol. Vol. 13: 65-93, y Harding, F. y Lonberg, N. (1995) Ann. N. Y. Acad. Sci 764: 536-546). La preparación de ratones HuMAb se describe en detalle en Taylor, L. *et al.* (1992) Nucleic Acids Research 20: 6287-6295; Chen, J. *et al.* (1993) International Immunology 5: 647-656; Tuailon *et al.* (1994) J. Immunol. 152: 2912-2920; Lonberg *et al.*, (1994) Nature 368(6474): 856-859; Lonberg, N. (1994) Handbook of Experimental Pharmacology 113:49-101; Taylor, L. *et al.* (1994) International Immunology 6: 579-591; Lonberg, N. y Huszar, D. (1995) Intern. Rev. Immunol. Vol. 13: 65-93; Harding, F. y Lonberg, N. (1995) Ann. N. Y. Acad. Sci 764: 536-546; Fishwild, D. *et al.* (1996) Nature Biotechnology 14: 845-851. Véase además, documentos de Estados Unidos N° 5.545.806; 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425; 5.789.650; 5.877.397; 5.661.016; 5.814.318; 5.874.299; y 5.770.429; todos de Lonberg y Kay, así como el documento US 5.545.807 de Surani *et al.*; documentos WO 98/24884, WO 94/25585, WO 93/1227, WO 92/22645, WO 92/03918 y WO 01/09187.

El ratón KM contiene un transcromosoma de cadena pesada humana y un transgén de cadena ligera kappa humana. Los genes de cadena pesada y ligera de ratón endógenos también se han interrumpido en el ratón KM de modo que la inmunización de los ratones conduce a producción de inmunoglobulinas humanas en lugar de inmunoglobulinas de ratón. La construcción de ratones KM y su uso para inducir inmunoglobulinas humanas se describe en detalle en el documento WO 02/43478.

Inmunizaciones

Para generar anticuerpos monoclonales completamente humanos para CD20, pueden inmunizarse ratones transgénicos o transcromosómicos que contienen genes de inmunoglobulina humana (por ejemplo, ratones HCo12, HCo7 o KM) con una preparación enriquecida de antígeno CD20 y/o células que expresan CD20, como se describe, por ejemplo, en Lonberg *et al.* (1994), mencionado anteriormente; Fishwild *et al.* (1996), mencionado anteriormente y documento WO 98/24884. Como alternativa, los ratones pueden inmunizarse con ADN que codifica CD20 humano. Preferiblemente, los ratones serán de 6-16 semanas de edad tras la primera infusión. Por ejemplo, puede usarse una preparación enriquecida (5-50 µg) del antígeno CD20 para inmunizar los ratones HuMAb por vía intraperitoneal. En el caso de que las inmunizaciones que usan una preparación purificada o enriquecida del antígeno CD20 no den como resultado anticuerpos, los ratones también pueden inmunizarse con células que expresan CD20, por ejemplo, una línea celular, para promover respuestas inmunes.

La experiencia acumulativa con diversos antígenos ha mostrado que los ratones transgénicos HumAb responden mejor cuando se inmunizan inicialmente por vía intraperitoneal (IP) o por vía subcutánea (SC) con células que expresan CD20 en adyuvante completo de Freund, seguido de inmunizaciones IP cada dos semanas (hasta un total de 10) con células que expresan CD20 en PBS. La respuesta inmune puede controlarse a lo largo del protocolo de inmunización obteniéndose muestras de plasma por extracción de sangre retroorbital. El plasma puede explorarse por análisis de FACS (como se describe posteriormente), y pueden usarse ratones con titulaciones suficientes de inmunoglobulina humana anti-CD20 para fusiones. Los ratones pueden estimularse por vía intravenosa con células que expresan CD20 3 días antes de sacrificio y retirada del bazo.

Generación de Hibridomas que Producen Anticuerpos Monoclonales Humanos para CD20

Para generar hibridomas que producen anticuerpos monoclonales humanos para CD20 humano, pueden aislarse esplenocitos y células de ganglios linfáticos de ratones inmunizados y fusionarse con una línea celular inmortalizada apropiada, tal como una línea celular de mieloma de ratón. Los hibridomas resultantes pueden después explorarse con respecto a la producción de anticuerpos específicos de antígeno. Por ejemplo, pueden fusionarse suspensiones celulares sencillas de linfocitos esplénicos de ratones inmunizados con células de mieloma de ratón que no secretan SP2/0-Ag8.653 (ATCC, CRL 1580) con PEG al 50 % (p/v). Las células pueden sembrarse a aproximadamente 1×10^5 por pocillo en placa de microtitulación de fondo plano, seguido de una incubación de dos semanas en medio selectivo que contiene además de los reactivos habituales suero clonal fetal 10 %, factor de clonación de hibridoma origen 5-10 % (IGEN) y HAT 1X (Sigma). Después de aproximadamente dos semanas, las células pueden cultivarse en medio en el que se reemplaza HAT con HT. Pueden después explorarse pocillos individuales por ELISA con respecto a cadena ligera kappa humana que contiene anticuerpos y por análisis de FACS usando células que expresan CD20 con respecto a especificidad de CD20. Una vez que se produce crecimiento extensivo del hibridoma, puede observarse el medio habitualmente después de 10-14 días. Los hibridomas que secretan anticuerpos pueden volver a sembrarse en placas, explorarse de nuevo y si aún son positivos para anticuerpos monoclonales anti-CD20 IgG humanos pueden subclonarse al menos dos veces por dilución limitante. Los subclones estables pueden después cultivarse *in vitro* para generar anticuerpo en medio de cultivo tisular para caracterización.

Generación de Transfectomas que Producen Anticuerpos Monoclonales Humanos para CD20

También pueden producirse anticuerpos humanos de la divulgación en un transfectoma de células hospedadoras usando, por ejemplo, una combinación de técnicas de ADN recombinante y métodos de transfección de genes como se conoce bien en la técnica (Morrison, S. (1985) Science 229: 1202).

Por ejemplo, en una realización, el gen o genes de interés, por ejemplo, genes de anticuerpo humano, pueden

ligarse en un vector de expresión tal como un plásmido de expresión eucariota tal como se usa por el sistema de expresión de genes GS descrito en los documentos WO 87/04462, WO 89/01036 y EP 338 841 u otros sistemas de expresión bien conocidos en la técnica. El plásmido purificado con los genes de anticuerpo clonados puede introducirse en células hospedadoras eucariotas tales como células CHO, células NS/O o células HEK293 o como alternativa otras células eucariotas como células derivadas de plantas, células de hongos o de levadura. El método usado para introducir estos genes podrían ser métodos descritos en la técnica tales como electroporación, lipofectina, lipofectamina u otros. Después de introducir estos genes de anticuerpos en las células hospedadoras, las células que expresan el anticuerpo pueden identificarse y seleccionarse. Estas células representan los transfectomas que pueden después amplificarse con respecto a su nivel de expresión y cuya escala puede aumentarse para producir anticuerpos. Pueden aislarse y purificarse anticuerpos recombinantes a partir de estos sobrenadantes y/o células de cultivo.

Medios Recombinantes Adicionales para Producir Anticuerpos Monoclonales Humanos para CD20

Como alternativa, los genes de anticuerpo clonados pueden expresarse en otros sistemas de expresión, incluyendo células procariotas, tales como microorganismos, tales como *E. coli*, para la producción de anticuerpos Fv de cadena sencilla, algas, así como células de insecto. Además, los anticuerpos pueden producirse en animales no humanos transgénicos, tales como en leche de ovejas y conejos o en huevos de gallinas, o en plantas transgénicas. Véase, por ejemplo, Verma, R., *et al.* (1998). *Antibody engineering: Comparison of bacterial, yeast, insect and mammalian expression systems.* J. Immunol. Meth. 216: 165-181; Pollock, *et al.* (1999). *Transgenic milk as a method for the production of recombinant antibodies.* J. Immunol. Meth. 231: 147-157; y Fischer, R., *et al.* (1999). *Molecular farming of recombinant antibodies in plants.* Biol. Chem. 380: 825-839.

Uso de Secuencias de Anticuerpos Parciales para Expresar Anticuerpos Intactos

Los anticuerpos interactúan con antígenos diana predominantemente a través de restos aminoacídicos que se localizan en las seis regiones determinantes de complementariedad de cadena pesada y ligera (CDR). Por esta razón, las secuencias de aminoácidos dentro de las CDR son más diversas entre anticuerpos individuales que las secuencias fuera de las CDR. Debido a que las secuencias CDR son responsables de la mayoría de interacciones anticuerpo-antígeno, es posible expresar anticuerpos recombinantes que imitan las propiedades de anticuerpos de origen natural específicos construyendo vectores de expresión que incluyen secuencias CDR del anticuerpo de origen natural específico injertado en secuencias flanqueantes de un anticuerpo diferente con diferentes propiedades (véase, por ejemplo, Riechmann, L. *et al.* (1998) *Nature* 332: 323-327; Jones, P. *et al.* (1986) *Nature* 321: 522-525; y Queen, C. *et al.* (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.* 86: 10029-10033). Tales secuencias flanqueantes pueden obtenerse de bases de datos de ADN públicas que incluyen secuencias de genes de anticuerpos de línea germinal. Estas secuencias de línea germinal diferirán de las secuencias de genes de anticuerpos maduros porque no incluirán genes variables completamente ensamblados, que se forman por unión de V(D)J durante la maduración de los linfocitos B. Las secuencias génicas de línea germinal también diferirán de las secuencias de un anticuerpo de repertorio secundario de alta afinidad en el individuo uniformemente a lo largo de la región variable. Por ejemplo, las mutaciones somáticas son relativamente infrecuentes en la parte amino terminal de la región flanqueante 1 y en la parte carboxi-terminal de la región flanqueante 4. Además, muchas mutaciones somáticas no alteran significativamente las propiedades de unión del anticuerpo. Por esta razón, no es necesario obtener la secuencia de ADN completa de un anticuerpo particular para recrear un anticuerpo recombinante intacto que tenga propiedades de unión similares a las del anticuerpo original (véase documento WO 99/45962). La secuencia de cadena pesada y ligera parcial que abarca las regiones CDR es típicamente suficiente para este fin. La secuencia parcial se usa para determinar qué segmentos génicos variables y de unión de línea germinal contribuyeron a los genes variables de anticuerpo recombinados. La secuencia de línea germinal se usa después para rellenar las partes que faltan de las regiones variables. Las secuencias líder de cadena pesada y ligera se escinden durante la maduración de la proteína y no contribuyen a las propiedades del anticuerpo final. Para añadir secuencias que faltan, pueden combinarse secuencias de ADNc clonadas con oligonucleótidos sintéticos por ligación o amplificación por PCR. Como alternativa, puede sintetizarse la región variable completa como un conjunto de oligonucleótidos cortos, solapantes y combinarse por amplificación por PCR para crear un clon de región variable completamente sintética. Este proceso tiene ciertas ventajas tales como eliminación o inclusión de sitios de restricción particulares, u optimización de codones particulares.

Las secuencias de nucleótidos de transcritos de cadena pesada y ligera de hibridomas se usan para diseñar un conjunto solapante de oligonucleótidos sintéticos para crear secuencias V sintéticas con capacidades codificantes de aminoácidos idénticos como las secuencias naturales. Las secuencias de cadena pesada y kappa sintéticas pueden diferir de las secuencias naturales de tres maneras: se interrumpen hileras de bases nucleotídicas repetidas para facilitar la síntesis de oligonucleótidos y amplificación por PCR; se incorporan sitios de inicio de la traducción óptimos de acuerdo con las reglas de Kozak (Kozak, 1991, J. Biol. Chem. 266: 19867-19870); y se introducen por ingeniería genética sitios HindIII cadena arriba de los sitios de inicio de la traducción.

Para regiones variables de cadena tanto pesada como ligera, las secuencias de cadena codificante optimizada y no codificante correspondiente se rompen en 30 – 50 nucleótidos aproximadamente en el punto medio del oligonucleótido no codificante correspondiente. Por lo tanto, para cada cadena, los oligonucleótidos pueden

ensamblarse en conjuntos bicatenarios solapantes que abarcan segmentos de 150 – 400 nucleótidos. Los grupos se usan después como moldes para producir productos de amplificación de PCR de 150- 400 nucleótidos. Típicamente, un conjunto de oligonucleótidos de región variable sencilla se romperá en dos grupos que se amplifican por separado para generar dos productos de PCR solapantes. Estos productos solapantes se combinan después por
5 amplificación por PCR para formar la región variable completa. También puede ser deseable incluir un fragmento solapante de la región constante de cadena pesada o ligera (incluyendo el sitio BbsI de la cadena ligera kappa, o el sitio AgeI de la cadena pesada gamma) en la amplificación por PCR para generar fragmentos que puedan clonarse fácilmente en las construcciones de vector de expresión.

10 Las regiones variables de cadena pesada y ligera reconstruidas se combinan después con promotor clonado, secuencia líder, secuencias de inicio de la traducción, de región constante, 3' no traducidas, de poliadenilación y de terminación de la transcripción para formar construcciones de vector de expresión. Las construcciones de expresión de cadena pesada y ligera pueden combinarse en un vector sencillo, cotransfectarse, transfectarse de forma seriada o transfectarse por separado en células hospedadoras que después se fusionan para formar una célula
15 hospedadora que expresa ambas cadenas.

Se describen posteriormente plásmidos para su uso en construcción de vectores de expresión para IgGκ humana. Los plásmidos se construyeron de modo que pudieron usarse secuencias de ADNc de cadena ligera kappa V y pesada V amplificadas por PCR para reconstruir minigenes de cadena ligera y pesada completos. Estos plásmidos
20 pueden usarse para expresar anticuerpos IgG1,κ o IgG4,κ completamente humanos o quiméricos. Pueden construirse plásmidos similares para expresión de otros isotipos de cadena pesada o para expresión de anticuerpos que comprenden cadenas ligeras lambda.

Por lo tanto, en otro aspecto de la divulgación, las características estructurales de los anticuerpos anti-CD20 humano de la divulgación, por ejemplo, 11B8, 2F2 o 7D8, se usan para crear anticuerpos anti-CD20 humano estructuralmente
25 relacionados que conservan al menos una propiedad funcional de los anticuerpos de la divulgación, tal como unión con CD20. Más específicamente, una o más regiones CDR de 2F2, 7D8 u 11B8 pueden combinarse de forma recombinante con regiones flanqueantes humanas conocidas y CDR para crear anticuerpos anti-CD20 humano, modificados por ingeniería genética de forma recombinante adicionales de la divulgación.

30 En consecuencia, en otra realización, la divulgación proporciona un método para preparar un anticuerpo anti-CD20 que comprende:

preparar un anticuerpo que comprende (1) regiones flanqueantes de cadena pesada humana y CDR de cadena pesada humana, en el que al menos una de las CDR de cadena pesada humana comprende una secuencia de
35 aminoácidos seleccionada de las secuencias de aminoácidos de las CDR mostradas en las Figuras 53, 55 o 57 (o restos aminoácídicos correspondientes en las SEQ ID N°: 13-15 o 19-21 o 25-27); y (2) regiones flanqueantes de cadena ligera humana y CDR de cadena ligera humana, en las que al menos una de las CDR de cadena ligera humana comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de las secuencias de aminoácidos de las CDR mostradas en las Figuras 53, 55 o 57 (o restos aminoácídicos correspondientes en las SEQ ID N°: 16-18, 22-24 o
40 28-30); en el que el anticuerpo conserva la capacidad para unirse a CD20.

La capacidad del anticuerpo para unirse a CD20 puede determinarse usando ensayos de unión convencionales, tales como los expuestos en los ejemplos (por ejemplo, un análisis de FACS).

45 Puesto que se conoce bien en la técnica que los dominios CDR3 de cadena ligera y pesada de anticuerpo desempeñan un papel particularmente importante en la especificidad/afinidad de unión de un anticuerpo por un antígeno, los anticuerpos recombinantes de la divulgación preparados como se ha expuesto anteriormente preferiblemente comprenden las CDR3 de cadena pesada y ligera de 2F2, 7D8 u 11B8. Los anticuerpos pueden comprender adicionalmente las CDR2 de 2F2, 7D8 u 11B8. Los anticuerpos pueden comprender adicionalmente las
50 CDR1 de 2F2, 7D8 u 11B8. En consecuencia, la divulgación proporciona adicionalmente anticuerpos anti-CD20 que comprenden: (1) regiones flanqueantes de cadena pesada humana, una región CDR1 de cadena pesada humana, una región CDR2 de cadena pesada humana y una región CDR3 de cadena pesada humana, siendo la región CDR3 de cadena pesada humana la CDR3 de 2F2, 7D8 u 11B8 como se muestra en las Figuras 53, 55 o 57 (o restos aminoácídicos correspondientes como se muestran en las SEQ ID N°: 15, 21 o 27); y (2) regiones flanqueantes de
55 cadena ligera humana, una región CDR1 de cadena ligera humana, una región CDR2 de cadena ligera humana y una región CDR3 de cadena ligera humana, siendo la región CDR3 de cadena ligera humana la CDR3 de 2F2, 7D8 u 11B8 como se muestra en las Figuras 53, 55 o 57 (o restos aminoácídicos correspondientes como se muestra en las SEQ ID N°: 18, 24 30), uniéndose el anticuerpo a CD20. El anticuerpo puede comprender adicionalmente la CDR2 de cadena pesada y/o CDR2 de cadena ligera de 2F2, 7D8 u 11B8. El anticuerpo puede comprender
60 adicionalmente la CDR1 de cadena pesada y/o la CDR1 de cadena ligera de 2F2, 7D8 u 11B8.

Preferiblemente, la CDR1, 2 y/o 3 de los anticuerpos obtenidos por ingeniería genética descritos anteriormente comprenden la secuencia o secuencias de aminoácidos exactas de 2F2, 7D8 u 11B8 descritas en este documento. Sin embargo, el experto habitual en la materia apreciará que es posible cierta desviación de las secuencias de CDR
65 exactas de 2F2, 7D8 u 11B8 manteniendo aún la capacidad del anticuerpo para unirse a CD20 de forma eficaz (por ejemplo, sustituciones conservativas). En consecuencia, en otra realización, el anticuerpo obtenido por ingeniería

genética puede estar compuesto de una o más CDR que son, por ejemplo, 90 %, 95 %, 98 % o 99,5 % idénticas a una o más CDR de 2F2, 7D8 u 11B8.

5 Además de unirse simplemente a CD20, los anticuerpos obtenidos por ingeniería genética tales como los descritos anteriormente pueden seleccionarse con respecto a su conservación de otras propiedades funcionales de anticuerpos de la divulgación, tales como:

- (1) baja tasa de disociación de CD20;
- (2) alta afinidad de unión con CD20;
- 10 (3) unión a un epítipo único en CD20, unión en una orientación específica a CD20 y/o unión a una forma específica de CD20;
- (4) mediación de un alto nivel de CDC en células negativas para CD55/59 o positivas para CD55/59;
- (5) traslocación en balsas lipídicas tras unión a CD20;
- 15 (6) inhibición del crecimiento de células que expresan CD20;
- (7) inducción de apoptosis de células que expresan CD20;
- (8) inducción de adhesión homotípica de células que expresan CD20;
- (9) supervivencia prolongada de un sujeto que tiene células tumorales que expresan CD20;
- (10) mediación de ADCC en dianas CD20 cuando se mezclan con células efectoras apropiadas;
- (11) capacidad para reducir el número de células que expresan CD20; y/o
- 20 (12) capacidad para reducir el número de células que expresan bajos niveles de CD20 (células CD20^{bajo}).

Caracterización de Unión de Anticuerpos Monoclonales Humanos para CD20

25 Para purificar anticuerpos anti-CD20 humano, pueden dejarse crecer hibridomas en matraces de agitación de dos litros para purificación de anticuerpos monoclonales. Los sobrenadantes pueden filtrarse y concentrarse antes de cromatografía de afinidad con proteína A-sepharose (para anticuerpos de isotipo IgG1) (Pharmacia, Piscataway, NJ) o sepharose recubierta con IgG antihumano o proteína G-sepharose en caso de anticuerpos de isotipo IgG3. La IgG eluida puede comprobarse por electroforesis en gel y cromatografía líquida de alto rendimiento para asegurar su pureza. La solución de tampón puede intercambiarse a PBS y la concentración puede determinarse por DO₂₈₀

30 usando coeficiente de extinción 1,43. Los anticuerpos monoclonales pueden separarse en alícuotas y almacenarse a -80 °C.

35 Para determinar si los anticuerpos monoclonales anti-CD20 humano se unen a epítopos únicos, puede usarse mutagénesis dirigida o multidirigida.

Para determinar el isotipo de los anticuerpos purificados, pueden realizarse ELISA de isotipos. Los pocillos de placas de microtitulación pueden recubrirse con Ig antihumano 10 µg/ml durante una noche a 4 °C. Después de bloquear con BSA 5 %, se hacen reaccionar las placas con anticuerpos monoclonales 10 µg/ml o controles de isotipo purificados, a temperatura ambiente durante dos horas. Pueden después hacerse reaccionar los pocillos con IgG1, 40 IgG2, IgG3 o IgG4 humana o sondas conjugadas con fosfatasa alcalina específicas de IgM humana. Después de lavar, las placas se revelan con sustrato pNPP (1 mg/ml) y se analizan a DO de 405-650.

45 Para demostrar la presencia de anticuerpos anti-CD20 en sueros de ratones inmunizados o unión de anticuerpos monoclonales con células vivas que expresan CD20, puede usarse citometría de flujo. Brevemente, se mezclan líneas celulares que expresan CD20 (cultivadas en condiciones de crecimiento convencionales) con diversas concentraciones de anticuerpos monoclonales en PBS que contiene BSA 0,1 % y azida sódica 0,02 %, y se incuban a 4 °C durante 30 minutos. Después de lavar, se hace reaccionar a las células con anticuerpo anti-IgG humano marcado con fluoresceína en las mismas condiciones que la tinción de anticuerpos primarios. Las muestras pueden 50 analizarse por citometría de flujo con un instrumento FACS usando propiedades de dispersión de la luz y lateral para seleccionar en células vivas sencillas. Además de, o en lugar de, el ensayo de citometría de flujo puede usarse un ensayo alternativo que usa microscopía de fluorescencia. Las células pueden teñirse exactamente como se ha descrito anteriormente y examinarse por microscopía de fluorescencia. Este método permite la visualización de células individuales, pero puede tener sensibilidad reducida dependiendo de la densidad del antígeno.

55 Pueden ensayarse adicionalmente IgG humanas anti-CD20 con respecto a sensibilidad con antígeno CD20 por transferencia de Western. Brevemente, pueden prepararse extractos celulares a partir de células que expresan CD20 y someterse a electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico (SDS). Después de electroforesis, los antígenos separados se transferirán a membranas de nitrocelulosa, se bloquearán con suero de ratón 20 % y se explorarán con los anticuerpos monoclonales para ensayar. Puede detectarse unión de IgG humana usando fosfatasa alcalina anti-IgG humana y revelarse con comprimidos de sustrato BCIP/NBT (Sigma Chem. Co., 60 St. Louis, MO).

Actividades Fagocíticas y de Muerte Celular de Anticuerpos Monoclonales Humanos para CD20

65 Además de unirse específicamente a CD20, los anticuerpos anti-CD20 monoclonales humanos pueden ensayarse con respecto a su capacidad para mediar en la fagocitosis y destrucción de células que expresan CD20. Los

5 ensayos de la actividad de los anticuerpos monoclonales *in vitro* proporcionarán una exploración inicial antes del ensayo de modelos *in vivo*. Brevemente, pueden purificarse células polimorfonucleares (PMN), linfocitos NK, monocitos u otras células efectoras, de donantes sanos por centrifugación de densidad Ficoll Hypaque, seguido de lisis de eritrocitos contaminantes. Pueden suspenderse PMN lavados en RPMI complementado con suero de ternero fetal inactivado por calor 10 % y mezclarse con células marcadas con ⁵¹Cr que expresan CD20 a diversas relaciones de células efectoras y células tumorales (-células efectoras: células tumorales). Después pueden añadirse IgG anti-CD20 humano purificadas a diversas concentraciones. Puede usarse IgG humana irrelevante como control negativo. Pueden llevarse a cabo ensayos durante de 4 a 20 horas a 37 °C dependiendo del tipo de célula efectora usada. Pueden ensayarse las muestras con respecto a citolisis midiendo la liberación de ⁵¹Cr al sobrenadante de cultivo.

10 También pueden ensayarse anticuerpos monoclonales anti-CD20 en combinaciones entre sí para determinar si la citolisis se potencia con múltiples anticuerpos monoclonales.

Los anticuerpos monoclonales humanos que se unen a CD20 también pueden ensayarse en un modelo *in vivo* (por ejemplo, en ratones) para determinar su eficacia en el control del crecimiento de células tumorales que expresan CD20. Estos anticuerpos pueden seleccionarse, por ejemplo, basándose en los siguientes criterios, que no pretenden ser exclusivos:

1. unión con células vivas que expresan CD20;
2. baja tasa de disociación de CD20;
- 20 3. alta afinidad de unión a CD20;
4. unión con un epítipo único en CD20; y/o unión en una orientación específica para CD20 y/o unión con una forma específica de CD20;
5. opsonización de células que expresan CD20;
- 25 6. mediación de inhibición del crecimiento, fagocitosis y/o destrucción de células que expresan CD20 en presencia de células efectoras humanas;
7. capacidad para inducir CDC en células positivas o negativas para CD55/59;
8. capacidad para inducir adhesión homotípica;
9. capacidad para inducir traslocación a balsas lipídicas tras unión con CD20;
- 30 10. capacidad para inducir apoptosis;
11. capacidad para inducir ADCC en células que expresan CD20;
12. capacidad para reducir el número de células que expresan CD20; y/o
13. capacidad para reducir el número de células que expresan bajos niveles de CD20 (células CD20^{bajo}).

Los anticuerpos monoclonales humanos preferidos de la divulgación cumplen uno o más de estos criterios.

Los anticuerpos anti-CD20 monoclonales humanos pueden ensayarse con respecto a su capacidad para mediar en CDC usando una diversidad de técnicas conocidas. Por ejemplo, puede obtenerse suero para complemento a partir de la sangre de sujetos sanos que puede centrifugarse y recogerse. Para determinar la actividad CDC de diversos mAb, pueden usarse diferentes métodos. La liberación de ⁵¹Cr puede por ejemplo medirse o puede evaluarse la permeabilidad de membrana elevada usando un ensayo de exclusión de yoduro de propidio (PI). Brevemente, las células diana pueden lavarse y resuspenderse en RPMI-BSA 1 % a 1 x 10⁶/ml. Pueden añadirse diversas concentraciones de mAb a las células y permitir que se unan durante 10-15 minutos a temperatura ambiente. Después puede añadirse suero a una concentración final del 20 % (v/v) y las células pueden incubarse a 37 °C durante 45 minutos. Todas las células de cada muestra pueden añadirse a la solución de PI en un tubo FACS. La mezcla puede después evaluarse inmediatamente por citometría de flujo usando un citómetro de flujo FACScalibur y analizarse usando software CellQuest pro (BD Biosciences, Mountain view, CA).

Para ensayar con respecto a la capacidad para iniciar la apoptosis, los anticuerpos anti-CD20 monoclonales humanos pueden, por ejemplo, incubarse con células tumorales positivas para CD20, por ejemplo, Daudi a 37 °C durante aproximadamente 20 horas. Las células pueden recogerse, lavarse en tampón de unión de Anexina V-FITC (BD biosciences) y marcarse con Anexina V-FITC (BD biosciences) durante 15 minutos en oscuridad a 4 °C. Todas las células de cada muestra pueden añadirse a solución de PI (10 µg/ml en PBS) en un tubo de FACS y evaluarse inmediatamente por citometría de flujo (como anteriormente).

55 En una realización particular de la divulgación, los anticuerpos monoclonales humanos se usan en combinación, por ejemplo, como una composición farmacéutica que comprende dos o más anticuerpos monoclonales anti-CD20. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales anti-CD20 humanos que tienen actividades diferentes pero complementarias pueden combinarse en una terapia sencilla para conseguir un efecto terapéutico o de diagnóstico deseado. En una realización preferida, la composición incluye un anticuerpo monoclonal humano anti-CD20 que media en CDC combinado con otro anticuerpo monoclonal anti-CD20 humano que induce apoptosis. En otra realización, la composición incluye un anticuerpo monoclonal anti-CD20 humano que media en la destrucción altamente eficaz de células diana en presencia de células efectoras, combinado con otro anticuerpo monoclonal anti-CD20 humano que inhibe el crecimiento de células que expresan CD20.

65 II. Producción de Animales No humanos Transgénicos Que Generan Anticuerpos Anti-CD20 Monoclonales Humanos

En otro aspecto más, la divulgación proporciona animales no humanos transgénicos y transcromosómicos, tales como ratones transgénicos o transcromosómicos, que son capaces de expresar anticuerpos humanos que se unen específicamente a CD20. En una realización particular, la divulgación proporciona un ratón transgénico o transcromosómico que tiene un genoma que comprende un transgén de cadena pesada humano, de modo que el ratón produce anticuerpos anti-CD20 humanos cuando se inmunizan con células que expresan CD20. El transgén de cadena pesada humana puede integrarse en el ADN cromosómico del ratón, como sucede para ratones transgénicos, por ejemplo, HuMAb, como se describe en detalle en este documento y se ejemplifica. Como alternativa, el transgén de cadena pesada humano puede mantenerse extracromosómicamente, como sucede para ratones transcromosómicos (por ejemplo, KM) como se describe en el documento WO 02/43478. Tales animales transgénicos y transcromosómicos son capaces de producir múltiples isotipos de anticuerpos monoclonales humanos para CD20 (por ejemplo, IgG, IgA y/o IgE) experimentando recombinación V-D-J/V-J y conmutación de isotipos. El diseño de un animal no humano transgénico o transcromosómico que responda a estimulación con antígeno ajeno con un repertorio de anticuerpos heterólogos, requiere que los transgenes de inmunoglobulina heterólogos contenidos dentro del animal transgénico actúen correctamente a lo largo de la ruta de desarrollo de linfocitos B. Esto incluye, por ejemplo, conmutación de isotipos del transgén de cadena pesada heterólogo. En consecuencia, los transgenes se construyen de modo que pueda inducirse la conmutación de isotipos y una o más de las siguientes características de genes de anticuerpos: (1) expresión específica de tipo celular y de alto nivel, (2) reordenación de genes funcionales, (3) activación de y respuesta a exclusión alélica, (4) expresión de un repertorio primario suficiente, (5) transducción de señales, (6) hipermutación somática, y (7) dominación del locus de anticuerpo transgénico durante la respuesta inmune.

No se requiere cumplir todos los criterios anteriores. Por ejemplo, en las realizaciones en las que los loci de inmunoglobulina endógenos del animal transgénico se interrumpen funcionalmente, el transgén no necesita activar exclusión alélica. Además, en las reivindicaciones en las que el transgén comprende un gen de inmunoglobulina de cadena pesada y/o ligera funcionalmente reordenado, el segundo criterio de reordenación de gen funcional es innecesario, al menos para el transgén que ya está reordenado. Para antecedentes de inmunología molecular, véase, *Fundamental Immunology*, 2ª edición (1989), Paul William E., ed. Raven Press, N. Y.

En ciertas realizaciones, los animales no humanos transgénicos o transcromosómicos usados para generar los anticuerpos monoclonales humanos de la divulgación contienen transgenes de cadena pesada y ligera de inmunoglobulina heterólogos reordenados, no reordenados o una combinación de reordenados y no reordenados en la línea germinal del animal transgénico. Cada uno de los transgenes de cadena pesada comprende al menos un gen C_H . Además, el transgén de cadena pesada puede contener secuencias de conmutación de isotipos funcionales, que son capaces de soportar la conmutación de isotipos de un transgén heterólogo que codifica múltiples genes C_H en los linfocitos B del animal transgénico. Tales secuencias de conmutación pueden ser las que aparecen de forma natural en el locus de inmunoglobulina de línea germinal de la especie que actúa como la fuente de los genes C_H transgénicos, o tales secuencias de conmutación pueden derivar de las que aparecen en la especie que va a recibir la construcción de transgén (el animal transgénico). Por ejemplo, una construcción de transgén humano que se usa para producir un ratón transgénico puede producir una frecuencia mayor de acontecimientos de conmutación de isotipos si incorpora secuencias de conmutación similares a las que aparecen de forma natural en el locus de cadena pesada de ratón, puesto que supuestamente las secuencias de conmutación de ratones están optimizadas para actuar con el sistema de enzima recombinasa de conmutación de ratón, mientras que las secuencias de conmutación humanas no. Las secuencias de conmutación pueden aislarse y clonarse por métodos de clonación convencionales o pueden sintetizarse *de novo* a partir de oligonucleótidos sintéticos solapantes diseñados basándose en la información de secuencia publicada en relación con secuencias de región de conmutación de inmunoglobulina (Mills *et al.*, *Nucl. Acids Res.* 15: 7305-7316 (1991); Sideras *et al.*, *Intl. Immunol.* 1: 631 -642 (1989)). Para cada uno de los animales transgénicos anteriores, se encuentran transgenes de inmunoglobulina de cadena pesada y ligera heterólogos funcionalmente reordenados en una fracción significativa de los linfocitos B del animal transgénico (al menos 10 por ciento).

Los transgenes usados para generar los animales no humanos transgénicos de la divulgación incluyen un transgén de cadena pesada que comprende ADN que codifica al menos un segmento génico variable, un segmento génico de diversidad, un segmento génico de unión y al menos un segmento génico de región constante. El transgén de cadena ligera de inmunoglobulina comprende ADN que codifica al menos un segmento génico variable, un segmento génico de unión y al menos un segmento génico de región constante. Los segmentos génicos que codifican los segmentos génicos de cadena ligera y pesada son heterólogos para el animal transgénico porque derivan de, o corresponden a, ADN que codifica segmentos génicos de cadena pesada y ligera de inmunoglobulina de una especie que no consiste en el animal transgénico no humano. En un aspecto de la divulgación el transgén se construye de modo que los segmentos génicos individuales no están reordenados, es decir, no se reordenan de modo que codifiquen una cadena ligera o pesada de inmunoglobulina funcional. Tales transgenes no reordenados soportan la recombinación de los segmentos génicos V, D y J (reordenamiento funcional) y preferiblemente soportan la incorporación de todo o una parte de un segmento génico de región D en la cadena pesada de inmunoglobulina reordenada resultante dentro del animal transgénico cuando se exponen a antígeno CD20.

En una realización alternativa, los transgenes comprenden un "mini-locus" no reordenado. Tales transgenes típicamente comprenden una parte sustancial de los segmentos C, D y J así como un subconjunto de los segmentos

génicos V. En tales construcciones de transgenes, las diversas secuencias reguladoras, por ejemplo, promotores, potenciadores, regiones de conmutación de clase, secuencias donadoras de corte y empalme y aceptoras de corte y empalme para procesamiento de ARN, señales de recombinación y similares, comprenden secuencias correspondientes derivadas del ADN heterólogo. Tales secuencias reguladoras pueden incorporarse en el transgén a partir de la misma especie o una relacionada del animal no humano usado en la divulgación. Por ejemplo, pueden combinarse segmentos génicos de inmunoglobulina humana en un transgén con una secuencia potenciadora de inmunoglobulina de roedor para su uso en un ratón transgénico. Como alternativa, pueden incorporarse secuencias reguladoras sintéticas en el transgén, en el que tales secuencias reguladoras sintéticas no son homólogas de una secuencia de ADN funcional que se sabe que aparece de forma natural en los genomas de mamíferos. Las secuencias reguladoras sintéticas se diseñan de acuerdo con reglas de consenso, tales como, por ejemplo, las que especifican las secuencias permisibles de un sitio aceptor de corte y empalme o un motivo de promotor/potenciador. Por ejemplo, un mini-locus comprende una parte del locus genómico de inmunoglobulina que tiene al menos una delección interna (es decir, no en un extremo de la parte) de una parte de ADN no esencial (por ejemplo, secuencia intermedia; intrón o parte de la misma) en comparación con el locus de Ig de línea germinal de origen natural.

Los animales no humanos transgénicos y transcromosómicos preferidos, por ejemplo, ratones, mostrarán producción de inmunoglobulina con un repertorio significativo, idealmente sustancialmente similar al de un ser humano después de ajustar el volumen.

El repertorio idealmente se aproximará al mostrado en un ser humano cuando se ajusta con respecto a volumen, habitualmente con una diversidad de al menos aproximadamente 10 % más, preferiblemente 25 a 50 % o más. Generalmente, se producirán al menos aproximadamente mil inmunoglobulinas diferentes (idealmente IgG), preferiblemente 10^4 a 10^6 o más, dependiendo del número de regiones V, J y D diferentes introducidas en el genoma de ratón y conducidas por la diversidad adicional generada por adiciones de nucleótidos aleatorios de reordenamiento de segmentos génicos V(-D-)J en las regiones de unión. Típicamente, las inmunoglobulinas mostrarán una afinidad (K_D) con antígenos preseleccionados por debajo de 10^{-7} M, tal como por debajo de 10^{-8} M, 10^{-9} M o 10^{-10} M o incluso más bajas.

Los animales no humanos transgénicos y transcromosómicos, por ejemplo, ratones, como se han descrito anteriormente pueden inmunizarse con, por ejemplo, células que expresan CD20. Como alternativa, los animales transgénicos pueden inmunizarse con ADN que codifica CD20 humano. Los animales producirán después linfocitos B que experimentan conmutación de clase mediante recombinación de conmutación (conmutación cis) y expresan inmunoglobulinas sensibles a CD20. Las inmunoglobulinas pueden ser anticuerpos humanos (también denominados "anticuerpos de secuencia humana"), en los que los polipéptidos de cadena pesada y ligera están codificados por secuencias transgénicas humanas, que pueden incluir secuencias derivadas por mutación somática y uniones recombinatorias de región V, así como secuencias codificadas en línea germinal; puede hacerse referencia a estos anticuerpos humanos como sustancialmente idénticos a una secuencia polipeptídica codificada por un segmento génico V_L y J_L o V_H , D_H y J_H humanos, incluso aunque puedan estar presentes otras secuencias de línea no germinal como resultado de mutación somática y uniones de recombinación V-J y V-D-J diferenciales. Las regiones variables de cada cadena de anticuerpo son típicamente al menos 80 por ciento similares a los segmentos génicos V, J y, en el caso de cadenas pesadas, D de línea germinal humanos; frecuentemente al menos 85 por ciento similares a las secuencias de línea germinal humana presentes en el transgén; con frecuencia 90 o 95 por ciento o más similares a secuencias de línea germinal humana presentes en el transgén. Sin embargo, puesto que se introducen secuencias no de línea germinal por mutación somática y unión de VJ y VDJ, los anticuerpos de secuencia humana frecuentemente tendrán algunas secuencias de región variable que no están codificadas por segmentos génicos V, D o J humanos como se encuentran en el transgén o los transgenes humanos en la línea germinal de los ratones. Típicamente, tales secuencias no de línea germinal (o posiciones de nucleótidos individuales) se agruparán en o cerca de las CDR, o en regiones en las que se sabe que se agrupan mutaciones somáticas.

Otro aspecto de la divulgación incluye linfocitos B derivados de animales transgénicos o transcromosómicos no humanos como se describe en este documento. Los linfocitos B pueden usarse para generar hibridomas que expresan anticuerpos monoclonales humanos que se unen con alta afinidad (por ejemplo, una constante de disociación en equilibrio (K_D) de menos de 10^{-7} M) con CD20 humano. Por lo tanto, en otra realización, la divulgación proporciona un hibridoma que produce un anticuerpo humano que tenga una afinidad (K_D) de menos de 10^{-7} M, tal como de menos de 10^{-8} M, 10^{-9} M, 10^{-10} M o incluso menos cuando se determina por análisis de scatchard de células que expresan CD20 usando un anticuerpo monoclonal marcado radiactivamente o por determinación de la concentración de unión semimáxima usando análisis de FACS.

En este documento el anticuerpo monoclonal comprende una cadena ligera de secuencia humana compuesta de (1) una región variable de cadena ligera que tiene una secuencia polipeptídica que es sustancialmente idéntica a una secuencia polipeptídica codificada por un segmento génico V_L humano y un segmento J_L humano y (2) una región constante de cadena ligera codificada por un segmento génico C_L humano; y una cadena pesada de secuencia humana compuesta por (1) una región variable de cadena pesada que tiene una secuencia polipeptídica que es sustancialmente idéntica a una secuencia polipeptídica codificada por un segmento génico V_H humano, una región D y un segmento J_H humano y (2) una región constante codificada por un segmento génico C_H humano.

El desarrollo de anticuerpos monoclonales humanos de alta afinidad frente a CD20 puede facilitarse por un método para expandir el repertorio de segmentos génicos de región variable humana en un animal no humano transgénico que tenga un genoma que comprenda un transgén de inmunoglobulina humano integrado, comprendiendo dicho método introducir en el genoma un transgén de gen V que comprende segmentos génicos de región V que no están presentes en dicho transgén de inmunoglobulina humana integrado. Con frecuencia, el transgén de región V es un cromosoma artificial de levadura que comprende una parte de una matriz de segmento génico V_H o V_L (V_K) humano, como pueden aparecer de forma natural en un genoma humano o como se pueden cortar y empalmar juntos de forma separada por métodos recombinantes, que pueden incluir segmentos génicos V fuera de servicio u omitidos. Con frecuencia al menos cinco o más segmentos génicos V funcionales están contenidos en el YAC. En esta variación, es posible realizar un animal transgénico producido por el método de expansión de repertorio de V, en el que el animal expresa una cadena de inmunoglobulina que comprende una secuencia de región variable codificada por un segmento génico de región V presente en el transgén de región V y una región C codificada en el transgén de Ig humana. Por medio del método de expansión de repertorio de V, pueden generarse animales transgénicos que tienen al menos 5 genes V distintos; así como animales que contienen al menos aproximadamente 24 genes V o más. Algunos segmentos génicos V pueden ser no funcionales (por ejemplo, pseudogenes y similares); estos segmentos pueden conservarse o pueden suprimirse de forma selectiva por métodos recombinantes disponibles para los expertos en la materia, si se desea.

Una vez que la línea germinal de ratón se ha modificado por ingeniería genética para contener un YAC funcional que tenga un repertorio de segmento V expandido, sustancialmente no presente en el transgén de Ig humano que contiene los fragmentos génicos J y C, el rasgo puede propagarse y reproducirse en otros contextos genéticos, incluyendo contextos en los que el YAC función que tiene un repertorio de segmento V expandido se reproduce en una línea germinal de animal no humano que tenga un transgén de Ig humano diferente. Pueden reproducirse múltiples YAC funcionales que tengan un repertorio de segmento V expandido en una línea germinal para actuar con un transgén de Ig humano (o múltiples transgenes de Ig humanos). Aunque se denominan en este documento transgenes YAC, tales transgenes cuando se integran en el genoma pueden carecer sustancialmente de secuencias de levadura, tales como secuencias requeridas para replicación autónoma en levadura; tales secuencias pueden retirarse opcionalmente por ingeniería genética (por ejemplo, digestión de restricción y electroforesis en gel de campo pulsado u otro método adecuado) después de que ya no sea necesaria la replicación en levadura (es decir, antes de introducción en una célula ES de ratón o procigoto de ratón). Los métodos para propagar el rasgo de expresión de inmunoglobulina de secuencia humana, incluyen criar un animal transgénico que tenga el transgén o los transgenes de Ig humanos, y opcionalmente también que tengan un YAC funcional que tenga un repertorio de segmento V expandido. Los segmentos génicos tanto V_H como V_L pueden estar presentes en el YAC. El animal transgénico puede criarse en cualquier contexto deseado por el facultativo, incluyendo contextos que albergan otros transgenes humanos, incluyendo transgenes de Ig humanos y/o transgenes que codifican otras proteínas de linfocitos humanos. La divulgación también proporciona una inmunoglobulina de secuencia humana de alta afinidad producida por un ratón transgénico que tenga un transgén de YAC de repertorio de región V expandido. Aunque lo anterior describe una realización preferida del animal transgénico de la divulgación, se contemplan otras realizaciones que se han clasificado en tres categorías:

- I. Animales transgénicos que contienen un transgén de inmunoglobulina de cadena ligera reordenada y pesada no reordenada;
- II. Animales transgénicos que contienen un transgén de inmunoglobulina de cadena ligera no reordenada y pesada no reordenada; y
- III. Animal transgénico que contiene transgén de inmunoglobulina de cadena ligera no reordenada y pesada reordenada.

De estas categorías de animal transgénico, el orden preferido de preferencia es como sigue $II > I > III$ cuando se han suprimido los genes de cadena ligera endógenos (o al menos el gen K) por recombinación homóloga (u otro método) y $I > II > III$ cuando los genes de cadena ligera endógenos no se han suprimido y deben dominarse por exclusión alélica.

III. Moléculas biespecíficas/multiespecíficas que se unen a CD20

En otra realización más de la divulgación, pueden derivatizarse anticuerpos monoclonales humanos para CD20 o ligarse a otra molécula funcional, por ejemplo, otro péptido o proteína (por ejemplo, un fragmento Fab') para generar una molécula biespecífica o multispecífica que se une a múltiples sitios de unión o epítopos diana. Por ejemplo, un anticuerpo de la divulgación puede ligarse funcionalmente (por ejemplo por acoplamiento químico, fusión genética, asociación no covalente o de otro modo) con una o más moléculas de unión adicionales, tales como otro anticuerpo, péptido o mimético de unión.

En consecuencia, la presente divulgación incluye moléculas biespecíficas y multispecíficas que comprenden al menos una primera especificidad de unión por CD20 y una segunda especificidad de unión para un segundo epítopo diana. En una realización particular de la divulgación, el segundo epítopo diana es un receptor de Fc, por ejemplo, $Fc\gamma RI$ humano (CD64) o un receptor de $Fc\alpha$ humano (CD89), o un receptor de linfocitos T, por ejemplo, CD3. Por lo tanto, la divulgación incluye moléculas biespecíficas y multispecíficas capaces de unirse tanto a células efectoras

que expresan Fc γ R, Fc α R o Fc ϵ R (por ejemplo, monocitos, macrófagos o células polimorfonucleares (PMN)) a como células diana que expresan CD20. Estas moléculas biespecíficas y multiespecíficas dirigen células que expresan CD20 diana a células efectora y, como los anticuerpos monoclonales humanos de la divulgación, desencadenan actividades de célula efectora mediadas por receptor de Fc, tales como fagocitosis de una célula que expresa CD20, citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC), liberación de citocinas o generación de anión superóxido.

Las moléculas biespecíficas y multiespecíficas de la divulgación pueden incluir adicionalmente una tercera especificidad de unión, además de una especificidad de unión anti-Fc y una especificidad de unión anti-CD20. En una realización, la tercera especificidad de unión es una parte antifactor de potenciación (EF), por ejemplo, una molécula que se une a una proteína de superficie implicada en la actividad citotóxica y por lo tanto aumenta la respuesta inmune contra la célula diana. La "parte antifactor de potenciación" puede ser un anticuerpo, fragmento de anticuerpo funcional o un ligando que se une a una molécula dada, por ejemplo, un antígeno o un receptor, y por lo tanto da como resultado una potenciación del efecto de los determinantes de unión para el receptor de Fc o antígeno de célula diana. La "parte antifactor de potenciación" puede unirse a un receptor de Fc o un antígeno de célula diana. Como alternativa, la parte antifactor de potenciación puede unirse a una entidad que es diferente de la entidad a la que se unen la primera y segunda especificidades de unión. Por ejemplo, la parte antifactor de potenciación puede unirse a un linfocito T citotóxico (por ejemplo, mediante CD2, CD3, CD8, CD28, CD4, CD40, ICAM-1 u otra célula inmune que dé como resultado una respuesta inmune aumentada contra la célula diana).

En una realización, las moléculas biespecíficas y multiespecíficas de la divulgación comprenden como una especificidad de unión al menos un anticuerpo, incluyendo, por ejemplo, un Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, o un Fv de cadena sencilla. El anticuerpo también puede ser un dímero de cadena ligera o cadena pesada, o cualquier fragmento mínimo del mismo tal como Fv o una construcción de cadena sencilla como se describe en Ladner *et al.* documento US 4.946.778. El anticuerpo también puede ser una proteína de fusión de inmunoglobulina de dominio de unión como se describe en los documentos US 2003/0118592 y US 2003/0133939.

En una realización las moléculas biespecíficas y multiespecíficas de la divulgación comprenden una especificidad de unión para un Fc γ R o un Fc α R presente en la superficie de una célula efectora y una segunda especificidad de unión para un antígeno de célula diana, por ejemplo, CD20.

En una realización, la especificidad de unión para un receptor de Fc se proporciona por un anticuerpo monoclonal humano, cuya unión no está bloqueada por inmunoglobulina G (IgG). Como se usa en este documento, la expresión "receptor de IgG" se refiere a cualquiera de los ocho genes de cadena γ localizados en el cromosoma 1. Estos genes codifican un total de doce isoformas de receptor transmembrana o soluble que se agrupan en tres clases de receptor de Fc γ : Fc γ RI (CD64), Fc γ RII (CD32), y Fc γ RIII (CD 16). En una realización preferida, el receptor de Fc γ es un Fc γ RI de alta afinidad humano.

La producción y caracterización de estos anticuerpos monoclonales preferidos se describe en Fanger *et al.* En el documento WO 88/00052 y en el documento US 4.954.617. Estos anticuerpos se unen a un epítipo de Fc γ RI, Fc γ RII o Fc γ RIII en un sitio que es distinto del sitio de unión a Fc γ del receptor y, por lo tanto, su unión no está bloqueada sustancialmente por niveles fisiológicos de IgG. Son anticuerpos anti-Fc γ RI específicos útiles en esta divulgación mAb 22, mAb 32, mAb 44, mAb 62 y mAb 197. En otras realizaciones, el anticuerpo anti-receptor de Fc γ es una forma humanizada del anticuerpo monoclonal 22 (H22). La producción y caracterización del anticuerpo H22 se describe en Graziano, R. F. *et al.* (1995) J. Immunol-155 (10): 4996-5002 y documento WO 94/10332. La línea celular productora de anticuerpo H22 se depositó en la Colección Americana de Cultivos tipo el 4 de noviembre de 1992 con la designación HA022CL1 y tiene el N° de acceso CRL 11177.

En otras realizaciones preferidas más, la especificidad de unión para un receptor Fc se proporciona por un anticuerpo que se une a un receptor de IgA humano, por ejemplo, un receptor de Fc-alfa (Fc α RI (CD89)), cuya unión preferiblemente no está bloqueada por inmunoglobulina A (IgA) humana. La expresión "receptor de IgA" pretende incluir el producto génico de un gen α (Fc α RI) localizado en el cromosoma 19. Se sabe que este gen codifica varias isoformas de transmembrana con corte y empalme alternativo de 55 a 110 kDa. Fc α RI (CD89) se expresa de forma constitutiva en monocitos/macrófagos, granulocitos eosinófilos y neutrófilos, pero no en poblaciones de células no efectoras. Fc α RI tiene afinidad media tanto para IgA1 como para IgA2, que aumenta tras exposición a citocinas tales como G-CSF o GM-CSF (Morton, H. C. *et al.* (1996) Critical Reviews in Immunology 16: 423-440). Se han descrito cuatro anticuerpos monoclonales específicos de Fc α RI, identificados como A3, A59, A62 y A77, que se unen a Fc α RI fuera del dominio de unión a ligando de IgA (Monteiro, R. C. *et al.* (1992) J. Immunol. 148: 1764).

Fc α RI y Fc γ RI son receptores desencadenantes preferidos para su uso en la divulgación debido a que (1) se expresan principalmente en células efectoras inmunes, por ejemplo, monocitos, PMN, macrófagos y células dendríticas; (2) se expresan a altos niveles (por ejemplo, 5.000-100.000 por célula); (3) son mediadores de actividades citotóxicas (por ejemplo, ADCC, fagocitosis); (4) median en la presentación antigénica potenciada de los antígenos, incluyendo autoantígenos, dirigidos a ellos.

En otra realización la molécula biespecífica está comprendida por dos anticuerpos monoclonales humanos de

acuerdo con la divulgación que tienen actividades funcionales complementarias, tales como un anticuerpo que actúa predominantemente induciendo CDC y el otro anticuerpo que actúa predominantemente induciendo apoptosis, por ejemplo, 2F2 en combinación con 11B8.

- 5 En otras realizaciones, las moléculas biespecíficas y multiespecíficas de la divulgación comprenden adicionalmente una especificidad de unión que reconoce, por ejemplo, se une a, un antígeno de célula diana, por ejemplo, CD20. En una realización preferida, la especificidad de unión se proporciona por un anticuerpo monoclonal humano de la presente divulgación.
- 10 Un “anticuerpo específico de célula efectora” como se usa en este documento se refiere a un anticuerpo o fragmento de anticuerpo funcional que se une al receptor de Fc de células efectoras. Los anticuerpos preferidos para su uso en la divulgación objeto se unen al receptor de Fc de células efectoras en un sitio que no está unido por inmunoglobulina endógena.
- 15 Como se usa en este documento, la expresión “célula efectora” se refiere a una célula inmune que está implicada en la fase efectora de una respuesta inmune, a diferencia de las fases cognitivas y de activación de una respuesta inmune. Las células inmunes ejemplares incluyen una célula de origen mieloide o linfoide, por ejemplo, linfocitos (por ejemplo, linfocitos B y linfocitos T incluyendo linfocitos T citolíticos (CTL)), linfocitos citolíticos, linfocitos citolíticos naturales, macrófagos, monocitos, eosinófilos, neutrófilos, células polimorfonucleares, granulocitos, mastocitos y basófilos. Algunas células efectoras expresan receptores de Fc específicos y llevan a cabo funciones inmunes específicas. En realizaciones preferidas, una célula efectora es capaz de inducir citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC), por ejemplo, un neutrófilo capaz de inducir ADCC. Por ejemplo, los monocitos, macrófagos, que expresan FcR están implicados en la destrucción específica de células diana y presentación de antígenos a otros componentes del sistema inmune, o unión a células que presentan antígenos. En otras realizaciones, una célula efectora puede fagocitar un antígeno diana, célula diana o microorganismo. La expresión de un FcR particular en una célula efectora puede regularse por factores humorales tales como citocinas. Por ejemplo, se ha descubierto que la expresión de Fc γ RI se regula positivamente por interferón gamma (BPN- γ). Esta expresión potenciada aumenta la actividad citotóxica de células que portan Fc γ RI contra dianas. Una célula efectora puede fagocitar o lisar un antígeno diana o una célula diana.
- 20
- 25
- 30 “Célula diana” significará cualquier célula no deseable en un sujeto (por ejemplo, una ser humano o animal) que pueda dirigirse por una composición (por ejemplo, un anticuerpo monoclonal humano, una molécula biespecífica o una multiespecífica) de la divulgación. En realizaciones preferidas, la célula diana es una célula que expresa o sobreexpresa CD20. Las células que expresan CD20 típicamente incluyen linfocitos B y tumores de linfocitos B.
- 35 Aunque se prefieren anticuerpos monoclonales humanos, otros anticuerpos que pueden emplearse en las moléculas biespecíficas o multiespecíficas de la divulgación son anticuerpos monoclonales murinos, quiméricos y humanizados. Tales anticuerpos monoclonales murinos, quiméricos y humanizados pueden prepararse por métodos conocidos en la técnica.
- 40 Pueden prepararse moléculas biespecíficas y multiespecíficas de la presente divulgación usando técnicas químicas (véase, por ejemplo, D. M. Kranz *et al.* (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 5807), técnicas de “polidoma” (Véase documento US. 4.474.893, de Reading) o técnicas de ADN recombinante.
- 45 En particular, pueden prepararse moléculas biespecíficas y multiespecíficas de la presente divulgación conjugando las especificidades de unión constituyentes, por ejemplo, las especificidades de unión anti-FcR y anti-CD20, usando métodos conocidos en la técnica y descritos en los ejemplos proporcionados en este documento. Por ejemplo, cada especificidad de unión de la molécula biespecífica y multiespecífica puede generarse de forma separada y después pueden conjugarse entre sí. Cuando las especificidades de unión son proteínas o péptidos, puede usarse una diversidad de agentes de acoplamiento o entrecruzamiento para conjugación covalente. Los ejemplos de agentes de entrecruzamiento incluyen proteína A, carbodiimida, N-succinimidil-S-acetiltoacetato (SATA), ácido 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoico) (DTNB), o-fenilendimaleimida (oPDM), N-succinimidil-3-(2-piridilditio)propionato (SPDP), y sulfosuccinimidil 4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato (sulfo-SMCC) (véase por ejemplo, Karpovsky *et al.* (1984) J. Exp. Med. 160: 1686; Liu, MA *et al.* (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 8648). Otros métodos incluyen los descritos por Paulus (Behring Ins. Mitt. (1985) N° 78, 118-132); Brennan *et al.* (Science (1985) 229: 81-83), y Glennie *et al.* (J. Immunol. (1987) 139: 2367-2375). Son agentes de conjugación preferidos SATA y sulfo-SMCC, ambos disponibles de Pierce Chemical Co. (Rockford, IL).
- 50
- 55 Cuando las especificidades de unión son anticuerpos, estos pueden conjugarse mediante enlace de sulfhidrilo de las regiones bisagra C terminales de las dos cadenas pesadas. En una realización particularmente preferida, la región bisagra se modifica para contener un número impar de restos sulfhidrilo, preferiblemente uno, antes de la conjugación.
- 60 Como alternativa, ambas especificidades de unión pueden codificarse en el mismo vector y expresarse y ensamblarse en la misma célula hospedadora. Este método es particularmente útil cuando la molécula biespecífica y multiespecífica es una proteína de fusión mAb x mAb, mAb x Fab, Fab x F(ab')₂ o ligando x Fab. Una molécula
- 65

- biespecífica y multiespecífica de la invención, por ejemplo, una molécula biespecífica puede ser una molécula de cadena sencilla, tal como un anticuerpo biespecífico de cadena sencilla, una molécula biespecífica de cadena sencilla que comprende un anticuerpo de cadena sencilla y un determinante de unión, o una molécula biespecífica de cadena sencilla que comprende dos determinantes de unión. Las moléculas biespecíficas y multiespecíficas también pueden ser molécula de cadena sencilla o pueden comprender al menos dos moléculas de cadena sencilla. Se describen métodos para preparar moléculas biespecíficas y multiespecíficas por ejemplo en los documentos US 5.260.203; US 5.455.030; US 4.881.175; US 5.132.405; US 5.091.513; US 5.476.786; US 5.013.653; US 5.258.498; y US 5.482.858.
- La unión de las moléculas biespecíficas y multiespecíficas con sus dianas específicas puede confirmarse por ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA), un radioinmunoensayo (RIA), análisis de FACS, un bioensayo (por ejemplo, inhibición del crecimiento) o un Ensayo de Transferencia de Western. Cada uno de estos ensayos generalmente detecta la presencia de complejos proteína-anticuerpo de interés particular empleando un reactivo marcado (por ejemplo, un anticuerpo) específico para el complejo de interés. Por ejemplo, los complejos de anticuerpo-FcR pueden detectarse usando, por ejemplo, un anticuerpo ligado a enzima o fragmento de anticuerpo que reconoce y se une específicamente a los complejos de anticuerpo-FcR. Como alternativa, los complejos pueden detectarse usando cualquiera de una diversidad de otros inmunoensayos. Por ejemplo, el anticuerpo puede marcarse radiactivamente y usarse en un radioinmunoensayo (RIA) (véase, por ejemplo, Weintraub, B., Principles of Radioimmunoassays, Seventh Training Course on Radioligand Assay Techniques, The Endocrine Society, marzo, 1986). El isótopo radiactivo puede detectarse por tales medios como el uso de un contador γ o un contador de centelleo o por autorradiografía.

IV. Inmunoconjugados

- En otro aspecto, la presente divulgación presenta un anticuerpo monoclonal anti-CD20 humano conjugado con un resto terapéutico, tal como una citotoxina, un fármaco (por ejemplo, un inmunosupresor) o un radioisótopo. Tales conjugados se denominan en este documento "inmunoconjugados". Los inmunoconjugados que incluyen una o más citotoxinas se denominan "inmunotoxinas". Una citotoxina o agente citotóxico incluye cualquier agente que sea perjudicial para (por ejemplo, destruya) células. Los ejemplos incluyen taxol, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorrubicina, dihidroxi antracina diona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-deshidrotestosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propanolol y puomicina y análogos u homólogos de los mismos.

- Los agentes terapéuticos adecuados para formar inmunoconjugados de la divulgación incluyen, pero sin limitación, antimetabolitos (por ejemplo, metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, fludarabina, 5-fluorouracil dacarbazina), agentes alquilantes (por ejemplo, mecloretamina, tiotepa clorambucilo, melfalán, carmustina (BSNU) y lomustina (CCNU), ciclofosfamida, busulfán, dibromomanitol, estreptoizotocina, mitomicina C y cis-diclorodiamin platino (II) (DDP) cisplatino), antraciclina (por ejemplo, daunorrubicina (anteriormente daunomicina) y doxorubicina), antibióticos (por ejemplo, dactinomicina (anteriormente actinomicina), bleomicina, mitramicina y antramicina (AMC)) y agentes antimitóticos (por ejemplo, vincristina y vinblastina). En una realización preferida, el agente terapéutico es un agente citotóxico o un agente radiotóxico. En otra realización, el agente terapéutico es un inmunosupresor. En otra realización más, el agente terapéutico es GM-CSF. En una realización preferida, el agente terapéutico es doxorubicina, cisplatino, bleomicina, sulfato, carmustina, clorambucilo, ciclofosfamida o ricina A.

- Los anticuerpos de la presente divulgación también pueden conjugarse con un radioisótopo, por ejemplo, yodo-131, itrio-90 o indio-111, para generar agentes radiofarmacéuticos citotóxicos para tratar un trastorno relacionado con CD20, tal como un cáncer. Los conjugados de anticuerpos de la divulgación pueden usarse para modificar una respuesta biológica dada, y el resto farmacológico no debe interpretarse como limitado a agentes terapéuticos químicos clásicos. Por ejemplo, el resto farmacológico puede ser una proteína o polipéptido que posea una actividad biológica deseada. Tales proteínas pueden incluir, por ejemplo, una toxina enzimáticamente activa, o fragmento activo de la misma, tal como abrina, ricina A, exotoxina de *Pseudomonas* o toxina diftérica; una proteína tal como un factor de necrosis tumoral o interferón γ ; o modificadores de respuesta biológica tales como, por ejemplo, linfocinas, interleucina-1 ("IL-1"), interleucina-2 ("IL-2"), interleucina-6 ("IL-6"), factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos ("GM-CSF"), factor estimulante de colonias de granulocitos ("G-CSF"), u otros factores de crecimiento.

- Se conocen bien técnicas para conjugar tal resto terapéutico con anticuerpos, véase, por ejemplo, Arnon *et al.*, "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", en *Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy*, Reisfeld *et al.* (eds.), pp. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom *et al.*, "Antibodies For Drug Delivery", en *Controlled Drug Delivery* (2ª Ed.), Robinson *et al.* (eds.), pp. 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", en *Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications*, Pinchera *et al.* (eds.), pp. 475-506 (1985); "Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy", en *Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy*, Baldwin *et al.* (eds.), pp. 303-16 (Academic Press 1985), y Thorpe *et al.*, "The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates", *Immunol. Rev.*, 62: 119-58 (1982).

- En una realización adicional, los anticuerpos monoclonales humanos de acuerdo con la divulgación se unen a un

enlazador-quelante, por ejemplo, tiuxetan, que permite al anticuerpo conjugarse con un radioisótopo.

V. Composiciones farmacéuticas

- 5 En otro aspecto, la presente divulgación proporciona una composición, por ejemplo, una composición farmacéutica, que contiene uno o una combinación de anticuerpos monoclonales humanos de la presente divulgación. Las composiciones farmacéuticas pueden formularse con vehículos o diluyentes farmacéuticamente aceptables así como cualquier otro adyuvante y excipiente conocido de acuerdo con técnicas convencionales tales como las descritas en Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19ª Edición, Gennaro, Ed., Mack Publishing Co., Easton, PA, 1995. En una realización, las composiciones incluyen una combinación de múltiples anticuerpos humanos aislados (por ejemplo, dos o más) de la divulgación que actúan por diferentes mecanismos, por ejemplo, un anticuerpo que actúa predominantemente induciendo CDC en combinación con otro anticuerpo que actúa predominantemente induciendo apoptosis.
- 10
- 15 También pueden administrarse composiciones farmacéuticas de la divulgación en terapia de combinación, es decir, combinadas con otros agentes. Por ejemplo, la terapia de combinación puede incluir una composición de la presente divulgación con al menos un agente antiinflamatorio o al menos un agente inmunosupresor. En una realización tales agentes terapéuticos incluyen uno o más agentes antiinflamatorios, tales como un fármaco esteroideo o un AINE (fármaco antiinflamatorio no esteroideo). Los agentes preferidos incluyen, por ejemplo, aspirina y otros salicilatos, inhibidores de Cox-2, tales como rofecoxib (Vioxx) y celecoxib (Celebrex), AINE tales como ibuprofeno (Motrin, Advil), fenoprofeno (Nalfon), naproxeno (Naprosyn), sulindac (Clinoril), diclofenaco (Voltaren), piroxicam (Feldene), ketoprofeno (Orudis), diflunisal (Dolobid), nabumetona (Relafen), etodolac (Lodine), oxaprozina (Daypro) e indometacina (Indocin).
- 20
- 25 En otra realización, tales agentes terapéuticos incluyen uno o más FARME, tales como metotrexato (Rheumatrex), hidroxicloroquina (Plaquenil), sulfasalazina (Asulfidine), inhibidores de síntesis de pirimidina, por ejemplo, leflunomide (Arava), agentes de bloqueo del receptor de IL-1, por ejemplo, anakinra (Kineret) y agentes de bloqueo de TNF- α , por ejemplo, etanercept (Enbrel), infliximab (Remicade) y adalimumab.
- 30 En otra realización, tales agentes terapéuticos incluyen uno o más agentes inmunosupresores, tales como ciclosporina (Sandimmune, Neoral) y azatioprina (Imural).
- En otra realización más, tales agentes terapéuticos incluyen uno o más agentes quimioterapéuticos, tales como doxorubicina (Adriamycin), cisplatino (Platinol), bleomicina (Blenoxane), carmustina (Gliadel), ciclofosfamida (Cytoxan, Procytox, Neosar) y clorambucilo (Leukeran).
- 35
- En otra realización, los anticuerpos humanos de la presente divulgación pueden administrarse en combinación con clorambucilo y prednisolona; ciclofosfamida y prednisolona; ciclofosfamida, vincristina y prednisona; ciclofosfamida, vincristina, doxorubicina y prednisona; fludarabina y antraciclina; o en combinación con otros regímenes multifármacos habituales para NHL, tal como se describe, por ejemplo, en Non-Hodgkin's Lymphomas: Making sense of Diagnosis, Treatment, and Options, Lorraine Johnston, 1999, O'Reilly and Associates, Inc.
- 40
- En otra realización más, los anticuerpos humanos pueden administrarse junto con radioterapia y/o trasplante de células madre periféricas autólogas o médula ósea.
- 45
- En otra realización más, los anticuerpos humanos pueden administrarse en combinación con uno o más anticuerpos seleccionados de anticuerpos anti-CD25, anticuerpos anti-CD19, anticuerpos anti-CD21, anticuerpos anti-CD22, anticuerpos anti-CD37, anticuerpos anti-CD38, anticuerpos anti-IL6R, anticuerpos anti-IL8, anticuerpos anti-IL15, anticuerpos anti-IL15R, anticuerpos anti-CD4, anticuerpos anti-CD11a (por ejemplo, efalizumab), anticuerpos anti-integrina alfa-4/beta-1 (VLA4) (por ejemplo, natalizumab) y CTLA4-Ig.
- 50
- En una realización particular, los anticuerpos monoclonales humanos se administran en combinación con un anticuerpo anti-CD25 para el tratamiento de penfigoide ampollar, por ejemplo, en pacientes con enfermedad de injerto contra hospedador.
- 55
- En otra realización particular, los anticuerpos monoclonales humanos se administran en combinación con uno o más anticuerpos seleccionados de anticuerpos anti-CD19, anticuerpos anti-CD21, anticuerpos anti-CD22, anticuerpos anti-CD37 y anticuerpos anti-CD38 para el tratamiento de enfermedades malignas.
- 60
- En otra realización particular más, los anticuerpos humanos se administran en combinación con uno o más anticuerpos seleccionados de anticuerpos anti-IL6R, anticuerpos anti-IL8, anticuerpos anti-IL15, anticuerpos anti-IL15R, anticuerpos anti-CD4, anticuerpos anti-CD11a (por ejemplo, efalizumab), anticuerpos anti-integrina alfa-4/beta-1 (VLA4) (por ejemplo natalizumab), y CTLA4-Ig para el tratamiento de enfermedades inflamatorias.
- 65
- En una realización adicional más, los anticuerpos humanos pueden administrarse en combinación con un anticuerpo anti-C3b(i) para potenciar la activación del complemento.

- Como se usa en este documento, "vehículo farmacéuticamente aceptable" incluye todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, recubrimiento, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes retardantes de la absorción e isotónicos, y similares que sean fisiológicamente compatibles. Preferiblemente, el vehículo es adecuado para administración intravenosa, intramuscular, subcutánea, parenteral, espinal o epidérmica (por ejemplo, por inyección o infusión). Dependiendo de la vía de administración, el compuesto activo, es decir, anticuerpo, molécula biespecífica y multiespecífica, puede aplicarse por recubrimiento en un material para proteger el compuesto de la acción de ácidos y otras condiciones naturales que puedan inactivar el compuesto.
- Una "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a una sal que conserva la actividad biológica deseada del compuesto precursor y no transmite ningún efecto toxicológico no deseado (véase por ejemplo, Berge, S. M., *et al.* (1977) *J. Pharm. Sci.* 66: 1-19). Los ejemplos de tales sales incluyen sales de adición de ácidos y sales de adición de bases. Las sales de adición de ácidos incluyen las derivadas de ácidos inorgánicos no tóxicos, tales como clorhídrico, nítrico, fosfórico, sulfúrico, bromhídrico, yodhídrico, fosforoso y similares, así como ácidos orgánicos no tóxicos tales como ácidos alifáticos mono y dicarboxílicos, ácidos alcanóicos fenil sustituidos, ácidos hidroalcanóicos, ácidos aromáticos, ácidos alifáticos y aromáticos sulfónicos y similares. Las sales de adición de bases incluyen las derivadas de metales alcalinotérreos, tales como sodio, potasio, magnesio, calcio y similares, así como de aminas orgánicas no tóxicas, tales como N,N'-dibenciletildiamina, N-metilglucamina, clorprocaína, colina, dietanolamina, etilendiamina, procaína y similares.
- Una composición de la presente divulgación puede administrarse por una diversidad de métodos conocidos en la técnica. Como se apreciará por el experto en la materia, la vía y/o modo de administración variará dependiendo de los resultados deseados. Los compuestos activos pueden prepararse con vehículos que protegerán el compuesto contra liberación rápida, tal como una formulación de liberación controlada, incluyendo implantes, parches transdérmicos y sistemas de suministro microencapsulados. Pueden usarse polímeros biodegradables, biocompatibles, tales como etilen vinil acetato, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres y ácido poliláctico. Generalmente se conocen por los expertos en la materia métodos para preparación de tales formulaciones. Véase, por ejemplo, *Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems*, J. R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1978.
- Para administrar un compuesto de la divulgación por ciertas vías de administración, puede ser necesario recubrir el compuesto, o coadministrar el compuesto, con un material para evitar su inactivación. Por ejemplo, el compuesto puede administrarse a un sujeto en un vehículo apropiado, por ejemplo, liposomas, o un diluyente. Los diluyentes farmacéuticamente aceptables incluyen solución salina y soluciones de tampón acuoso. Los liposomas incluyen emulsiones CGF de agua en aceite en agua así como liposomas convencionales (Strejan *et al.* (1984) *J. Neuroimmunol.* 7: 27).
- Los vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. Se conoce en la técnica el uso de tales medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas. Excepto en la medida en que cualquier medio o agente convencional es incompatible con el compuesto activo, se contempla uso del mismo en las composiciones farmacéuticas de la invención. También pueden incorporarse compuestos complementarios activos en las composiciones.
- Las composiciones terapéuticas típicamente deben ser estériles y estables en las condiciones de fabricación y almacenamiento. Las composiciones pueden formularse como una solución, microemulsión, liposoma u otra estructura ordenada adecuada para alta concentración de fármaco. El vehículo puede ser un disolvente o medio de dispersión, que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido y similares) y mezclas adecuadas de los mismos. La fluidez apropiada puede mantenerse, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersión y mediante el uso de tensioactivos. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol o cloruro sódico en la composición. Puede ocasionarse absorción prolongada de las composiciones inyectables incluyendo en la composición un agente que retarde la absorción, por ejemplo, sales de monoestearato y gelatina.
- Pueden prepararse soluciones inyectables estériles incorporando el compuesto activo en la cantidad requerida en un disolvente apropiado con uno o una combinación de ingredientes enumerados anteriormente, según se requiera, seguido de esterilización por microfiltración. Generalmente, se preparan dispersiones incorporando el compuesto activo en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos preferidos de preparación son secado en vacío y secado por congelación (liofilización) que producen un polvo del principio activo más cualquier ingrediente deseado adicional de una solución previamente esterilizada por filtración del mismo.
- Los regímenes de dosificación se ajustan para proporcionar la respuesta deseada óptima (por ejemplo, una respuesta terapéutica). Por ejemplo, puede administrarse una embolada sencilla, pueden administrarse varias dosis

divididas a lo largo del tiempo o la dosis puede reducirse o aumentarse proporcionalmente según se indique por las exigencias de la situación terapéutica. Es especialmente ventajoso formular composiciones parenterales en forma de dosificación unitaria para facilitar administración y uniformidad de dosificación. La forma de dosificación unitaria como se usa en este documento se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias para los sujetos a tratar; cada unidad contiene una cantidad predeterminada de compuesto activo que se calcula que produce el efecto terapéutico deseado en asociación con el vehículo farmacéutico requerido. La especificación para las formas de dosificación unitarias de la divulgación se dicta por y depende directamente de (a) las características únicas del compuesto activo y el efecto terapéutico particular a conseguir y (b) las limitaciones inherentes en la técnica de la formación de compuestos tales como un compuesto activo para el tratamiento de sensibilidad en individuos.

Los ejemplos de antioxidantes farmacéuticamente aceptables incluyen: (1) antioxidantes solubles en agua, tales como ácido ascórbico, clorhidrato de cisteína, bisulfato sódico, metabisulfito sódico, sulfito sódico y similares; (2) antioxidantes solubles en aceite, tales como ascorbil palmitato, hidroxianisol butilado (BHA), hidroxitolueno butilado (BHT), lecitina, propilgalato, alfa tocoferol y similares, y (3) agentes quelantes metálicos tales como ácido cítrico, ácido etilendiamin tetraacético (EDTA), sorbitol, ácido tartárico, ácido fosfórico y similares.

Para las composiciones terapéuticas, las formulaciones de la presente divulgación incluyen las adecuadas para administración oral, nasal, tópica (incluyendo bucal y sublingual) rectal, vaginal y/o parenteral. Las formulaciones pueden presentarse convenientemente en forma de dosificación unitaria y pueden prepararse por cualquier método conocido en la técnica de la farmacia. La cantidad de principio activo que puede combinarse con un material vehículo para producir una forma de dosificación sencilla variará dependiendo del sujeto que se trata, y el modo particular de administración. La cantidad de principio activo que puede combinarse con un material vehículo para producir una forma de dosificación sencilla generalmente será la cantidad de la composición que produzca un efecto terapéutico. Generalmente, de cien por cien, esta cantidad variará de aproximadamente 0,01 por ciento a aproximadamente noventa y nueve por ciento de principio activo, preferiblemente de aproximadamente 0,1 por ciento a aproximadamente 70 por ciento, más preferiblemente de aproximadamente 1 por ciento a aproximadamente 30 por ciento.

Las formulaciones de la presente divulgación que son adecuadas para administración vaginal también incluyen pesarios, tampones, cremas, geles, pastas, espumas o formulaciones de pulverización que contienen los vehículos que se conoce en la técnica que son apropiados. Las formas de dosificación para la administración tópica o transdérmica de composiciones de la presente divulgación incluyen polvos, pulverizaciones, pomadas, pastas, cremas, lociones, geles, soluciones, parches e inhalantes. El compuesto activo puede mezclarse en condiciones estériles con un vehículo farmacéuticamente aceptable y con cualquier conservante, tampón o propulsor que pueda requerirse.

Las frases "administración parenteral" y "administrado por vía parenteral" como se usa en este documento significan modos de administración distintos de administración entérica y tópica, habitualmente por inyección, e incluyen, sin limitación, inyección e infusión intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardiaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoidea, intraespinal, epidural e intraesternal.

Los ejemplos de vehículos acuosos y no acuosos adecuados que pueden emplearse en las composiciones farmacéuticas de la divulgación incluyen agua, etanol, polioles (tales como glicerol, propilenglicol, polietilenglicol y similares) y mezclas adecuadas de los mismos, aceites vegetales, tales como aceite de oliva, y ésteres orgánicos inyectables, tales como etil oleato. Puede mantenerse una fluidez apropiada, por ejemplo, mediante el uso de materiales de recubrimiento, tales como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersiones y mediante el uso de tensioactivos.

Estas composiciones también pueden contener adyuvantes tales como conservantes, agentes humectantes, agentes emulsionantes y agentes de dispersión. Puede asegurarse la prevención de presencia de microorganismos tanto por procedimientos de esterilización, véase anteriormente, como por la inclusión de diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabeno, clorobutanol, fenol, ácido sórbico y similares. También puede ser deseable incluir agentes isotónicos, tales como azúcares, cloruro sódico y similares en las composiciones. Además, puede producirse absorción prolongada de la forma farmacéutica inyectable mediante la inclusión de agentes que retardan la absorción tales como monoestearato de aluminio y gelatina.

En una realización los anticuerpos monoclonales humanos de la divulgación se administran en forma cristalina por inyección subcutánea, consúltese Yang *et al.* (2003) PNAS, 100(12): 6934-6939

Cuando los compuestos de la presente divulgación se administran como agentes farmacéuticos a seres humanos y animales, pueden proporcionarse solos o como una composición farmacéutica que contiene, por ejemplo, de 0,01 a 99,5 % (más preferiblemente, 0,1 a 90 %) de principio activo en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Independientemente de la vía de administración seleccionada, los compuestos de la presente divulgación, que pueden usarse en una forma hidratada adecuada, y/o las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación, se formulan en formas de dosificación farmacéuticamente aceptables por métodos convencionales conocidos por los expertos en la materia.

5 Los niveles de dosificación reales de los principios activos en las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación pueden variarse para obtener una cantidad de principio activo que es eficaz para conseguir la respuesta terapéutica deseada para un paciente, composición y modo de administración particulares sin ser tóxico para el paciente. El nivel de dosificación seleccionado dependerá de una diversidad de factores farmacocinéticos incluyendo la actividad de las composiciones particulares de la presente divulgación empleadas, o el éster, sal o amida de las mismas, las vías de administración, el momento de administración, la tasa de excreción del compuesto particular que se emplea, la duración del tratamiento, otros fármacos, compuestos y/o materiales usados en combinación con las composiciones particulares empleadas, la edad, sexo, peso, condición, salud general e historial médico anterior del paciente que se trata y factores similares bien conocidos en la técnica médica.

15 Un médico o veterinario que tenga experiencia habitual en la técnica puede determinar fácilmente y prescribir la cantidad eficaz de la composición farmacéutica requerida. Por ejemplo, el médico o veterinario podría iniciar dosis de los compuestos de la divulgación empleados en la composición farmacéutica a niveles más bajos que los requeridos para conseguir el efecto terapéutico deseado y aumentar gradualmente la dosificación hasta que se consiga el efecto deseado. En general, una dosis diaria adecuada de la composición de la divulgación será la cantidad del compuesto que sea la dosis más baja eficaz para producir un efecto terapéutico. Una dosis eficaz tal dependerá generalmente de los factores descritos anteriormente. Se prefiere que la administración sea intravenosa, intramuscular, intraperitoneal o subcutánea, preferiblemente administrada cerca del sitio de la diana. Si se desea, la dosis diaria eficaz de una composición terapéutica puede administrarse como dos, tres, cuatro, cinco, seis o más subdosis administradas de forma separada a intervalos apropiados a lo largo del día, opcionalmente, en formas de dosificación unitarias. Aunque es posible administrar un compuesto de la presente divulgación solo, es preferible administrar el compuesto como una formulación farmacéutica (composición).

30 En una realización, los anticuerpos monoclonales humanos de acuerdo con la divulgación pueden administrarse por infusión en una dosificación semanal de 10 a 500 mg/m², tal como 200 a 400 mg/m². Tal administración puede repetirse, por ejemplo, de 1 a 8 veces, tal como de 3 a 5 veces. La administración puede realizarse por infusión continua durante un periodo de 2 a 24 horas, tal como de 2 a 12 horas.

35 En otra realización, los anticuerpos monoclonales humanos se administran por infusión continua lenta durante un periodo largo, tal como más de 24 horas, para reducir efectos secundarios tóxicos.

40 En otra realización más los anticuerpos monoclonales humanos se administran en una dosificación semanal de 250 mg a 2000 mg, tal como por ejemplo 300 mg, 500 mg, 700 mg, 1000 mg, 1500 mg o 2000 mg, hasta 8 veces, tal como de 4 a 6 veces. La administración puede realizarse por infusión continua durante un periodo de 2 a 24 horas, tal como de 2 a 12 horas. Dicho régimen puede repetirse una o más veces según sea necesario, por ejemplo, después de 6 meses o 12 meses. La dosificación puede determinarse o ajustarse midiendo la cantidad de anticuerpos anti-CD20 monoclonales en circulación tras administración en una muestra biológica usando anticuerpos antiidiotípicos que se dirigen a los anticuerpos anti-CD20.

45 En otra realización más, los anticuerpos monoclonales humanos se administran por terapia de mantenimiento, tal como, por ejemplo, una vez a la semana durante un periodo de 6 meses o más.

50 En otra realización más, los anticuerpos monoclonales humanos de acuerdo con la divulgación pueden administrarse por un régimen que incluye una infusión de un anticuerpo monoclonal humano contra CD20 seguido de una infusión de un anticuerpo monoclonal humano contra CD20 conjugado con un radioisótopo. El régimen puede repetirse, por ejemplo, de 7 a 9 días después.

55 Las composiciones terapéuticas pueden administrarse con dispositivos médicos conocidos en la técnica. Por ejemplo, en una realización preferida, una composición terapéutica de la divulgación puede administrarse con un dispositivo de inyección hipodérmica sin aguja, tal como los dispositivos desvelados en los documentos US 5.399.163; US 5.383.851; US 5.312.335; US 5.064.413; US 4.941.880; US 4.790.824; o US 4.596.556. Los ejemplos de implantes y módulos bien conocidos útiles en la presente divulgación incluyen: documento US 4.487.603, que describe una bomba de microinfusión implantable para distribuir medicación a una tasa controlada; documento US 4.486.194, que describe un dispositivo terapéutico para administrar medicamentos a través de la piel; documento US 4.447.233, que describe una bomba de infusión de medicación para suministrar medicación a una tasa de infusión precisa; documento US 4.447.224, que describe un aparato de infusión implantable de flujo variable para suministro farmacológico continuo; documento US 4.439.196, que describe un sistema de suministro farmacológico osmótico que tiene compartimentos de multicámaras; y documento US 4.475.196, que describe un sistema de suministro farmacológico osmótico. Muchos otros implantes, sistemas de suministro y módulos tales se conocen por los expertos en la materia.

65

En ciertas realizaciones, los anticuerpos monoclonales humanos de la divulgación pueden formularse para asegurar distribución apropiada *in vivo*. Por ejemplo, la barrera hematoencefálica (BBB) excluye muchos compuestos altamente hidrófilos. Para asegurar que los compuestos terapéuticos de la divulgación cruzan la BBB (si se desea), estos pueden formularse, por ejemplo, en liposomas. Para métodos de fabricación de liposomas, véase, por ejemplo, documentos US 4.522.811; US 5.374.548; y US 5.399.331. Los liposomas pueden comprender uno o más restos que se transportan de forma selectiva a células u órganos específicos, potencian de este modo el suministro de fármacos dirigido (véase, por ejemplo, V. V. Ranade (1989) *J. Clin. Pharmacol.* 29: 685). Los restos de dirección ejemplares incluyen folato o biotina (véase, por ejemplo, documento US 5.416.016 de Low *et al.*); manósidos (Umezawa *et al.*, (1988) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 153: 1038); anticuerpos (P. G. Bloeman *et al.* (1995) *FEBS Lett.* 357: 140; M. Owais *et al.* (1995) *Antimicrob. Agents Chemother.* 39: 180); receptor de proteína A tensoactivo (Briscoe *et al.* (1995) *Am. J. Physiol.* 1233: 134), diferentes especies de los cuales pueden comprender las formulaciones de la invención, así como componentes de las moléculas inventadas; p120 (Schreier *et al.* (1994) *J. Biol. Chem.* 269: 9090); véase también K. Keinanen; M. L. Laukkanen (1994) *FEBS Lett.* 346: 123; J. J. Killion; I. J. Fidler (1994) *Immunomethods* 4: 273. En una realización de la invención, los compuestos terapéuticos de la invención se formulan en liposomas; en una realización más preferida, los liposomas incluyen un resto de dirección. En una realización más preferida, los compuestos terapéuticos en los liposomas se suministran por inyección de embolada a un sitio próximo el área deseada, por ejemplo, el sitio de inflamación o infección, o el sitio de un tumor. La composición debe ser fluida hasta el punto de que exista fácil inyectabilidad. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y debe conservarse contra la acción contaminante de microorganismos tales como bacterias y hongos.

En una realización adicional, pueden formularse anticuerpos monoclonales humanos de la divulgación para prevenir o reducir su transporte a través de la placenta. Esto puede realizarse por métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, por PEGilación de los anticuerpos o mediante el uso de fragmentos F(ab)₂'. Pueden hacerse referencias adicionales a "Cunningham-Rundles C, Zhuo Z, Griffith B, Keenan J. (1992) Biological activities of polyethylene-glycol immunoglobulin conjugates. Resistance to enzymatic degradation. *J Immunol Methods.* 152: 177-190; y a "Landor M. (1995) Maternal-fetal transfer of immunoglobulins, *Ann Allergy Asthma Immunol* 74: 279-283. Esto es particularmente relevante cuando los anticuerpos se usan para tratar o prevenir aborto espontáneo recurrente.

Una "dosificación terapéuticamente eficaz" para terapia tumoral puede medirse por respuestas tumorales objetivas que pueden ser completas o parciales. Una respuesta completa (RC) se define como sin pruebas clínicas, radiológicas u otras de enfermedad. Una respuesta parcial (RP) resulta de una reducción del tamaño tumoral agregado de más del 50 %. La mediana del tiempo a la progresión es una medida que caracteriza la durabilidad de la respuesta tumoral objetivo.

Una "dosificación terapéuticamente eficaz" para terapia tumoral también puede medirse por su capacidad para estabilizar la progresión de enfermedad. La capacidad de un compuesto para inhibir cáncer puede evaluarse en un sistema de modelo animal que predice la eficacia en tumores humanos. Como alternativa, esta propiedad de una composición puede evaluarse examinando la capacidad del compuesto para inhibir el crecimiento celular o apoptosis por ensayos *in vitro* conocidos por los expertos en la materia. Una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto terapéutico puede reducir el tamaño del tumor, o aliviar de otro modo los síntomas en un sujeto. Un experto en la materia sería capaz de determinar tales cantidades basándose en tales factores como el tamaño del sujeto, la gravedad de los síntomas del sujeto y la composición particular o vía de administración seleccionada.

Una "dosificación terapéuticamente eficaz" para artritis reumatoide preferiblemente dará como resultado una Definición Preliminar de Mejoría ACR20 en los pacientes, más preferiblemente una Definición Preliminar de Mejoría ACR50 y aún más preferiblemente una Definición Preliminar de Mejoría ARC70.

La Definición Preliminar de Mejoría ACR20 se define como: ≥ 20 % de mejoría en: Recuento de Articulaciones Doloridas (TCJ) y Recuento de Articulaciones Hinchadas (SWJ) y ≥ 20 % de mejoría en 3 de las siguientes 5 evaluaciones: Evaluación de Dolor del Paciente (VAS), Evaluación Global del Paciente (VAS), Evaluación Global por el Médico (VAS), Discapacidad Autoevaluada del Paciente (HAQ), Reactivo de Fase Aguda (CRP o ESR).

ACR50 y ACR70 se definen de la misma manera con mejoría del ≥ 50 % y ≥ 70 %, respectivamente. Para más detalles véase Felson *et al.* en *American College of Rheumatology Preliminary Definition of Improvement in Rheumatoid Arthritis; Arthritis Rheumatism* (1995) 38: 727-735.

La composición debe ser estéril y fluida hasta el grado de que la composición sea suministrable por jeringa. Además de agua, el vehículo puede ser una solución salina tamponada isotónica, etanol, poliol (por ejemplo glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido y similares) y mezclas adecuadas de los mismos. Debe mantenerse fluidez apropiada, por ejemplo, mediante el uso de recubrimiento tal como lecitina, por mantenimiento de tamaño de partícula requerido en el caso de dispersión y mediante el uso de tensoactivos. En muchos casos, es preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol o sorbitol y cloruro sódico en la composición. Puede conseguirse absorción a largo plazo de las composiciones inyectables incluyendo en la composición un agente que retarde la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio o gelatina.

Cuando el compuesto activo está protegido de forma adecuada, como se ha descrito anteriormente, el compuesto puede administrarse por vía oral, por ejemplo, con un diluyente inerte o un vehículo comestible asimilable.

VI. Usos y Métodos

5 Los anticuerpos humanos (incluyendo inmunoconjugados, composiciones biespecíficas/multiespecíficas, y otros derivados descritos en este documento) de la presente divulgación tienen numerosas utilidades terapéuticas y de diagnóstico *in vitro* e *in vivo* que implican el diagnóstico y tratamiento de trastornos que implican células que expresan CD20. Por ejemplo, los anticuerpos pueden administrarse a células en cultivo, por ejemplo, *in vitro* o *ex vivo*, o a sujetos humanos, por ejemplo, *in vivo*, para tratar, prevenir y diagnosticar una diversidad de trastornos. Como se usa en este documento, el término "sujeto" pretende incluir animales humanos y no humanos que responden a los anticuerpos humanos contra CD20. Los sujetos preferidos incluyen pacientes humanos que tienen trastornos que pueden corregirse o aliviarse inhibiendo o controlando los linfocitos B (normales o malignos).

15 Por ejemplo, en una realización, los anticuerpos humanos de la presente divulgación pueden usarse para tratar a un sujeto con un trastorno tumorigénico, por ejemplo, un trastorno caracterizado por la presencia de células tumorales que expresan CD20 incluyendo, por ejemplo, linfoma de linfocitos B, por ejemplo, NHL. Los ejemplos de enfermedades tumorigénicas que pueden tratarse y/o prevenirse incluyen linfoma de linfocitos B, por ejemplo, NHL, incluyendo leucemia/linfoma linfoblástico de linfocitos B precursores y neoplasias de linfocitos B maduros, tales como leucemia linfocítica crónica (CLL)/linfoma linfocítico pequeño (SLL) de linfocitos B, leucemia prolinfocítica de linfocitos B, linfoma linfoplasmacítico, linfoma de células de manto (MCL), linfoma folicular (FL), incluyendo FL de grado bajo, grado intermedio y grado alto, linfoma de centro folicular cutáneo, linfoma de linfocitos B de zona marginal (tipo MALT, nodal y tipo esplénico), tricoleucemia, linfoma de linfocitos B grandes difuso, linfoma de Burkitt, plasmacitoma, mieloma de células plasmáticas, trastorno linfoproliferativo postrasplante, macroglobulinemia de Waldenström y linfoma de células grandes anaplásico (ALCL).

20 Son ejemplos adicionales de linfomas no de Hodgkin de linfocitos B granulomatosis linfomatoide, linfoma de fusión primaria, linfoma de linfocitos B grandes intravascular, linfoma de linfocitos B grandes mediastinal, enfermedades de cadena pesada (incluyendo enfermedad γ , μ y α), linfomas inducidos por terapia con agentes inmunosupresores, tales como linfoma inducido por ciclosporina y linfoma inducido por metotrexato.

25 En una realización adicional, los anticuerpos humanos de la presente divulgación pueden usarse para tratar linfoma de Hodgkin.

35 Los ejemplos de trastornos inmunes en los que están implicados linfocitos B que expresan CD20 que pueden tratarse y/o prevenirse incluyen trastornos autoinmunes, tales como psoriasis, artritis psoriásica, dermatitis, esclerodermia sistémica y esclerosis, enfermedad inflamatoria del intestino (IBD), enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, síndrome de dificultad respiratoria, meningitis, encefalitis, uveítis, glomerulonefritis, eccema, asma, aterosclerosis, deficiencia de adhesión de leucocitos, esclerosis múltiple, síndrome de Raynaud, síndrome de Sjögren, diabetes de aparición juvenil, síndrome de Reiter, enfermedad de Behçet, nefritis del complejo inmune, nefropatía de IgA, polineuropatías de IgM, trombocitopenias mediadas por sistema inmune, tales como púrpura trombocitopénica idiopática aguda y púrpura trombocitopénica idiopática crónica, anemia hemolítica, miastenia grave, nefritis lúpica, lupus eritematoso sistémico, artritis reumatoide (RA), dermatitis atópica, pénfigo, enfermedad de Graves, tiroiditis de Hashimoto, granulomatosis de Wegener, síndrome de Omenn, insuficiencia renal crónica, mononucleosis infecciosa aguda, VIH y enfermedades asociadas con el virus del herpes. Son ejemplos adicionales síndrome de dificultad respiratoria agudo grave y coriorretinitis. Además, otras enfermedades y trastornos incluyen las causadas o mediadas por infección de linfocitos B con virus, tales como virus de Epstein-Barr (VEB).

45 La invención proporciona un anticuerpo anti-CD20 tal como se define en las reivindicaciones para su uso en el tratamiento o en la prevención de esclerosis múltiple.

50 Los ejemplos adicionales de trastornos inflamatorios, inmunes y/o autoinmunes en los que son prominentes autoanticuerpos y/o actividad de linfocitos B excesiva y que pueden tratarse y/o prevenirse, incluyen los siguientes:

55 *vasculitis y otros trastornos de los vasos*, tales como poliangeítis microscópica, síndrome de Churg-Strauss y otras vasculitis asociadas con ANCA, poliarteritis nodosa, vasculitis crioglobulinémica esencial, angeítis leucocitoclástica cutánea, enfermedad de Kawasaki, arteritis de Takayasu, artritis de células gigantes, púrpura de Henoch-Schönlein, angeítis cerebral primaria o aislada, eritema nodoso, tromboangeítis obliterante, púrpura trombocitopénica trombótica (incluyendo síndrome urémico hemolítico) y vasculitis secundarias; incluyendo vasculitis leucocitoclástica cutánea (por ejemplo, secundaria de hepatitis B, hepatitis C, macroglobulinemia de Waldenström, neoplasias de linfocitos B, artritis reumatoide, síndrome de Sjögren o lupus eritematoso sistémico); son ejemplos adicionales eritema nodoso, vasculitis alérgica, paniculitis, enfermedad de Weber-Christian, púrpura hiperglobulinémica y enfermedad de Buerger;

60 *trastornos de la piel*, tales como dermatitis de contacto, dermatosis de IgA lineal, vitíligo, piodermia gangrenosa, epidermolisis ampollosa adquirida, pénfigo vulgar (incluyendo pénfigo cicatricial y pénfigoide ampollosa), alopecia areata (incluyendo alopecia universal y alopecia total), dermatitis herpetiforme, eritema multiforme y

65

urticaria autoinmune crónica (incluyendo edema angioneurótico y vasculitis urticarial);
citopenias mediadas por sistema inmune, tales como neutropenia autoinmune y aplasia de glóbulos rojos pura;
trastornos del tejido conectivo, tales como lupus de SNC, lupus eritematoso discorde, síndrome de CREST,
 5 enfermedad de tejido conectivo mixta, polimiositis/dermatomiositis, miositis de cuerpos de inclusión, amiloidosis
 secundaria, crioglobulinemia de tipo I y tipo II, fibromialgia, síndrome de anticuerpo de fosfolípidos, hemofilia
 secundaria, policondritis recidivante, sarcoidosis, síndrome de la persona rígida y fiebre reumática, un ejemplo
 adicional es fascitis eosinófila;
artritis, tales como espondilitis anquilosante, artritis crónica juvenil, enfermedad de Still del adulto y síndrome de
 10 SAPHO; son ejemplos adicionales sacroileítis, artritis reactiva, enfermedad de Still y gota;
trastornos hematológicos, tales como anemia aplásica, anemia hemolítica primaria (incluyendo síndrome de
 aglutinina fría), anemia hemolítica secundaria de CLL o lupus eritematoso sistémico; síndrome de POEMS,
 anemia perniciosa y púrpura hiperglobulinémica de Waldenström; son ejemplos adicionales agranulocitosis,
 neutropenia autoinmune, enfermedad de Franklin, enfermedad de Seligmann, enfermedad de cadena μ ,
 15 síndrome paraneoplásico secundario de timoma y linfomas y formación de inhibidor de factor VIII;
endocrinopatías, tales como poliendocrinopatía y enfermedad de Addison; son ejemplos adicionales
 hipoglucemia autoinmune, hipotiroidismo autoinmune, síndrome de insulina autoinmune, tiroiditis de Quervain y
 resistencia a insulina mediada por anticuerpo de receptor de insulina;
trastornos hepato-gastrointestinales, tales como enfermedad celiaca, enfermedad de Whipple, cirrosis biliar
 primaria, hepatitis activa crónica y colangitis esclerosante primaria; un ejemplo adicional es gastritis autoinmune;
 20 *nefropatías*, tal como glomerulonefritis progresiva rápida, nefritis postestreptocócica, síndrome de Goodpasture,
 glomerulonefritis membranosa y nefritis crioglobulinémica; un ejemplo adicional es enfermedad de cambio
 mínimo;
trastornos neurológicos, tales como neuropatías autoinmunes, mononeuritis múltiple, síndrome miasténico de
 Lambert-Eaton, corea de Sydenham, tabes dorsal y síndrome de Guillain-Barre; son ejemplos adicionales
 25 mielopatía/paraparesia espástica tropical, miastenia grave, polineuropatía desmielinizante inflamatoria aguda y
 polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica;
trastornos cardíacos y pulmonares, tales como alveolitis fibrosa, bronquiolitis obliterante, aspergilosis alérgica,
 fibrosis quística, síndrome de Löffler, miocarditis y pericarditis; son ejemplos adicionales neumonitis por
 hipersensibilidad y síndrome paraneoplásico secundario de cáncer de pulmón;
 30 *trastornos alérgicos*, tales como asma bronquial y síndrome de hiper-IgE; un ejemplo adicional es amaurosis
 fugaz;
trastornos oftalmológicos, tales como coriorretinitis idiopática;
enfermedades infecciosas, tales como infección por parvovirus B (incluyendo síndrome de guantes y calcetines);
 y
 35 *trastornos ginecológicos-obstétricos*, tales como aborto recurrente, pérdida de feto recurrente y retardo del
 crecimiento intrauterino; un ejemplo adicional es síndrome paraneoplásico secundario de neoplasias
 ginecológicas;
trastornos reproductores masculinos, tales como síndrome paraneoplásico secundario de neoplasias testiculares;
 y
 40 *trastornos derivados de trasplante*, tales como rechazo de aloinjerto y xenoinjerto y enfermedad de injerto contra
 hospedador.

En una realización, la enfermedad es un trastorno inflamatorio, inmune y/o autoinmune seleccionado de colitis
 45 ulcerosa, enfermedad de Crohn, diabetes de aparición juvenil, esclerosis múltiple, trombocitopenias mediadas por
 sistema inmune, tales como púrpura trombocitopénica idiopática y púrpura trombocitopénica idiopática crónica,
 anemia hemolítica (incluyen anemia hemolítica autoinmune), miastenia grave, esclerosis sistémica y pénfigo vulgar.

En otra realización, pueden usarse anticuerpos humanos de la divulgación para detectar niveles de CD20, o niveles
 50 de células que contienen CD20 en su superficie de membrana, pudiendo después ligarse dichos niveles a ciertos
 síntomas de enfermedad. Como alternativa, los anticuerpos pueden usarse para reducir el número de o interaccionar
 con la función de células que expresan CD20, implicando de este modo a estas células como mediadores
 importantes de la enfermedad. Esto puede conseguirse poniendo en contacto una muestra y una muestra de control
 con el anticuerpo anti-CD20 en condiciones que permitan la formación de un complejo entre el anticuerpo y CD20.
 55 Cualquier complejo formado entre el anticuerpo y CD20 se detecta y compara en la muestra y el control.

Pueden ensayarse inicialmente anticuerpos humanos de la divulgación con respecto a actividad de unión asociada
 con uso terapéutico o de diagnóstico *in vitro*. Por ejemplo, los anticuerpos pueden ensayarse usando ensayos de
 60 citometría de flujo descritos en los ejemplos posteriores. Además, puede ensayarse la actividad de los anticuerpos
 en el desencadenamiento de al menos una actividad de célula efectora mediada por efector, incluyendo inhibir el
 crecimiento y/o destrucción de células que expresan CD20. Por ejemplo, puede ensayarse la capacidad de los
 anticuerpos para desencadenar CDC y/o apoptosis. Se describen protocolos para ensayar con respecto a CDC,
 adhesión homotípica, agrupamiento molecular o apoptosis en los Ejemplos posteriores.

Los anticuerpos humanos de la divulgación también tienen utilidad adicional en terapia y diagnóstico de una
 65 diversidad de enfermedades relacionadas con CD20. Por ejemplo, los anticuerpos humanos pueden usarse para
 inducir *in vivo* o *in vitro* una o más de las siguientes actividades biológicas: inhibir el crecimiento y/o diferenciación de

una célula que expresa CD20; destruir una célula que expresa CD20; mediar en la fagocitosis o ADCC de una célula que expresa CD20 en presencia de células efectoras humanas; mediar en CDC de una célula que expresa CD20 en presencia de complemento; mediar en la apoptosis de una célula que expresa CD20; inducir adhesión homotípica; y/o inducir traslocación a balsas lipídicas tras unión de CD20.

5 En una realización particular, los anticuerpos humanos se usan *in vivo* para tratar, prevenir o diagnosticar una diversidad de enfermedades relacionadas con CD20. Los ejemplos de enfermedades relacionadas con CD20 incluyen, entre otras, linfoma de linfocitos B, por ejemplo, NHL y enfermedades inmunes, por ejemplo, enfermedades autoinmunes, tales como las enumeradas anteriormente.

10 En una realización particular, los anticuerpos de la invención se usan para tratar o prevenir NHL, puesto que los anticuerpos reducen el número de células tumorales que portan CD20.

15 El linfoma no de Hodgkin es un tipo de linfoma de linfocitos B. Los linfomas, por ejemplo, linfomas de linfocitos B, son un grupo de cánceres relacionados que surgen cuando un linfocito (una célula sanguínea) se hace maligna. La función normal de los linfocitos es defender el cuerpo contra invasores: gérmenes, virus, hongos e incluso cáncer. Existen muchos subtipos y etapas de maduración de linfocitos y, por lo tanto, existen muchos tipos de linfomas. Como las células normales, los linfocitos malignos pueden moverse a muchas partes del cuerpo. Típicamente, las células de linfoma forman tumores en el sistema linfático: médula ósea, ganglios linfáticos, bazo y sangre. Sin embargo, estas células pueden migrar a otros órganos. Ciertos tipos de linfoma tenderán a crecer en localizaciones en las que reside la versión normal de la célula. Por ejemplo, es habitual que se desarrollen tumores NHL foliculares en los ganglios linfáticos.

25 CD20 se expresa habitualmente a niveles elevados en linfocitos B neoplásicos (es decir, tumorigénicos) asociados con NHL. En consecuencia, pueden usarse anticuerpos de unión a CD20 de la divulgación para reducir el número de células tumorales que portan CD20 que conducen a NHL y, por lo tanto, pueden usarse para prevenir o tratar esta enfermedad.

30 Los anticuerpos humanos (por ejemplo, anticuerpos monoclonales humanos, moléculas multiespecíficas y biespecíficas) de la presente divulgación también pueden usarse para bloquear o inhibir otros aspectos de CD20. Por ejemplo, se sabe que CD20 se expresa en linfocitos B y está implicado en la proliferación y/o diferenciación de estas células. Puesto que los linfocitos B actúan como inmunomoduladores, CD20 es una diana importante para terapia mediada por anticuerpos para dirigirse a linfocitos B, por ejemplo, para inactivar o destruir linfocitos B, implicados en trastornos autoinmunes. Tales trastornos autoinmunes incluyen, por ejemplo, las enfermedades enumeradas anteriormente.

40 Se conocen bien en la técnica vías adecuadas de administración de las composiciones de anticuerpo (por ejemplo, anticuerpos monoclonales humanos, moléculas multiespecíficas y biespecíficas e inmunoconjugados) de la divulgación *in vivo* e *in vitro* y pueden seleccionarse por los expertos en la materia. Por ejemplo, las composiciones de anticuerpo pueden administrarse por inyección (por ejemplo, intravenosa o subcutánea). Las dosificaciones adecuadas de las moléculas usadas dependerán de la edad y peso del sujeto y la concentración y/o formulación de la composición de anticuerpo. Además, puede determinarse la carga tumoral y usarse para calcular dosificaciones adecuadas.

45 Como se ha descrito previamente, los anticuerpos anti-CD20 humanos de la divulgación pueden coadministrarse con uno u otros agentes terapéuticos más, por ejemplo, un agente citotóxico, un agente radiotóxico o un agente inmunosupresor. El anticuerpo puede estar unido al agente (como un inmunocomplejo) o puede administrarse separado del agente. En el segundo caso (administración separada), el anticuerpo puede administrarse antes, después o simultáneamente con el agente o puede coadministrarse con otras terapias conocidas, por ejemplo, una terapia antineoplásica, por ejemplo, radiación. Tales agentes terapéuticos incluyen, entre otros, agentes antineoplásicos tales como doxorubicina, cisplatino, bleomicina, carmustina, clorambucilo y ciclofosfamida. La coadministración de los anticuerpos anti-CD20 humanos de la presente divulgación con agentes quimioterapéuticos proporciona dos agentes antineoplásicos que operan mediante diferentes mecanismos que producen un efecto citotóxico para células tumorales humanas. Dicha coadministración puede resolver problemas debido al desarrollo de resistencia a fármacos o un cambio en la antigenicidad de las células tumorales que los harían no reactivos con el anticuerpo.

60 Las células efectoras específicas de diana, por ejemplo, células efectoras ligadas a composiciones (por ejemplo, anticuerpos humanos, moléculas multiespecíficas y biespecíficas) de la divulgación también pueden usarse como agentes terapéuticos. Las células efectoras para dirección pueden ser leucocitos humanos tales como macrófagos, neutrófilos o monocitos. Otras células incluyen eosinófilos, linfocitos citolíticos y otras células portadoras de receptor de IgG o IgA. Si se desea, pueden obtenerse células efectoras del sujeto a tratar. Las células efectoras específicas de diana pueden administrarse como una suspensión de células en una solución fisiológicamente aceptable. El número de células administrado puede estar en el orden de 10^8 a 10^9 pero variará dependiendo del fin terapéutico.

65 En general, la cantidad será suficiente para obtener localización en la célula diana, por ejemplo, una célula tumoral que expresa CD20, y para efectuar destrucción celular por, por ejemplo, fagocitosis. Las vías de administración

también pueden variar.

Puede realizarse terapia con células efectoras específicas de diana junto con otras técnicas para retirada de células diana. Por ejemplo, puede usarse terapia antitumoral usando las composiciones (por ejemplo, anticuerpos humanos, moléculas multiespecíficas y biespecíficas) de la divulgación y/o células efectoras equipadas con estas composiciones junto con quimioterapia. Adicionalmente, puede usarse inmunoterapia de combinación para dirigir dos poblaciones efectoras citotóxicas diferentes hacia rechazo de células tumorales. Por ejemplo, pueden usarse anticuerpos anti-CD20 ligados a anti-Fc γ R1 o anti-CD3 junto con agentes de unión específicos de receptor de IgG o IgA.

También pueden usarse moléculas biespecíficas y multiespecíficas de la divulgación para modular los niveles de Fc γ R o Fc α R en células efectoras, tales como por protección y eliminación de receptores en la superficie celular. También pueden usarse mezclas de receptores anti-Fc para este fin.

Las composiciones (por ejemplo, anticuerpos humanos, moléculas multiespecíficas y biespecíficas e inmunoconjugados) de la divulgación que tengan sitios de unión a complemento, tales como partes de IgG1, 2, o 3 o IgM que se unen a complemento, también pueden usarse en presencia de complemento. En una realización, el tratamiento *ex vivo* de una población de células que comprende células diana con un agente de unión de la divulgación y células efectoras apropiadas puede complementarse por la adición de complemento o suero que contiene complemento. La fagocitosis de células diana recubiertas con un agente de unión de la divulgación puede mejorarse uniendo proteínas del complemento. En otra realización también pueden lisarse por complemento células diana recubiertas con las composiciones (por ejemplo, anticuerpos humanos, moléculas multiespecíficas y biespecíficas). En otra realización más, las composiciones de la divulgación no activan complemento.

Las composiciones (por ejemplo, anticuerpos humanos, moléculas multiespecíficas y biespecíficas e inmunoconjugados) de la divulgación también pueden administrarse junto con complemento. En consecuencia, dentro del alcance de la divulgación hay composiciones que comprenden anticuerpos humanos, moléculas multiespecíficas o biespecíficas y suero o complemento. Estas composiciones son ventajosas porque el complemento se localiza en proximidad cercana a los anticuerpos humanos, moléculas multiespecíficas o biespecíficas. Como alternativa, los anticuerpos humanos, moléculas multiespecíficas o biespecíficas de la divulgación y el complemento o suero pueden administrarse de forma separada. La unión de las composiciones de la presente divulgación para dirigirse a células provoca traslocación del complejo antígeno CD20-anticuerpo a balsas lipídicas de la membrana celular. Dicha traslocación crea una alta densidad de complejos antígeno-anticuerpo que pueden activar y/o potenciar eficazmente CDC.

También hay dentro del alcance de la presente divulgación kits que comprenden las composiciones de anticuerpo de la divulgación (por ejemplo, anticuerpos humanos e inmunoconjugados) e instrucciones para su uso. El kit puede contener adicionalmente uno o más reactivos adicionales, tales como un reactivo inmunosupresor, un agente citotóxico o un agente radiotóxico, o uno o más anticuerpos humanos adicionales de la divulgación (por ejemplo, un anticuerpo humano que tiene una actividad complementaria).

En consecuencia, puede administrarse adicionalmente a pacientes tratados con composiciones de anticuerpo de la divulgación (antes de, simultáneamente con o después de la administración de un anticuerpo humano de la divulgación) otro agente terapéutico, tal como un agente citotóxico o radiotóxico, que potencia o aumenta el efecto terapéutico de los anticuerpos humanos.

En otras realizaciones, el sujeto puede tratarse adicionalmente con un agente que modula, por ejemplo, potencia o inhibe, la expresión o actividad de receptores de Fc γ o Fc α , por ejemplo, tratando al sujeto con una citocina. Las citocinas preferidas para administración durante tratamiento con la molécula multiespecífica incluyen factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), factor estimulante de colonias de macrófagos y granulocitos (GM-CSF), interferón- γ (IFN- γ) y factor de necrosis tumoral (TNF).

Las composiciones (por ejemplo, anticuerpos humanos, moléculas multiespecíficas y biespecíficas) de la divulgación también pueden usarse para dirigirse a células que expresan Fc γ R o CD20, por ejemplo para marcar tales células. Para tal uso, el agente de unión puede ligarse a una molécula que puede detectarse. Por lo tanto, la divulgación proporciona métodos para localizar *ex vivo* o *in vitro* células que expresan receptores de Fc, tales como Fc γ R, o CD20. El marcador detectable puede ser, por ejemplo, un radioisótopo, un compuesto fluorescente, una enzima o un cofactor de enzima.

En una realización particular, la divulgación proporciona métodos para detectar la presencia de antígenos CD20 en una muestra, o medir la cantidad de antígeno CD20, que comprende poner en contacto la muestras, y una muestra de control, con un anticuerpo monoclonal humano que se une específicamente a CD20, en condiciones que permitan la formación de un complejo entre el anticuerpo o parte de mismo y CD20. La formación de un complejo se detecta después, siendo una formación de complejo diferente de la muestra en comparación con la muestra de control indicativa de la presencia de antígeno CD20 en la muestra.

En otras realizaciones, la divulgación proporciona métodos para tratar un trastorno que implica células que expresan CD20 en un sujeto, por ejemplo, linfoma no de Hodgkin o artritis reumatoide, administrando al sujeto los anticuerpos humanos descritos anteriormente. Tales anticuerpos y derivados de los mismos se usan para inhibir actividades inducidas por CD20 asociadas con ciertos trastornos, por ejemplo, proliferación y/o diferenciación. Poniendo en contacto el anticuerpo con CD20 (por ejemplo, administrando el anticuerpo a un sujeto), se inhibe la capacidad de CD20 para inducir tales actividades y, por lo tanto, se trata el trastorno asociado.

En consecuencia, en otra realización, la presente divulgación proporciona un método para tratar o prevenir un trastorno tumorigénico que implica células que expresan CD20, por ejemplo, NHL. El método implica administrar a un sujeto una composición de anticuerpo de la presente divulgación en una cantidad eficaz para tratar o prevenir el trastorno. La composición de anticuerpo puede administrarse sola o junto con otro agente terapéutico, tal como un agente citotóxico o uno radiotóxico que actúa junto con o de forma sinérgica con la composición de anticuerpo para tratar o prevenir las enfermedades que implican células que expresan CD20. En una realización particularmente preferida, la presente divulgación proporciona un método para tratar linfoma no de Hodgkin.

En otra realización, la presente divulgación proporciona un método para tratar o prevenir un trastorno autoinmune que implica células que expresan CD20 humano, por ejemplo, las enfermedades enumeradas anteriormente. El método implica administrar a un sujeto una composición de anticuerpo de la presente divulgación en una cantidad eficaz para tratar o prevenir el trastorno. La composición de anticuerpo puede administrarse sola o junto con otro agente terapéutico, tal como un inmunosupresor que actúa junto con o de forma sinérgica con la composición de anticuerpo para tratar o prevenir la enfermedad que implica células que expresan CD20.

En otra realización más, la divulgación proporciona un método para detectar la presencia o cuantificar la cantidad de células que expresan CD20 *in vivo* o *in vitro*. El método comprende (i) administrar a un sujeto una composición (por ejemplo, una molécula multi o biespecífica) de la divulgación conjugada con un marcador detectable; (ii) exponer el sujeto a un medio para detectar dicho marcador detectable para identificar áreas que contienen células que expresan CD20. En otra realización más, pueden usarse inmunoconjugados de la divulgación para dirigirse a compuestos (por ejemplo, agentes terapéuticos, marcadores, citotoxinas, radiotoxinas, inmunosupresores, etc.) a células que tienen CD20 expresado en su superficie ligando tales compuestos al anticuerpo. Por lo tanto, la divulgación también proporciona métodos para localizar *ex vivo* o *in vitro* células que expresan CD20, tales como Reed-Sternberg (por ejemplo, con un marcador detectable, tal como un radioisótopo, un compuesto fluorescente, una enzima o un cofactor de enzima). Como alternativa, los inmunoconjugados pueden usarse para destruir células que tienen CD20 expresado en su superficie dirigiendo citotoxinas o radiotoxinas a CD20.

La presente invención se ilustra adicionalmente por los siguientes ejemplos que no deberían interpretarse como limitantes adicionales.

EJEMPLOS

Líneas de linfocitos B usadas en los ejemplos

Línea celular	Origen	Obtenido de
Daudi	Linfoma Negroide de Burkitt	ECACC (85011437)
ARH-77	Leucemia de células plasmáticas de IgG	DSMZ(ACC512)
DOHH	Linfoma de linfocitos B inmunoblástico refractario	DSMZ (ACC 47)
Raji	Linfoma Negroide de Burkitt	ECACC (85011429)
SU-DHL-4	Linfoma histiocítico difuso, B-NHL	DSMZ (ACC 495)
Ramos-EHRB	Linfoma de Burkitt	ECACC (85030804)
Tanoue	Leucemia de linfocitos B humanos	DSMZ (ACC 399)

Se cultivaron líneas de linfocitos B Daudi, ARH-77, DOHH, Raji, Ramos-EHRB, y Tanoue en medio de cultivo RPMI 1640 complementado con suero de ternero fetal 10 % (FCS) (Optimum C241, Wisent Inc., st Bruno, Canadá), L-glutamina 2 mM, penicilina 100 UI/ml, estreptomycin 100 µg/ml y piruvato sódico 1 mM (todos de Gibco BRL, Life Technologies, Paisley, Escocia).

La línea de linfocitos B SU-DHL-4 se cultivó en el mismo medio pero sin piruvato sódico.

Los cultivos se mantuvieron a 37 °C en un incubador de CO₂ 5 % humidificado, se separaron y se recogieron a confluencia del 80-90 %. El medio se renovó dos veces por semana. En este momento las células se dividieron y se sembraron a 1 -1,5 x 10⁶ células/ml para asegurar la viabilidad y crecimiento óptimo.

55 Ejemplo 1 Producción de Anticuerpos Humanos contra CD20

Ratones HCo7 y KM: Se prepararon anticuerpos monoclonales completamente humanos para CD20 usando ratones HCo7 y KM que expresan genes de anticuerpos humanos. En la cepa de ratón KM, el gen de cadena ligera kappa

de ratón endógeno se ha roto de forma homocigota como se describe en Chen *et al.* (1993) EMBO J. 12: 811-820 y el gen de cadena pesada de ratón endógeno se ha roto de forma homocigota como se describe en el Ejemplo 1 de la Publicación de PCT WO 01/09187. Esta cepa de ratón porta un transgén de cadena ligera kappa humano, KCo5, como se describe en Fishwild *et al.* (1996) Nature Biotechnology 14: 845-851. Esta cepa de ratón también porta un transcromosoma de cadena pesada humano compuesto del fragmento del cromosoma 14 hCF (SC20) como se describe en el documento WO 02/43478.

Los ratones HCo7 tienen una rotura JKD en sus genes de cadena ligera endógena (kappa) (como se describe en Chen *et al.* (1993) EMBO J. 12: 821-830), una rotura CMD en sus genes de cadena pesada endógenos (como se describe en el Ejemplo 1 del documento WO 01/14424), un transgén de cadena ligera kappa humano KCo5 (como se describe en Fishwild *et al.* (1996) Nature Biotechnology 14: 845-851), y un transgén de cadena pesada humano HCo7 (como se describe en el documento US 5.770.429).

Inmunizaciones de Ratones HCo7 y KM: Se inmunizó a ratones HCo7 y KM con células NS/0 transfectadas con CD20 humano. Para la primera inmunización, por ratón, se mezclaron 1×10^7 células en 150 μ l de PBS 1:1 con Adyuvante Completo de Freund y se inyectaron por vía intraperitoneal (i.p.). Se realizaron inmunizaciones i.p. posteriores usando una cantidad similar de células sin adyuvante. Tres y dos días antes de la fusión se estimuló a los ratones por vía intravenosa con $0,5 \times 10^7$ células suspendidas en PBS.

La presencia de anticuerpos dirigidos contra CD20 humano en el suero de los ratones se controló por citometría de flujo usando análisis de FACS, usando células NS/0 transfectadas con CD20 humano así como células NS/0 parentales negativas para CD20.

Generación de Hibridomas que Producen Anticuerpos Monoclonales Humanos para CD20: Los esplenocitos de ratón se aislaron de los ratones HCo7 y KM y se fusionaron con PEG con una línea celular de mieloma de ratón basándose en protocolos convencionales. Los hibridomas resultantes se exploraron después con respecto a producción de IgG $_{\kappa}$ humana por ELISA y con respecto a especificidad de CD20 usando células SKBR3 y NS/0 transfectadas con CD20 humano por análisis de FACS. Se fusionaron suspensiones de células sencillas de linfocitos esplénicos de ratones inmunizados con un cuarto del número de células de mieloma de ratón no secretoras SP2/0 (ATCC, CRL 1581) con PEG 50 % (Sigma). Las células se sembraron a aproximadamente 1×10^5 /pocillo en placa de microtitulación de fondo plano, seguido de incubación durante aproximadamente dos semanas en medio selectivo que contiene suero bovino fetal 10 %, medio acondicionado con P388D1 10 % (ATCC, CRL TIB-63), origen 3-5 % (IGEN) en DMEM (Mediatech, CRL 10013, con alta glucosa, L-glutamina y piruvato sódico) más HEPES 5 mM, 2-mercaptoetanol 0,055 mM, gentamicina 50 mg/ml y HAT 1x (Sigma, CRL P-7185). Después de 1-2 semanas, las células se cultivaron en medio en el que se reemplazó HAT con HT. Los pocillos individuales se exploraron después por citometría de flujo con respecto a anticuerpos IgG monoclonales anti-CD20 humanos. Una vez que se haya producido el crecimiento de hibridoma extensivo, se controló el medio habitualmente después de 10-14 días. Los hibridomas que secretaban anticuerpos se volvieron a sembrar, se exploraron de nuevo y, si aún eran positivos para IgG humana, los anticuerpos monoclonales anti-CD20 se subclonaron por dilución limitante. Los subclones estables se cultivaron después *in vitro* para generar pequeñas cantidades de anticuerpo en medio de cultivo tisular para caracterización. Se seleccionó un clon de cada hibridoma, que conservaba la reactividad de células parentales (por FACS). Se generaron bancos de células de 5-10 frascos para cada clon y se almacenaron en nitrógeno líquido.

Selección de Unión de Anticuerpos Monoclonales Humanos con CD20/Exploraciones Primarias: para determinar el isotipo de anticuerpos, se realizó un ELISA de isotipo. Se recubrieron pocillos de placas de microtitulación con 1 μ g/ml de cadena ligera kappa antihumana de ratón, 50 μ l/pocillo en PBS incubado a 4 °C durante una noche. Después de bloquear con suero de pollo 5 %, se hizo reaccionar a las placas con sobrenadante y se purificó el control de isotipo. Las placas se incubaron después a temperatura ambiente durante 1-2 horas. Se hizo reaccionar después a los pocillos con sondas conjugadas con peroxidasa de rábano rusticano específicas de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 humana. Las placas se revelaron y se analizaron como se ha descrito anteriormente.

Se generaron cuatro líneas celulares de hibridoma, tres de fusión de ratón KM y una de fusión de ratón HCo7, que expresaban los siguientes anticuerpos:

- 2F2: un anticuerpo IgG1 $_{\kappa}$ monoclonal humano con las secuencias de nucleótidos: SEQ ID N°: 1 y 3 y las secuencias de aminoácidos: SEQ ID N°: 2 y 4.
- 4C9: un anticuerpo IgG1 $_{\kappa}$ monoclonal humano con exactamente las mismas secuencias de aminoácidos que 2F2: SEQ ID N°: 2 y 4.
- 7D8: un anticuerpo IgG1 $_{\kappa}$ monoclonal humano con las secuencias de nucleótidos: SEQ ID N°: 5 y 7 y las secuencias de aminoácidos SEQ ID N°: 6 y 8.
- 11B8: un anticuerpo IgG3 $_{\kappa}$ monoclonal humano con las secuencias de nucleótidos: SEQ ID N°: 9 y 11 y las secuencias de aminoácidos: SEQ ID N°: 10 y 12.

El término "2F2" se usa en este documento para designar tanto un anticuerpo derivado de clon de hibridoma 2F2 como el anticuerpo idéntico derivado de clon de hibridoma 4C9.

Los anticuerpos de la invención pueden conmutarse a otros isotipos como se determina por el animal no humano transgénico o transcromosómico del que derivan. En una realización de la invención, el anticuerpo IgG3, κ monoclonal humano 11B8 puede conmutarse a un isotipo IgG1, κ monoclonal humano que tiene exactamente las mismas secuencias V_H y V_L . En otra realización, el anticuerpo IgG1, κ 2F2 o anticuerpo IgG1, κ 7D8 puede conmutarse a un isotipo IgG2, IgG4, IgA1, IgA2 o IgE monoclonal humano que tenga exactamente las mismas secuencias V_H y V_L .

Ejemplo 2 Secuenciación de Anticuerpos de Anticuerpos Humanos Contra CD20

Secuenciación de las regiones V_L y V_H

Preparación de ARN: Se prepara ARN total a partir de 5×10^6 células de todas las líneas celulares de hibridoma HuMAb CD20 (2F2, 7D8 y 11B8) con kit RNeasy (Qiagen, Westburg, Leusden, Países Bajos) de acuerdo con el protocolo del fabricante.

Preparación de ADNc de 2F2 y 7D8: Se preparó ADN complementario (ADNc) 5'-RACE-Ready de ARN a partir de 1 μ g de ARN total, usando el kit de Amplificación de ADNc SMART RACE (Clontech), siguiendo el protocolo del fabricante. Se amplificaron las regiones V_H y V_L usando un Kit de PCR HF 2 advantage (Clontech, BD) y usando los siguientes cebadores:

V_K RACE2	5'GCAGGCACACAACAGAGGCAGTTCCAGATTTTC	hibrida en C-kappa
V_H RACE2	5' GCT GTG CCC CCA GAG GTG CTC TTG GAG G	hibrida en C_H ,

Preparación de ADNc de 11B8: Se preparó ADN complementario (ADNc) de ARN a partir de células 11B8 de 3 μ g de ARN total con Transcriptasa Inversa AMV con tampón (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania), oligo d(T)₁₅ (Promega, Madison, WI, Estados Unidos), dNTP (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania) y RNAsin (Promega) de acuerdo con el protocolo del fabricante (2000, versión 3).

Cebadores de PCR usados para amplificar regiones V_H y V_L para clonación:

Pares de cebadores usados:

V_H :	<u>Cebadores 5' de FR1</u>
	AB62 CAg gTK CAg CTg gTg CAg TC
	AB63 SAg gTg CAg CTg KTg gAg TC
	AB65 gAg gTg CAg CTg gTg CAg TC
	Cebadores 5' de líder de V_H
	<u>AB85 ATg gAC Tgg ACC Tgg AgC ATC</u>
	AB86 ATg gAA TTg ggg CTg AgC Tg
	AB87 ATg gAg TTT ggR CTg AgC Tg
	AB88 ATg AAA CAC CTg Tgg TTC TTC
	AB89 ATg ggg TCA ACC gCC ATC CT
	Cebador 3' de V_H
	<u>AB90 TgC CAg ggg gAA gAC CgA Tgg</u>
V_K :	<u>Cebadores 5' de FR1</u>
	AB8 RAC ATC CAg ATg AYC CAg TC
	AB9 gYC ATC YRg ATg ACC CAg TC
	AB10 gAT ATT gTg ATg ACC CAg AC
	AB11 gAA ATT gTg TTg ACR CAg TC
	AB12 gAA ATW gTR ATg ACA CAg TC
	AB13 gAT gTT gTg ATg ACA CAG TC
	AB14 gAA ATT gTg CTg ACT CAg TC
	Cebadores 5' de líder de V_K
	<u>AB123 CCC gCT Cag CTC CTg ggg CTC CTg</u>
	AB124 CCC TgC TCA gCT CCT ggg gCT gC
	AB125 CCC AgC gCA gCT TCT CTT CCT CCT gC
	AB126 ATg gAA CCATgg AAg CCC CAg CAC AgC

Cebador 3' de V_K

AB16 Cgg gAA gAT gAA gAC AgA Tg

en los que K = T o G, S = C o G, R = A o G, Y = C o T y W = A o T.

5 *Condiciones de PCR usadas para amplificar regiones V_H y V_L para clonar 2F2 y 7D8:* Se realizaron reacciones en cadena de la polimerasa (PCR) con mezcla de polimerasa HF (Clonetech) en un ciclador T1 (Biometra, Westburg).

Condiciones de PCR:	
94 °C 30 segundos	5 ciclos
72 °C 1 minuto	
94 °C 30 segundos	5 ciclos
70 °C 30 segundos	
72 °C 1 minuto	
94 °C 30 segundos	27-30 ciclos
68 °C 30 segundos	
72 °C 1 minuto	

10 *Condiciones de PCR usadas para amplificar regiones V_H y V_L para clonar 11B8:* Se realizaron reacciones en cadena de la polimerasa (PCR) con polimerasa AmpliTaq (Perkin Elmer) en un Ciclador T1 (Biometra, Westburg, Leusden, Países Bajos).

Protocolo de ciclación de PCR:

11 ciclos	94 °C 2 minutos
	94 °C 30 segundos
	65 °C 30 segundos, -1 °C por ciclo
30 ciclos	72 °C 30 segundos
	94 °C 30 segundos
	55 °C 30 segundos
	72 °C 30 segundos
	72 °C 10 minutos
Enfriar a 4 °C	

15 *Clonación de V_H y V_L en Sistema de Vector pGEMT II (2F2, 7D8 y 11B8):* Después de analizar los productos de PCR en un gel de agarosa, los productos se purificaron con el Kit de Extracción en Gel QIAEXII (Qiagen, Westburg, Leusden, Países Bajos). Se clonaron dos productos de PCR amplificados de forma independiente de cada región V_H y V_L en Sistema de Vector pGEMT II (Promega) de acuerdo con el protocolo del fabricante (1999, versión 6).

20 Después de transformación en *E. coli* JM109, se exploraron colonias individuales por PCR de colonias usando cebadores T7 y SP6, 30 ciclos de hibridación a 55 °C. Se purificó ADN plasmídico de las colonias usando kit de miniprep Qiaprep Spin (Qiagen). Para analizar adicionalmente las regiones V_H y V_L, se realizó una digestión con *Nco1/Not1* (NE Biolabs, Westburg, Leusden, Países Bajos) y se analizó en gel de agarosa.

25 *Secuenciación (2F2, 7D8 y 11B8):* Las regiones V se secuenciaron después de clonar en el Sistema Vector pGEMT II. Se realizó secuenciación en Baseclear (Leiden, Países Bajos). Las secuencias se analizaron alineando las secuencias del gen V de línea germinal en Vbase (www.mrc-cpe.cam.ac.uk/imt-doc/publicintro.htm). <http://www.mrc-cpe.cam.ac.uk/vbase-ok.php?menu=901>.

Las secuencias obtenidas se muestran en las Figuras 53-58.

30

Ejemplos 3 Producción recombinante de 2F2 y 11B8 en línea celular GS-NS/0

35 *2F2T:* Las regiones variables de cadena pesada y cadena ligera del anticuerpo 2F2 se amplificaron, usando PCR, a partir de un vector de clonación convencional, pGem-5Zf (Promega), usando cebadores que incluían una secuencia Kozak óptima y sitios de restricción adecuados para clonar los fragmentos en los vectores de región constante GS pCON_γ1f y PCON_K (Lonza).

40 Después de amplificación, los fragmentos se purificaron y digirieron con las enzimas de restricción para clonación y se ligaron en los dos vectores. El fragmento variable de cadena pesada se digirió con *Hind* III y *Bsi* WI y se ligó en el vector pCON_γ1f que se había digerido con *Hind* III y *Bsi* WI, y se desfosforiló con fosfatasa alcalina. El fragmento variable de cadena ligera se digirió con *Hind* III y *Apa* I y se ligó en el vector PCON_K que se había digerido con *Hind* III y *Apa* I, y se desfosforiló con fosfatasa alcalina. Los vectores pesado variable/pCON_γ1f y ligero variable/pCON_K se muestran en las Figuras 1 y 2, respectivamente. Las colonias de *E. coli* transformadas se comprobaron por PCR de

colonias y se cultivaron 2 colonias positivas de cada construcción de cadena pesada (HC) y cadena ligera (LC) para aislamiento del plásmido. El plásmido aislado de estos 4 clones se secuenció para confirmar la secuencia. Se descubrió que tanto los clones de HC como uno de los clones de LC tenían las secuencias correctas.

5 Las dos construcciones HC y una LC se combinaron para dar dos combinaciones de LC-HC y se cotransfectaron de forma transitoria en células CHO-K1 para comprobar las construcciones con respecto a producción apropiada de anticuerpo 2F2. Se consiguieron niveles de producción normales para todas las combinaciones en este experimento de expresión y se seleccionó 1 clon de cada una de las construcciones HC y LC para construcción de un vector de gen doble.

10 Se usaron procedimientos de clonación convencionales para combinar las construcciones HC y LC en un vector de clonación de gen doble, designado pCON γ 1f/ κ 2F2, ligando el casete de expresión completo del vector de cadena pesada, pCON γ 1f/pesada variable, en el vector de cadena ligera, pCON κ /ligera variable. El vector pCON γ 1f/ κ 2F2 se muestra en la Figura 3.

15 Esta construcción se ensayó funcionalmente de nuevo en una transfección transitoria en células CHO-K1 y mostró niveles de expresión normales.

20 Las regiones variables del plásmido pCON γ 1f/ κ 2F2 se secuenciaron para reconfirmar las secuencias correctas.

Se preparó plásmido lineal para transfecciones estables digiriendo pCON γ 1f/ κ 2F2 con una enzima de restricción única *Pvu I*, cortando fuera de regiones vitales para la expresión. Se confirmó linealización completa por electroforesis en gel de agarosa y el ADN se purificó y se almacenó a -20 °C hasta su uso.

25 Se realizaron seis transfecciones de células hospedadoras NS/0, por electroporación con ADN plasmídico, usando el plásmido de ADN lineal anterior. Después de la transfección, las células se distribuyeron en placas de 96 pocillos y se incubaron. Se añadió medio selectivo (que contenía suero de ternero fetal dializado 10 % (dFCS) y L-metionina sulfoximina inhibidora de GS 10 μ M pero sin glutamina) y las placas se controlaron para determinar cuando murieron las células no transfectadas para dejar focos de células transfectadas. Para detalles adicionales con respecto a los sistemas de vector de GS, véase el documento WO 87/04462. Las placas transfectadas se incubaron durante aproximadamente tres semanas para permitir la formación de colonias. Las colonias resultantes se examinaron microscópicamente para verificar que las colonias eran de un tamaño adecuado para ensayo (cubriendo más del 60 % del fondo de pocillo) y que solo estaba presente una colonia en cada pocillo. Los sobrenadantes celulares de 436 transfectantes se exploraron con respecto a anticuerpo ensamblado por ELISA-IgG, κ . Usando estos datos, se seleccionaron 111 transfectantes para progresión y evaluación adicional en cultivo estático. Los cultivos de las líneas celulares seleccionadas se expandieron y adaptaron a medio que contenía suero bajo (que contenía albúmina de suero bovino (BSA) y dFCS 1 % añadido) y se realizó una evaluación adicional de productividad en cultivo estático (ELISA y medición de porcentaje de confluencia). Las 65 líneas celulares de clasificación más alta se seleccionaron para progresión. Se hizo una evaluación preliminar de la productividad de las líneas celulares seleccionadas en cultivo de suspensión en matraz agitador discontinuo en medio que contenía suero bajo (que contenía BSA y dFCS 1 % añadido). Basándose en la concentración de anticuerpo recogido (por ELISA) y características de crecimiento aceptables, se seleccionaron 30 líneas celulares para evaluación adicional en medio sin suero usando un cultivo de suspensión en matraz agitador discontinuo. Las 10 líneas celulares que produjeron las mayores concentraciones de anticuerpo se evaluaron adicionalmente en cultivos de suspensión en matraz agitador semicontinuo duplicado en medio sin suero. Las concentraciones de producto en la recogida se determinaron por cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) de proteína A, de acuerdo con métodos convencionales bien conocidos. Todas las líneas celulares produjeron anticuerpo 2F2 (denominado 2F2T) con buenos rendimientos en el intervalo de 671-1333 mg/l como se determinó por HPLC de proteína A.

50 *11B8T*: De una manera similar se estableció una línea celular GS-NS/0 para producción recombinante de 11B8 (indicado como 11B8T) modificando el procedimiento de transfección ligeramente como sigue.

Se realizaron cuatro transfecciones de células hospedadoras NS/0, por electroporación con ADN plasmídico, usando el plásmido de ADN lineal anterior. Después de examinar las colonias resultantes por microscopio para verificar que las colonias eran de un tamaño adecuado para el ensayo (abarcando más del 60 % del fondo de pocillo) y que solamente estaba presente una colonia en cada pocillo, se exploraron los sobrenadantes celulares de 596 transfectantes con respecto a anticuerpo ensamblado por ELISA-IgG, κ . Usando estos datos, se seleccionaron cien transfectantes para progresión y evaluación adicional en cultivo estático. Los cultivos de las líneas celulares seleccionadas se expandieron y adaptaron a medio que contenía suero bajo (que contenía albúmina de suero bovino (BSA) y dFCS 1 % añadido) y se realizó una evaluación adicional de productividad en cultivo estático (ELISA y medición de porcentaje de confluencia). Las 60 líneas celulares de clasificación más alta se seleccionaron para progresión y también se realizó progresión de 13 líneas celulares adicionales para las que no estaban disponibles datos de productividad. Se realizó una evaluación preliminar de la productividad de las líneas celulares seleccionadas en cultivo de suspensión de matraz agitador discontinuo en medio que contenía suero bajo (que contenía BSA y dFCS 1 % añadido). Basándose en la concentración de anticuerpo recogido (por ELISA) y

características de crecimiento aceptables, se seleccionaron 10 líneas celulares para evaluación adicional en cultivos de suspensión de matraz agitador semicontinuos duplicados en medio que contenía suero bajo (que contenía BSA y dFCS 1 % añadido). Las concentraciones de producto en la recogida se determinaron por cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) de proteína A, de acuerdo con métodos convencionales bien conocidos. Basándose en esto se descartó una de las líneas celulares. Las 9 líneas celulares resultantes produjeron todas anticuerpo 11B8 (indicado como "11B8T") con buen rendimiento en el intervalo de 354-771 mg/l como se determinó por HPLC de proteína A.

Ejemplo 4 Comparación de 2F2 derivado de hibridoma y 2F2T recombinante derivado de transfectoma

Mediante el uso de electroforesis en gel (SDS-PAGE y electroforesis en gel de agarosa nativa) se mostró que 2F2 y 2F2T son del mismo tamaño, y difieren solamente de forma ligera en carga eléctrica.

Además, 2F2 y 2F2T se unen a células NS/0 transfectadas con CD20 y células Raji con afinidad similar como se midió por citometría de flujo usando FACScalibur™ (Becton Dickinson, San Diego, CA, Estados Unidos). No se observó unión a células NS/0 no transfectadas lo que demuestra la especificidad de 2F2 y 2F2T. 2F2 y 2F2T también inducen CDC de una manera dependiente de concentración en el mismo grado que en células ARH-77 (leucemia de células plasmáticas de IgG), células Daudi, células DOHH (linfoma de linfocitos B inmunoblástico refractario de linfoma centrolítico/centroblástico folicular, DSMZ, Braunschweig, Alemania) y células Raji, midiendo lisis celular (número de células positivas para PI) por citometría de flujo (FACScalibur). En un segundo experimento, las concentraciones de 2F2 y 2F2T se mantuvieron constantes mientras que se añadió suero en diferentes concentraciones. No se observaron diferencias significativas entre 2F2 y 2F2T.

Finalmente, 2F2 y 2F2T unidos a CD20 asociado a células se une al factor de complemento C1q fuertemente y en el mismo grado. El experimento se realizó en células Daudi, células DOHH y células Raji usando anticuerpos policlonales anti-C1q conjugados con fluoresceína para detectar la unión de C1q.

Ejemplo 5 Características de Unión de Anticuerpos Humanos contra CD20

Unión a diferentes líneas celulares: Se incubaron células NS/0, NS/0 transfectadas con CD20 humano, Daudi y Raji durante 30 minutos a 4 °C con sobrenadante de cultivo que contenía anticuerpos humanos 2F2, 7D8 y 11B8 seguido de incubación con Ab anti-IgG humano conjugado con FITC. La unión se evaluó por citometría de flujo usando un citómetro de flujo FACScalibur. Las intensidades de fluorescencia se compararon con muestras coincidentes con isotipo de control negativo. Como se muestra en la Figura 4, los tres anticuerpos se unieron a células NS/0 transfectadas con CD20 humano, mientras que no se observó unión con células NS/0 parentales no transfectadas. Los tres anticuerpos también se unieron con las dos líneas de linfocitos B de linfoma de Burkitt diferentes (Raji y Daudi) lo que indica que 2F2, 7D8 y 11B8 son específicos de CD20. Se ensayó el sobrenadante que contenía 7D8 u 11B8 en condiciones no saturantes, por lo tanto, se observan intensidades de fluorescencia medias más bajas en comparación con 2F2.

Valor de CE₅₀ de 2F2 como se determina por citometría de flujo: Para determinar la afinidad aparente de 2F2 por CD20 expresado en linfocitos B humanos, se realizó una curva de unión de 2F2 usando PBMC aisladas de tres donantes humanos y selección de células negativas para CD3. Las PBMC aisladas se incubaron durante 1 hora con un intervalo de concentración de 2F2 marcado con FITC y se analizaron en FACS, y se determinó la intensidad de fluorescencia media (IFM). Los valores de IFM se muestran en las Figuras 5A y 5B en función de la concentración de anticuerpos. Los valores de CE₅₀ se calcularon mediante el uso de Graph Pad Prism 3.02 por regresión no lineal. El valor de CE₅₀ de 2F2 en seres humanos fue similar para los tres donantes con una media (\pm e.t.m.) de 287 \pm 12,7 ng/ml (1,9 \pm 0,1 nM).

Unión de mAb marcados con ¹²⁵I con células que expresan CD20: Se yodaron mAb usando Iodobeads (Pierce Chemical Co., Rockford, IL). Los mAb marcados con ¹²⁵I se diluyeron en serie y se incubaron con células Ramos-EHRB (durante 2 horas a 37 °C en presencia de azida sódica y 2-desoxiglucosa para evitar la endocitosis. Los mAb marcados con ¹²⁵I libres y unidos a células se separaron después por centrifugación a 14.000 x g durante 2 minutos a través de una mezcla de aceites de ftalato, permitiendo una rápida separación sin perturbar el equilibrio de unión. Las células sedimentadas junto con anticuerpo unido se contaron después usando un contador gamma (Wallac UK Ltd, Milton Keynes, Reino Unido).

Como se muestra en la Figura 6, 2F2 y 11B8 muestran K_D similar (o puntos de saturación similares) lo que indica que ambos anticuerpos se unen con afinidad similar. Sin embargo, 11B8 se satura a un nivel más bajo que 2F2 lo que indica que se reconoce una forma diferente de CD20. Esto también está de acuerdo con un experimento adicional que muestra que un número similar de moléculas de anticuerpo 2F2 y rituximab se une a CD20 en células Ramos-EHRB y células Daudi, como se muestra por los niveles similares de saturación de unión (aproximadamente 2-3 x 10⁵ moléculas de anticuerpo por célula). 11B8 y B1, por el contrario, se saturan a la mitad de este nivel y solamente aproximadamente 1 - 2 x 10⁵ moléculas de anticuerpo se unen a las células Ramos-EHRB (Figura 7A) y células Daudi (Figura 7B).

Para excluir la posibilidad de que los anticuerpos yodados se unan mediante receptores de Fc, se confirmaron las curvas de unión mediante el uso de fragmentos F(ab')₂ anti-CD20. De nuevo, números similares de 2F2 y fragmentos de F(ab')₂-rituximab se unieron a células tanto Ramos-EHRB como Daudi. Además en estos experimentos, el número de moléculas de anticuerpo de rituximab o 2F2 unidas a células Ramos-EHRB y células Daudi se satura a aproximadamente dos veces el número de moléculas de 11B8 y B1 unidas a las células.

Tasa de disociación: Para determinar la tasa de disociación de los mAb, se incubaron células Ramos-EHRB (volumen final de 1 ml en presencia de azida/2DOG) durante 2 horas a 37 °C con mAb con ¹²⁵I 2 µg/ml para conseguir unión máxima. Después de la centrifugación en una microcentrífuga (2000 rpm durante 2 minutos), el sobrenadante se retiró, el sedimento se resuspendió rápidamente en 1 ml de medio e inmediatamente se transfirió a 9 ml de medio a 37 °C en un tubo cónico de 15 ml. En diversos momentos a lo largo de las siguientes 2 horas, se retiraron muestras de 0,4 ml y se separaron en aceite de ftalato para determinar el nivel de mAb radiomarcados que permanecen en la superficie celular. Como se muestra en la Figura 8, tanto 2F2 como 11B8 se disociaron de forma significativamente más lenta de CD20 que rituximab o B1.

Tasas de disociación de fragmentos F(ab)₂ anti-CD20: Se saturaron células Ramos-EHBR con fragmentos F(ab)₂ marcados con ¹²⁵I 2 µg/ml de 2F2, 11B8 y rituximab, respectivamente. Las células Ramos-EHBR se lavaron e incubaron en presencia de una alta concentración del anticuerpo no marcado. La unión máxima (inicial) con células Ramos-EHRB se ajustaron a 100 %. En varios puntos temporales a lo largo de las siguientes 3 horas después de la carga, se retiraron muestras de 0,4 ml y se separaron en aceite de ftalato para determinar los niveles de mAb radiomarcado restante de la superficie celular. Como puede verse a partir de la Figura 9, 2F2 y 11B8 se disociaron mucho más lentamente de la superficie de CD20 que rituximab. A los 90 minutos, se unió aproximadamente el 50 % de las moléculas de rituximab F(ab)₂ a la célula, mientras que la mitad de las moléculas F(ab)₂ 2F2 se disociaron después de 3 horas. Los valores de k_d (K_{off}) para 2F2, 11B8T y rituximab se calculan como sigue:

$$\mathbf{F(ab)_2\ 2F2: k_d = \ln 2/t_{1/2} (s) = \ln 2/10800 (s) = 6,4 \times 10^{-5} s^{-1}}$$

$$\mathbf{F(ab)_2\ 11B8T: k_d = \ln 2/t_{1/2} (s) = \ln 2/9000 (s) = 7,7 \times 10^{-5} s^{-1}}$$

$$\mathbf{F(ab)_2\ rituximab: k_d = \ln 2/t_{1/2} (s) = \ln 2/5400 (s) = 1,3 \times 10^{-4} s^{-1}}$$

Tasas de disociación funcionales de mAb anti-CD20: El impacto de la tasa de disociación de 2F2 lenta en comparación con rituximab se evaluó en un ensayo de CDC funcional. Para este fin, las células Daudi o SU-DHL4 se preincubaron con mAb anti-CD20 10 µg/ml o un anticuerpo de control de isotipo, se lavaron y se incubaron en medio para diferentes puntos temporales. En estos puntos temporales después del comienzo del ensayo, las muestras se incubaron con complemento (suero humano normal 20 % v/v) y después se incubaron durante otros 45 minutos a 37 °C. A continuación, se determinó la lisis celular en FACS usando método de tinción de PI (yoduro de propidio). El % de células lisadas (células positivas para PI) se muestra en la Figura 10A (células Daudi) o Figura 10B (células SU-DHL4) en función del tiempo de incubación. 2F2 indujo CDC alta en ambas líneas celulares y aún lisó hasta el 90 % de las células después de 6 horas, lo que indica que la saturación de CD20 de las células siguió siendo suficientemente alta para inducir lisis mediada por complemento de la mayoría de las células. Rituximab, por el contrario y de acuerdo con los estudios de tasa de disociación anteriores, se disoció rápidamente de las células y no indujo lisis específica después del periodo de incubación de 6 horas. 11B8 se usó como un control y no indujo CDC.

Ejemplo 6 CDC de Anticuerpos Humanos contra CD20

Preparación de suero: Se preparó suero para lisis de complemento extrayendo sangre de voluntarios sanos en gel autosep y tubos vacutainer activadores de coágulo (BD biosciences, Rutherford, NJ) que se mantuvieron a temperatura ambiente durante 30-60 minutos y después se centrifugaron a 3000 rpm durante 5 minutos. El suero se recogió y se almacenó -80 °C.

Citometría de flujo: Para citometría de flujo se usó un citómetro de flujo FACScalibur con software CellQuest pro (BD Biosciences, Mountain view, CA). Se recogieron al menos 5000 acontecimientos para análisis con residuos celulares excluidos por ajuste del umbral de dispersión lateral hacia delante (FCS).

Cinética de CDC: En un primer conjunto de experimentos (n=3) se determinó la cinética de CDC de cinco líneas de linfocitos B diferentes, es decir, Daudi, SU-DHL-4, Raji, DOHH y ARH-77, añadiendo 2F2, rituximab y un anticuerpo de control IgG 10 µg/ml, respectivamente, durante 10 minutos antes de que se añadiera suero humano. En varios intervalos temporales (hasta una hora) después de inducción de CDC, las células se suspendieron en solución PI y se midió la lisis celular (número de células positivas para PI) por citometría de flujo. Los resultados se representan en las Figuras 11A (células ARH-77), 11B (células Daudi), 11C (células Raji), 11D (DOHH) y 11E (SU-DHL-4). Como se ha visto, la adición de anticuerpos indujo lisis celular en un periodo de 5 minutos. Resulta interesante que la adición de 2F2 dio como resultado una lisis celular notable de más del 80 % en las cinco líneas de linfocitos B. Rituximab indujo más del 80 % de lisis celular solamente en las líneas celulares SU-DHL-4 y Daudi, mientras que la lisis celular de la línea celular DOHH fue de ~50 % y menos del 20 % en las líneas celulares ARH-77 y Raji. No se

observó lisis con el anticuerpo de control de IgG (datos mostrados solamente en la Figura 11B).

Titulación de suero de CDC: En un conjunto separado de experimentos (n=5), se valoró NHS (suero humano normal) a dos concentraciones de anticuerpo diferentes de 0,5 µg/ml y 5 µg/ml. Las células se preincubaron con 2F2 o rituximab durante 10 minutos, antes de que se añadiera un intervalo de concentración de NHS. A los 45 minutos después de la inducción de CDC, las células se resuspendieron en solución de PI. La lisis celular (número de células positivas para PI) se midió por citometría de flujo. Las Figuras 12A-D muestran el porcentaje de células lisadas (positivas para PI) en función de concentración de NHS. La Figura 12A muestra lisis celular de células Daudi, la Figura 12B, lisis celular de células ARH-77, la Figura 12C, lisis celular de células DOHH, y la Figura 12D, lisis celular de células Raji. Se observó aumento de la lisis de células con aumento de la concentración de NHS. La adición de 2F2 provocó lisis máxima de células Daudi a la mayor concentración de NHS y anticuerpos. Rituximab indujo aproximadamente 50 % de lisis celular de las células Daudi a la mayor concentración de NHS.

En células ARH-77, solamente la mayor concentración de NHS y 2F2 condujo a aproximadamente 75 % de lisis celular. Las concentraciones de anticuerpo más bajas fueron insuficientes para inducir lisis de células ARH-77. Rituximab no fue capaz de inducir lisis celular de células ARH-77 en este experimento.

2F2 fue capaz de inducir lisis celular dependiente de concentración de NHS de células DOHH a la concentración tanto alta como baja, mientras que rituximab no fue capaz de inducir lisis en estas condiciones.

Finalmente, 2F2 indujo lisis dependiente de concentración de NHS de células Raji, que fue evidente solo mediante el uso de mAb 5 µg/ml. No se observó lisis con rituximab.

En estos experimentos, no se observó lisis con el anticuerpo de control de isotipo (datos no mostrados).

Valoración de anticuerpo de CDC: Para medir la capacidad de los anticuerpos anti-CD20 para inducir CDC a bajas concentraciones, se realizó un experimento en el que los anticuerpos se valoraron (n=6). Se preincubaron diversas líneas celulares con un intervalo de concentración de 2F2 y rituximab, respectivamente, durante 10 minutos antes de que se añadiera NHS. Después de 45 minutos de incubación a 37 °C (cuando se produce la lisis máxima) las células se resuspendieron en solución de PI y se midió la lisis celular (número de células positivas para PI) por citometría de flujo. Las Figuras 13A (células Daudi), 13B (DOHH), 13C (células ARH-77) y 13D (células Raji) muestran el porcentaje de células lisadas (positivas para PI) en función de la concentración de anticuerpos. Tanto 2F2 como rituximab indujeron un aumento dependiente de concentración de la lisis celular. 2F2 indujo más del 80 % de lisis de células Daudi tras adición de 2 µg/ml, mientras que con rituximab este nivel no se alcanzó incluso después de la adición de 10 µg/ml. Además, 2F2 indujo más del 80 % de lisis de células DOHH a 0,4 µg/ml, mientras que se observó lisis mínima con rituximab a esta concentración. La lisis máxima de células DOHH con rituximab (~30 % de células totales analizadas) se alcanzó a 10 µg/ml. La inducción de lisis de células ARH-77 y Raji por 2F2 fue más baja, pero aún se alcanzó ~70 % de lisis a una concentración de anticuerpos de 10 µg/ml. A su concentración más alta, rituximab indujo lisis en solamente ~23 % de las células ARH-77 y en solamente ~6 % de células Raji.

En un experimento similar, 2F2, 2F2T, 11B8T y rituximab se investigaron con respecto a su capacidad para inducir CDC de líneas celulares Daudi y Raji, véase Figuras 14A y 14B. También en este experimento se ha observado más del 80 % de lisis de células Daudi con 2F2T (derivado de transfectoma) a 10 µg/ml, mientras que rituximab alcanzó solo el 60 % de lisis incluso a 10 µg/ml, consúltese Figura 14A. La lisis de células Daudi con 2F2T fue idéntica a la lisis obtenida con 2F2 derivado de hibridoma.

La lisis de células Raji fue más difícil, pero de nuevo tanto 2F2 como 2F2T indujeron lisis de células Raji en un grado similar (Figura 14B). Rituximab no fue capaz de inducir CDC de células Raji lo que concuerda con el experimento mostrado en la Figura 13D.

Como puede verse a partir de las Figuras 14A y 14B ni las células Daudi ni las Raji fueron susceptibles de CDC por 11B8T. B1 indujo lisis de células Daudi, pero solo en un grado pequeño, y no fue capaz de inducir lisis de células Raji.

Actividad CDC de anti-CD20 en células Daudi: Para determinar la actividad CDC de cada anticuerpo, se evaluó la permeabilidad de membrana elevada usando análisis de FACS de células teñidas con yoduro de propidio (PI). Brevemente, las células Daudi se lavaron y resuspendieron en RPMI/BSA 1 % a 1×10^6 células/ml. Se añadieron diversas concentraciones de anticuerpos monoclonales humanos a las células Daudi y se permitió que se unieran a CD20 en las células durante 10-15 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se añadió suero como fuente de complemento a una concentración final de 20 % (v/v) y las mezclas se incubaron durante 45 minutos a 37 °C. Las células se mantuvieron después a 4 °C hasta su análisis. Después se añadió cada muestra (150 µl) a 10 µl de solución de PI (10 µg/ml en PBS) en un tubo FACS. La mezcla se evaluó inmediatamente por citometría de flujo. Como se muestra en la Figura 15A, 2F2 y 7D8 mostraron actividad CDC superior en comparación con rituximab.

En un segundo experimento, las células se marcaron con anticuerpos monoclonales humanos como anteriormente,

después se lavaron y se incubaron en PBS durante 45 minutos a 37 °C antes de la adición del suero humano. Esto aseguró que solamente el anticuerpo unido a la célula en el momento de la adición de suero estaba disponible para activar complemento para lisis celular. Como se muestra en la Figura 15B, se descubrió actividad CDC reducida para rituximab en comparación con 2F2 y 7D8 lo que indica que los anticuerpos humanos (2F2 y 7D8) no estaban afectados por el lavado de las células antes de la adición de suero.

Actividad CDC de anti-CD20 en células Raji: La actividad CDC se evaluó usando células Raji que tienen expresión de superficie relativamente alta de CD55 y CD59 y, por lo tanto, son más resistentes a ataque del complemento. Se añadieron anticuerpos humanos a células Raji y se permitió que se unieran durante 15 minutos. Se añadió suero humano (20 %) y las mezclas se incubaron durante 45 minutos a 37 °C. Como se muestra en la Figura 16A, rituximab fue ineficaz en la mediación de CDC de células Raji mientras que se produjeron niveles significativos de lisis celular en células Raji opsonizadas con 2F2 o 7D8. En consecuencia, 2F2 y 7D8 tienen una capacidad única para lisar células diana positivas para CD55/59.

En un experimento separado, las células Raji se preincubaron con concentraciones de saturación de mAb anti-CD55 (concentración final de 5 µg/ml) y mAb anti-CD59 (concentración final de 5 µg/ml) para bloquear los efectos de estas moléculas de defensa del complemento. Se añadieron después anticuerpos anti-CD20 humanos junto con suero (20 %) como anteriormente durante 45 minutos a 37 °C. Como se muestra en la Figura 16B, el bloqueo de moléculas CD55 y CD59 dio como resultado casi 100 % de lisis de células Raji con anticuerpos humanos 2F2 o 7D8 mientras que solo se observó un aumento del 25 % de lisis celular usando rituximab.

Papel de los inhibidores de complemento I – Expresión de moléculas superficiales: Puesto que los inhibidores de complemento tales como CD55 y CD59 parecen desempeñar un papel importante en la susceptibilidad a CDC inducida por rituximab, se realizó un experimento para determinar la expresión de estas moléculas en las líneas de linfocitos B en investigación (Raji, Daudi, DOHH, ARH-77 y SU-DHL-4).

Las células se tiñeron con anticuerpos anti-CD55, anti-CD59 y anti-CD20 conjugados con FITC y se analizó la expresión de moléculas por citometría de flujo. Los resultados se muestran en la Tabla 1 a continuación.

Tabla 1

Expresión	CD20	CD55	CD59
ARH-77	++	++++	++
Raji	+	++	+++
DOHH	++	+++	++
SU-DHL-4	+++	+	++
Daudi	++	+	+

Papel de inhibidores de complemento II – Bloqueo de CD55 y CD59: Para estudiar adicionalmente los papeles de CD55 y CD59 en CDC inducida por anti-CD20, se bloquearon ambas moléculas inhibitoras del complemento por anticuerpos específicos antes de la inducción de CDC (n=3). Se usaron células Raji debido a que solamente se indujo lisis parcial por 2F2 solo. Se preincubaron células Raji (1 x 10⁵ células/50 µl) con un intervalo de concentración de 2F2 y rituximab junto con anticuerpos anti-CD55 (5 µg/ml) o anti-CD59 (5 µg/ml) durante 10 minutos, antes de añadirse NHS (20 %) agrupado. A los 45 minutos después de la inducción de CDC, las células se resuspendieron en solución de PI. Se midió la lisis celular (número de células positivas para PI) por citometría de flujo. Las Figuras 17A-C muestran el porcentaje de células lisadas (positivas para PI) en función de concentración de anticuerpos, y muestra un experimento que es ejemplar de tres experimentos. La Figura 17A muestra incubación de células Raji con anticuerpo anti-CD55, Figura 17B, incubación de células Raji con anticuerpo anti-CD59 y Figura 17C, incubación de células Raji con anticuerpo anti-CD55 y anti-CD59.

Como puede verse en la Figura 17A, la adición de anticuerpo anti-CD55 no influyó en CDC inducida por 2F2 o rituximab. La adición de anticuerpo anti-CD59 aumentó la susceptibilidad de las células tanto a 2D2 como a rituximab con ~30 % (Figura 17B). La adición tanto de anti-CD55 como de anti-CD59 potenció adicionalmente la lisis inducida por anti-CD20 de células con ~30 % (Figura 17C).

Papel de factores de complemento, según se determina por citometría de flujo I – unión de C1q: Se añadieron anticuerpos anti-CD20 (2F2 y rituximab) y un anticuerpo de control de isotipo a diversas líneas de linfocitos B. Después de 10 minutos de incubación, se añadió NHS (1 % v/v). Después de incubación adicional durante 10 minutos a 37 °C y lavado de las células, el sobrenadante se descartó y el sedimento celular se incubó con anticuerpo anti-C1q conjugado con FITC. Los datos muestran la intensidad de fluorescencia media de células teñidas con C1q y se representan en las Figuras 18A (Daudi), 18B (ARH-77), 18C (DOHH) y 18D (Raji) (n=6). Los resultados indicaron aumento dependiente de concentración de anticuerpos de la unión de C1q por 2F2, independientemente de la línea de linfocitos B investigada. Además, la unión de C1q por 2F2 fue siempre mayor que la unión por rituximab, en todas las líneas celulares ensayadas. No se observó aumento de la fluorescencia media con el anticuerpo de control de isotipo (datos no mostrados).

Papel de factores de complemento, como se determina por citometría de flujo II – activación del complemento mediante la ruta clásica: La fijación de C4c con células recubiertas de anticuerpo es una indicación de activación de complemento mediante la ruta clásica. Se añadieron anticuerpos anti-CD20 (2F2 y rituximab) y un anticuerpo de control de isotipo a diversas líneas de linfocitos B. Después de 10 minutos de incubación a 37 °C, se añadió NHS (1 % v/v). Después de incubación adicional y lavado de las células, el sobrenadante se descartó y el sedimento celular se incubó con anticuerpo anti-C4c conjugado con FITC. Los datos muestran intensidad de fluorescencia media de las células teñidas con C4c y se representan en las Figuras 19A (Daudi), 19B (ARH-77), 19C (DOHH) y 19D (Raji) (n=6). Se demostró fijación del factor de complemento C4c con 2F2 en todas las líneas de linfocitos B ensayadas (n=3), alcanzando un máximo a aproximadamente 1 µg/ml de anticuerpo. La fijación de C4c después de unión de 2F2 fue mucho mayor que después de rituximab, independientemente de la línea celular ensayada. No se observó aumento de la fluorescencia media con el anticuerpo de control de isotipo (datos no mostrados).

CDC en suero inactivado por calor: Se preincubaron células (células Daudi, células ARH-77 o células Raji) y anticuerpos (rituximab, 2F2, 2F2T, 11B8 y anticuerpo de control de isotipo HuMab-KLH IgG1) en un intervalo de concentración de anticuerpos anti-CD20 durante 10 minutos, antes de que se añadiera NHS (activo o inactivado por calor en un baño de agua a 57 °C a 30 minutos). A los 45 minutos después de la inducción de CDC, las células se resuspendieron en solución de PI. La lisis celular (número de células positivas para PI) se midió por citometría de flujo. No se observó lisis de las células en presencia de suero inactivado por calor, independientemente de la línea celular y anticuerpo CD20 usado, no se observó CDC en presencia de suero inactivado por calor.

Ejemplo 7 ADCC de Anticuerpos Humanos contra CD20. Ensayo de ADCC I

Enriquecimiento de neutrófilos humanos: Se enriquecieron células polimorfonucleares (neutrófilos, PMN) a partir de sangre completa heparinizada. La sangre se diluyó dos veces en RPMI 1640 y se estratificó en Ficoll (Medio de Separación de Linfocitos 1077g/ml, 710 g, TA, 20 min; BioWhittaker, cat. 17-829E, nº de lote 0148 32) y se centrifugó a 2000 rpm durante 20 minutos. La capa de células mononucleares se retiró y los eritrocitos dentro del sedimento que contenía neutrófilos se lisaron de forma hipotónica usando solución de NH₄Cl helada (NH₄Cl 155 mM, NaHCO₃ 10 mM, EDTA 0,1 mM, pH 7,4). Los neutrófilos restantes se lavaron dos veces y se resuspendieron en RPMI 1640 complementado con FCS 10 % (RPMI-10).

Enriquecimiento de células mononucleares de sangre periférica humana: Se diluyó sangre humana dos veces en RPMI 1640 y las células sanguíneas se estratificaron en Ficoll (Medio de Separación de Linfocitos 1077 g/ml, 710 g, TA, 20 min; BioWhittaker, Cambrex Bio Science Verviers, Verviers, Bélgica, cat. 17-829E, nº de lote 0148 32). Se recogieron células mononucleares de sangre periférica (MNC) de la interfase, se lavaron y se resuspendieron en medio de cultivo RPMI 1640 complementado con FCS 10 %, L-glutamina 2 mM, penicilina 5 U/ml, estreptomycin 50 µg/ml (todos derivados de BioWhittaker) al que se añadió HEPES (BioWhittaker) 25 mM.

Preparación de ADCC: Se marcaron linfocitos B diana (linfocitos B recién aislados o de líneas de linfocitos B) con ⁵¹Cr 20 µCi (Amersham Biosciences, Uppsala, Suecia) durante 2 horas. Después de lavado extensivo en RPMI-10, las células se ajustaron a 1 x 10⁵ células/ml. Se añadió sangre completa o células efectoras aisladas (50 µl; MNC, PMN) o plasma (50 µl), anticuerpos de sensibilización (50 µl) y RPMI-10 (50 µl) a placas de microtitulación de fondo redondo (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Alemania). Se iniciaron los ensayos añadiendo células diana (50 µl) dando un volumen final de 200 µl. Para células efectoras aisladas, se usó una relación de efector y diana (E:T) de 40:1. Para sangre completa, se usó una cantidad de 33 % v/v correspondiente a una relación estimada de efector y diana de 40:1. Después de incubación (3 horas, 37 °C), los ensayos se detuvieron por centrifugación, y se midió la liberación de ⁵¹Cr a partir de triplicados en cuentas por minuto (cpm) en un contador de centelleo. Se calculó el porcentaje de citotoxicidad celular usando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de lisis específica} = (\text{cpm experimental} - \text{cpm basal}) / (\text{cpm máximo} - \text{cpm basal}) \times 100$$

determinándose la liberación de ⁵¹Cr máxima añadiendo ácido perclórico (concentración final 3 %) a células diana y midiéndose la liberación basal en ausencia de anticuerpos de sensibilización y células efectoras.

Estadísticas: Los datos se analizaron por ANOVA de una vía, seguido de ensayo post-hoc de comparación múltiple de Tukey. El análisis se realizó usando Graph Pad Prism (versión 3.02 para Windows, Graph Pad Software, San Diego, CA, Estados Unidos).

Lisis de células ARH-77: En un primer conjunto de experimentos, se usaron células ARH-77 como células diana (Figura 20). La adición de 2F2 (n=3), rituximab (n=3) u 11B8T (n=1) dio como resultado lisis mediada por MNC de células ARH-77 de aproximadamente 50 %. No se observó lisis específica en presencia de neutrófilos. La adición de plasma (para evaluar el papel del complemento) indujo lisis de células ARH-77 después de incubación con 2F2, pero no después de incubación con rituximab (p<0,05, 2F2 frente a sin anticuerpo, ANOVA) u 11B8T. En presencia de sangre completa, la lisis de células ARH-77 aumentó después de la incubación con 2F2 (p<0,05, 2F2 frente a rituximab y 2F2 frente a sin anticuerpo, ANOVA), pero no con rituximab. La lisis específica inducida por rituximab fue de hecho muy baja en presencia de sangre completa. 11B8T indujo lisis celular de aproximadamente 25 % (n=1) en

presencia de sangre completa. En ausencia de anticuerpo, se observó lisis no específica de 10-15 %.

Lisis de células B-CLL: En un segundo conjunto de experimentos, se subclonaron células de leucemia linfocítica B crónica (B-CLL) obtenidas de pacientes con B-CLL (n=12) durante 5 ciclos y después se usaron como células diana en el experimento (Figura 21). En ausencia de anticuerpo, no se observó lisis específica, pero la adición de 2F2, 11B8T o rituximab (10 µg/ml) aumentó la lisis específica mediada por MNC a 10-20 % (p<0,001, ANOVA). La incubación de células diana con plasma y 2F2 indujo lisis específica de células B-CLL, mientras que no se observó lisis específica con 11B8T o rituximab (p<0,001, ANOVA). Además, 2F2 medió en la lisis específica de células B-CLL después de incubación en sangre completa. No se observó lisis específica de células B-CLL por sangre completa con 11B8T (p<0,01, ANOVA) o rituximab (p<0,001, ANOVA). No se observó lisis específica en presencia de neutrófilos.

Debido a que rituximab fue capaz de mediar en ADCC eficaz pero no CDC de las células tumorales ensayadas, es probable que la lisis de linfocitos B inducida por sangre completa por 2F2 esté mediada mediante complemento.

Lisis de células de tricoleucemia (HCL): En un tercer conjunto de experimentos se determinó lisis de células HCL por 2F2, 11B8T y rituximab por ADCC o en presencia de plasma o sangre completa. Los datos se muestran en la Figura 22. Mientras que los neutrófilos no podían mediar en ADCC independientemente del mAb usado, 11B8T fue capaz de inducir lisis mediada por MNC de células HCL de forma más eficaz que 2F2 (p<0,001, ANOVA) o rituximab (p<0,05, ANOVA). 2F2 y rituximab no fueron capaces de inducir lisis mediada por MNC de células HCL. La lisis mediada por plasma de las células se potenció en gran medida con 2F2, en comparación con rituximab (p<0,05, ANOVA), 11B8T (p<0,01, ANOVA) o sin anticuerpo (p<0,001, ANOVA). Cuando se estudió lisis inducida por anti-CD20 en presencia de sangre completa, 2F2 indujo lisis completa de las células, y fue superior a rituximab (p<0,01, ANOVA), 11B8T o sin anticuerpo añadido (p<0,001, ANOVA).

Lisis de células B-ALL: Usando células de dos pacientes se investigó la capacidad de 2F2 y rituximab para inducir lisis de células B-ALL por ADCC o complemento (Figura 23). Como se observó en los experimentos anteriores, 2F2 y rituximab indujeron ADCC mediada por MNC de células B-ALL en un grado similar. Sin embargo de nuevo 2F2 fue capaz de inducir lisis mediada por plasma y sangre completa de células B-ALL, mientras que rituximab no.

Lisis de células de linfoma folicular: Cuando se investigó lisis de células de linfoma foliculares (n=2), surgió una situación diferente (Figura 24). Se observó una lisis mediada por PMN menor de células con 2F2 y ni 2F2 ni rituximab fueron capaces de inducir ADCC mediada por MNC. 11B8T aún fue capaz de inducir lisis mediada por MNC de aproximadamente 20 %. Aunque se indujo una lisis mediada por plasma relativamente alta por rituximab, se observó lisis mediada por plasma completa con 2F2. Además, con sangre completa se observó lisis completa con 2F2, mientras que se observó 70 % de lisis con rituximab. Se observó lisis mediada por plasma o sangre completa mínima por 11B8T.

Lisis de células de linfoma de células de manto primarias: Fue más difícil inducir lisis específica de células de linfoma de células de manto (n=1, Figura 25). Se observó lisis mínima o ninguna por 2F2, 11B8T o rituximab después de adición de PMN o MNC y mAb de CD20. Sin embargo, 2F2 aún fue capaz de inducir aproximadamente 40 % de lisis por plasma o sangre completa, mientras que con rituximab solo se lisaron 10-20 % de las células. 11B8T no fue capaz de inducir lisis de células de linfoma de células de manto primario.

Lisis dependiente de concentración de anticuerpo de células ARH-77 en sangre completa: En un experimento adicional (n=4) se analizó la dependencia de dosis con respecto a la inducción de ADCC en células ARH-77 en presencia de sangre completa. Como puede verse en la Figura 26, la valoración de 2F2 indujo un aumento dependiente de dosis del porcentaje de lisis específica (p<0,05: tratamiento-efecto, ANOVA de dos vías) de células ARH-77. No se observó lisis específica de células ARH-77 con rituximab.

Ensayo de ADCC II

Preparación de células diana marcadas con ⁵¹Cr: Se recogieron células ARH-77 y células Raji (3 x 10⁶ células) en RPMI++, se sedimentaron por centrifugación (1500 rpm; 5 minutos), se resuspendieron en 140 µl de ⁵¹Cr (Cromo-51; CJS11-1mCi, lote 12; 140 µl es aproximadamente 100 µCi) y se incubaron (baño de agua a 37 °C; 1 hora). Después de lavar las células (1500 rpm, 5 minutos, en PBS, 3x) las células se resuspendieron en RPMI++ y se contaron por exclusión de azul de tripano. Las células se llevaron a concentración de 2 x 10⁴ células/ml.

Preparación de células efectoras: Se aislaron células mononucleares de sangre periférica nueva (MNC) a partir de 40 ml de sangre con heparina por Ficoll (Bio Whittaker; medio de separación de linfocitos, cat 17-829E) según las instrucciones del fabricante. Después de resuspensión de células en RPMI++, las células se contaron por exclusión de azul de tripano y se ajustaron a una concentración de 1 x 10⁶ células/ml.

Preparación de ADCC: Se pipetearon 50 µl de RPMI++ en placas de 96 pocillos y se añadieron 50 µl de células diana marcadas con ⁵¹Cr. A continuación, se añadieron 50 µl de anticuerpo, se diluyeron en RPMI++

(concentraciones finales 10, 1, 0,1, 0,01 µg/ml). Se incubaron células (TA, 10 minutos) y se añadieron 50 µl de células efectoras, dando como resultado una relación de efector y diana de 50:1 (para determinación de lisis máxima se añadieron 50 µl de Triton-X-100 5 % en lugar de células efectoras). Las células se sedimentaron por centrifugación (500 rpm, 5 minutos) y se incubaron (37 °C, CO₂ 5 %, 4 horas). Después de sedimentar por centrifugación las células (1500 rpm, 5 minutos), se recogieron 100 µl de sobrenadante en tubos micrónicos, y se contaron en contador gamma. El porcentaje de lisis específica se calculó como sigue:

$$\% \text{ de lisis específica} = (\text{cpm de muestra} - \text{cpm de células diana solamente}) / (\text{cpm de lisis máxima} - \text{cpm de células diana solamente}) \times 100$$

Estadística: Los datos se analizaron por ANOVA de una vía, seguido de ensayo post-hoc de comparación múltiple de Tukey. El análisis se realizó usando Graph Pad Prism (versión 3.02 para Windows, Graph Pad Software, San Diego, CA, Estados Unidos).

Lisis dependiente de concentración de anticuerpos de células ARH-77 y Raji: 2F2T y 11B8T se ensayaron con respecto a su capacidad para inducir ADCC de células ARH-77 y Raji (n=3) en comparación con rituximab.

Se observó una relación de efecto-dosis con mAb de CD20 en ADCC de células ARH-77 usando MNC como células efectoras (Figura 27). Tanto 2F2T como 11B8T indujeron lisis específica de células ARH-77 que era máxima (50 %) a 10 µg/ml de mAb. Rituximab indujo solamente 25 % de lisis de las células diana. La adición del anticuerpo de control de isotipo (HuMab-KLH) no indujo ADCC. No se observó lisis específica sin adición de MNC (datos no mostrados).

Cuando se usaron células Raji como células diana, apareció una situación similar a con células ARH-77 (Figura 28). Tanto 2F2T como 11B8T indujeron lisis mediadas por MNC de células Raji, aunque 2F2T parecía más potente que 11B8T a concentraciones bajas. La lisis máxima alcanzada con 2F2T y 11B8T fue de aproximadamente 35 %. Rituximab indujo lisis mediada por MNC de células Raji, aunque solo el 20 % de las células diana eran susceptibles para rituximab. La adición del anticuerpo de control de isotipo (HuMab-KLH) no indujo ADCC. No se observó lisis específica sin adición de MNC (datos no mostrados).

Ejemplo 8 Análisis de insolubilidad de FRET y Triton-X

Preparación de mAb conjugado con Cy3 y Cy5 para transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET): Los anticuerpos monoclonales se conjugaron directamente con derivados de éster de NHS bifuncionales de Cy3 y Cy5 (Amserham Biosciences UK Ltd) como se describe en las instrucciones del fabricante. Brevemente, se dializaron mAb contra tampón de bicarbonato/carbonato 0,1 M (pH 9). A continuación, el colorante se disolvió en H₂O, se añadió inmediatamente a 1 mg del mAb y se incubó a temperatura ambiente en oscuridad durante 45 minutos. Los mAb marcados se separaron del colorante no conjugado por cromatografía en gel usando una columna PD10-Sephadex G25 equilibrada en PBS. Se determinaron relaciones molares de acoplamiento de manera espectrofotométrica desde $\epsilon_{552} = 150/\text{mM}/\text{cm}$ para Cy3, $\epsilon_{650} = 250/\text{mM}/\text{cm}$ para Cy5, y $\epsilon_{280} = 170/\text{mM}/\text{cm}$ para proteína, y varió de 5 a 8 veces de colorante en exceso:proteína.

Análisis de FRET: Las células Daudi se resuspendieron a 5×10^6 células/ml en PBS/BSA 0,1 % y se combinaron mAb equimolares conjugados con donador (Cy3) y conjugado con aceptor (Cy5) y se añadieron a la suspensión celular (concentración final 10 µg/ml). Las células se incubaron durante 30 minutos en oscuridad, a 4 °C o 37 °C. Cada experimento incluyó células marcadas con mAb conjugado con donador y aceptor después de preincubación con un exceso molar 20 veces de mAb no conjugado, y células marcadas con mAb conjugado con donador o aceptor en presencia de mAb no marcado equimolar. Para evaluar la asociación de antígenos marcados, se llevó a cabo medición de FRET de citometría de flujo usando un FACScalibur (BD Biosciences). Las intensidades de fluorescencia a 585 nm (FL2) y 650 nm (FL3), ambos excitados a 488 nm, y las intensidades de fluorescencia a 661 nm (FL4), excitado a 635 nm, se detectaron y se usaron para calcular FRET de acuerdo con la ecuación a continuación, en la que A es aceptor (Cy5) y D es donador (Cy3). Todos los valores obtenidos se corrigieron para autofluorescencia usando la siguiente fórmula:

$$\text{FRET} = \text{FL3(D,A)} - \text{FL2(D,A)} / \text{a} - \text{FL4(D,A)} / \text{b}$$

en la que $\text{a} = \text{FL2(D)} / \text{FL3(D)}$ y $\text{b} = \text{FL4(A)} / \text{FL3(A)}$

Se obtuvieron parámetros de corrección usando datos recogidos de células de marcaje sencillo y se usó dispersión de la luz de ángulo lateral para separar por selección residuos y células muertas. La FRET entre derivados de mAb donador y aceptor en células marcadas de forma dual se expresa con respecto a emisión sensibilizada del aceptor a 488 nm. Los valores de FRET mayores indican asociación física más cercana de los anticuerpos marcados con donador y aceptor o una mayor densidad de mAb marcado con aceptor en las cercanías de mAb marcado con donador.

Evaluación de antígeno asociado con balsa por insolubilidad en Triton X-100 (TX): Como una evaluación rápida de la presencia de antígeno en microdominios de balsa, se usó un método de citometría de flujo basado en insolubilidad en Triton X-100 (TX) a temperaturas bajas, como se ha descrito previamente. Brevemente, se lavaron células Daudi en RPMI/BSA 1 % y se resuspendieron a $2,5 \times 10^6$ /ml. Las células (100 μ l) se incubaron después con mAb conjugado con FITC 10 μ g/ml durante 15 minutos a 37 °C, se lavó en PBS frío/BSA 1 %/azida sódica 20 mM (PBS-BS) y la muestra se dividió por la mitad. Todas las muestras se mantuvieron en hielo durante el resto del ensayo. Una mitad se mantuvo en hielo para permitir el cálculo del 100 % de los niveles de antígeno de superficie, mientras que la otra se trató con TX 0,5 % durante 15 minutos en hielo para determinar la proporción de antígenos restantes en la fracción de balsa insoluble. Las células se mantuvieron después a 4 °C durante el resto del ensayo, se lavaron una vez en PBS-BS, se resuspendieron en PBS-BS y se evaluaron por citometría de flujo. Para determinar el nivel constitutivo de asociación con balsa de los antígenos diana, las células se trataron primero con TX 0,5 % durante 15 minutos en hielo y se lavaron en PBS-BS antes de unión de mAb marcado con FITC.

Como se muestra en las Figuras 29A, 29B y 29, el análisis de transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET) indica agrupamiento de CD20 tras incubación con 2F2 o 7D8. No se observó tal agrupamiento tras incubación con 11B8. Estos resultados son coherentes con los datos de tratamiento de TX, consúltese Figura 29C (es decir, 2F2 y 7D8, a diferencia de 11B8 permanecen con la fracción insoluble de la célula después de la unión) y apoyan el concepto de que 2F2 y 7D8, tras la unión, traslocan CD20 al compartimento de balsa lipídica de la membrana de linfocitos B.

Como se muestra en la Figura 30 (valores de FRET y e.t.m. de tres experimentos usando ANOVA de una vía seguido de ensayo post-hoc de comparación múltiple de Tukey) el análisis de FRET indica agrupamiento de rituximab y 2F2, mientras que no se observó agrupamiento con 11B8T. Estos datos están de acuerdo con los datos obtenidos tras el tratamiento con TX 0,5 % antes de unión de mAb marcados con FITC como se muestra en la Figura 31 (n=2).

Preparación de fracciones de balsa lipídica y transferencia de Western: Otra forma de examinar la asociación de CD20 con balsas lipídicas, es investigar la distribución de CD20 entre las fracciones de membrana con balsa y sin balsa usando el método de fraccionamiento de gradiente de sacarosa como se describe en Deans, J. P., *et al.*, J. Biol. Chem., 1998. 273(1): pp 344-348, excepto que se usó Optiprep (Sigma) en lugar de sacarosa. Se permitió que los anticuerpos monoclonales contra CD20 (10 μ g/ml) se unieran a células Daudi (1×10^7) durante 20 minutos a 37 °C. Después de esta incubación, las células se sedimentaron, se lavaron dos veces con PBS y se lisaron en tampón de lisis helado (TX 1,0 % en solución salina tamponada con MES (MES 25 mM, pH 6,5, NaCl 150 mM, fluoruro de fenilmetilsulfonilo 1 mM, aprotinina 5 μ g/ml, leupeptina 5 μ g/ml, EDTA 10 mM)). El sedimento celular se resuspendió minuciosamente y se incubó durante 20 minutos en hielo. A continuación, el lisado se mezcló con 400 μ l de Optiprep 60 % frío (Sigma). Sobre la muestra se superpuso una etapa de 600 μ l de cada Optiprep 35 %, 30 %, 25 %, 20 %, 0 % en tampón de lisis. Los gradientes se centrifugaron a 40.000 rpm a 4 °C durante 18 horas. Se recogieron seis fracciones de la parte superior, se resolvieron en un gel SDS-PAGE 4-15 %, se transfirieron a membranas de nitrocelulosa y se incubaron con anticuerpo primario (polisueros anti-CD20 de ratón; Serotec, Reino Unido), seguido de anticuerpo secundario conjugado con HRP (HRP anti ratón de conejo; Jackson, Bar Harbor, Maine, Estados Unidos). Las manchas de transferencia se visualizaron usando sustrato de duración prolongada Supersignal West Dura (Pierce, Woburn, MA, Estados Unidos).

Los resultados se muestran en la Figura 32. Como puede verse, las moléculas de CD20 están confinadas en la fracción de alta densidad 5 (células no tratadas). Las células tratadas con rituximab mostraron un desplazamiento definido de la distribución de CD20 con una proporción significativa en las fracciones de membrana de menor densidad 2 y 3, coincidente con la fracción en la que se espera que las balsas de membrana sedimenten. Las células tratadas con 2F2 también mostraron este desplazamiento a las fracciones 2 y 3. Por el contrario, las células tratadas con 11B8T durante 20 minutos mostraron una distribución similar a las células no tratadas, con moléculas CD20 en la fracción 5. En conclusión la unión con 2F2 y rituximab induce un desplazamiento de las moléculas de CD20 a las fracciones de membrana de menor densidad, mientras que la unión a 11B8T no.

Ejemplo 9 Apoptosis de Líneas Celulares de Burkitt con Anticuerpos Humanos Contra CD20

Apoptosis: Se situaron células Daudi, $0,5 \times 10^6$ en 1 ml de medio de cultivo tisular, en placas de fondo plano de 24 pocillos con mAb o anticuerpos de control 1 o 10 μ g/ml, y se incubaron a 37 °C. Después de 20 horas, las células se recogieron, se lavaron en tampón de unión de Anexina-V-FITC (BD biosciences) y se marcaron con Anexina V-FITC (BD biosciences) durante 15 minutos en oscuridad a 4 °C. Las células se mantuvieron a 4 °C hasta su análisis. Cada muestra (150 μ l) se añadió a 10 μ l de solución de PI (10 μ g/ml en PBS) en un tubo de FACS. La mezcla se evaluó inmediatamente por citometría de flujo usando un citómetro de flujo FACScalibur con software CellQuest pro (BD Biosciences, Mountain view, CA). Se recogieron al menos 10.000 acontecimientos para análisis.

Inducción de apoptosis en células Daudi: Se incubaron células Daudi durante 20 horas en presencia de anticuerpos humanos contra CD20 (1 μ g/ml) (sin la adición de un anticuerpo de entrecruzamiento secundario). La inducción de apoptosis se evaluó por tinción con Anexina V/PI usando citometría de flujo.

Como se muestra en las Figuras 33A-G, 11B8 muestra claras pruebas de inducción de apoptosis (similar a la inducida por un anticuerpo anti-IgM). 2F2 y 7D8 no indujeron apoptosis de células Daudi. Se usó un anticuerpo anti-CD20 de ratón inductor de apoptosis, AT80, como control.

5 *Inducción de apoptosis en células Raji:* La inducción de apoptosis de células Raji se ensayó con un intervalo de concentración de mAb de CD20. La Figura 34 muestra el porcentaje de células positivas para Anexina V. Como puede verse a partir de la Figura 34, el mAb anti-CD20 humano de ratón de control positivo, B1, indujo un aumento dependiente de concentración de la apoptosis de células Raji con un máximo de aproximadamente 70 % a mAb 10 $\mu\text{g/ml}$. Además 11B8 fue un fuerte inductor de apoptosis, dando como resultado apoptosis de células Raji con un máximo de 53,4 % a mAb 10 $\mu\text{g/ml}$. Por otro lado, 2F2 y rituximab indujeron muy poca apoptosis de células Raji, con niveles ligeramente elevados de apoptosis en comparación con niveles de control negativo.

15 *Inducción de apoptosis en células Daudi:* Surgió la misma situación cuando se usaron células Daudi como células diana, después de adición de mAb de CD20 1,0 $\mu\text{g/ml}$ (Figuras 35A y 35B). Los datos de la Figura 35A muestran el total de células positivas para anexina-V, y los datos de la Figura 35B (mostrando el eje X anexina-V y mostrando el eje Y PI) muestran los porcentajes de células Daudi en apoptosis temprana (positiva para anexina V y negativa para PI) y apoptosis tardía (positiva para anexina V y positiva para PI). De nuevo, tanto B1 (65,9 %) como 11B8T (56,3 %) fueron fuertes inductores de apoptosis (Figura 36), cuando se usaron a una concentración de 1,0 $\mu\text{g/ml}$. La adición de 2F2T dio como resultado bajo nivel de células Daudi apoptóticas (17 %). La adición de rituximab dio como resultado 29 % de apoptosis de células Daudi. La adición de anticuerpo de control de isotipo HuMab-KLH no indujo apoptosis de células Daudi (6 %).

25 **Ejemplo 10 Adhesión Homotípica de Células con Anticuerpos Humanos Contra CD20**

La agregación homotípica se correlaciona con inducción de apoptosis. Por lo tanto, se investigó la capacidad de los mAb anti-CD20 para inducir agregación homotípica de linfocitos B.

30 *Agregación homotípica de células Ramos-EHRB:* Se incubaron células Ramos-EHRB ($0,5 \times 10^6$ en 1 ml de medio de cultivo tisular) a 37 °C durante 4 horas en presencia de anticuerpos anti-CD20 11B8, 2F2 o 7D8 (sin entrecruzamiento) y se evaluó la inducción de adhesión homotípica por microscopía óptica (como se ha descrito anteriormente).

35 Como se muestra en las Figuras 36A-E, 11B8 provocó agregación extensiva de células Ramos-EHRB (similar a la agregación causada por anticuerpo anti-CD20 murino, AT80). 2F2 y 7D8 no indujeron agregación homotípica de células Ramos.

40 *Agregación homotípica de células Daudi:* Se colocaron células Daudi en placas de fondo plano de 24 pocillos con mAb anti-CD20 o anticuerpo de control 1 o 10 $\mu\text{g/ml}$, y se incubaron a 37 °C durante 4 horas. El alcance de la agregación homotípica se determinó por microscopía óptica. Como puede verse a partir de la Figura 37, 2F2 apenas indujo agregación homotípica de células Daudi, con 1,0 $\mu\text{g/ml}$ (y 10 $\mu\text{g/ml}$, datos no mostrados). Rituximab dio poca agregación homotípica de células Daudi. Por el contrario, el anticuerpo B1 fue un fuerte inductor de agregación homotípica.

45 **Ejemplo 11 Inmunoterapia Usando Anticuerpos Humanos Contra CD20**

50 *Terapia con dosis alta (100 μg) de 2F2 y 7D8 de ratones SCID puestos en contacto con células Daudi:* Los ratones SCID se obtuvieron de Harlan UK Ltd., Blackthorn, Oxon, Reino Unido, y se criaron y mantuvieron en condiciones sin patógenos. Las células Daudi ($2,5 \times 10^6$) se inyectaron i.v. en la vena de la cola de cohortes de ratones SCID de 12-16 semanas de edad, seguido 7 días después de inyección de 100 μg de 2F2 o 7D8 por la misma vía. Los animales se sacrificaron tras la presentación de parálisis de las extremidades, de acuerdo con las instrucciones del comité de ética animal. Como se muestra en la Figura 38, la supervivencia de los ratones se prolonga después del tratamiento con 2F2 o 7D8.

55 *Terapia con dosis altas (100 μg) de 2F2 y rituximab de ratones SCID puestos en contacto con células Tanoue:* Las células Tanoue ($2,5 \times 10^6$ en 200 μl de PBS) se inyectaron i.v. en la vena de la cola de cohortes de ratones SCID de 12-16 semanas de edad (Harlan UK Ltd., Blackthorn, Oxon, Reino Unido) seguido 7 días después de la inyección de 100 μg (en 200 μl de PBS) de mAb anti-CD20 por la misma vía. En este experimento, 2F2 se comparó con rituximab y B1. Los animales se sacrificaron tras la presentación de parálisis de las extremidades posteriores. Los resultados se muestran en la Figura 39. El día 39, los primeros dos ratones de control murieron y la muerte dentro de este grupo fue completa el día 54. Solamente un ratón murió dentro de este intervalo de tiempo después de tratamiento con 2F2 y la supervivencia aumentó considerablemente para los otros ratones en este grupo. Un ratón murió 81 días después de la inyección de las células tumorales y los ratones restantes (60 % del número total) sobrevivieron después de la terminación del experimento a los 100 días después de la presentación del tumor. Rituximab por el contrario solamente aumentó la supervivencia en 2 de 5 ratones (que murieron a los 66 y 83 días después de la

presentación) y ninguno de los ratones sobrevivió hasta el final del experimento. En el grupo de B1, la supervivencia de los ratones SCID fue similar a la del grupo 2F2, muriendo dos ratones el día 48 y un ratón el día 76. En este grupo, el cuarenta por ciento estaba vivo en el momento en que terminó el experimento.

5 *Respuesta a dosis de tratamiento con 2F2 y rituximab de ratones SCID puestos en contacto con células Daudi:* Para evaluar la eficacia de 2F2 en comparación con rituximab en la protección contra tumorigénesis, se realizó una valoración de dosis en terapia de ratones SCID puestos en contacto con células tumorales Daudi. Las células Daudi expresan más CD20 que las células Tanoue y son más sensibles a destrucción *in vitro*. Se inyectaron a 10 grupos de ratones SCID (4 por grupo) y 1 grupo de control (5 ratones SCID) 2,5 x 10⁶ células Daudi (en 200 µl de PBS) i.v. el día 0 y después se trataron con 20, 5, 2, 0,5 o 0,1 µg en 200 µl de PBS) de rituximab, 2F2 o PBS (control) i.v. el día 7. Los animales se sacrificaron tras la presentación de parálisis de las extremidades posteriores. Los resultados se muestran en la Figura 40.

15 En el grupo de control, todos los ratones murieron dentro del intervalo de tiempo de 26-29 días. Sin embargo, se observó una clara relación efecto-dosis con 2F2 (Figura 40, gráfico superior). Mientras que no se observó efecto con dosis de 0,1 µg y 0,5 µg de 2F2, una cantidad tan baja como 2 µg de 2F2 prolongó sustancialmente la supervivencia hasta el día 41, 5 µg de 2F2 prolongó la supervivencia hasta el día 47 y 20 µg de 2F2 prolongó la supervivencia incluso hasta el día 50.

20 Por el contrario, rituximab, incluso ensayado a la dosis más alta de 20 µg, solo aumentó ligeramente la supervivencia y no se observó por lo tanto relación de efecto-dosis a las concentraciones más bajas ensayadas (Figura 40, gráfico inferior).

25 *Terapia de ratones SCID con tumores Daudi por 11B8T y B1:* Se inyectaron células Daudi (2,5 x 10⁶) en 200 µl de PBS i.v. en la vena de la cola de cohortes de ratones SCID de 12-16 semanas de edad, seguido 7 días después de la inyección de 100 µg de 11B8 o B1 en 200 µl de PBS mediante la misma vía. Los animales se sacrificaron tras la presentación de parálisis de las extremidades posteriores. En los ratones de control tratados con PBS, todos los ratones murieron dentro de un intervalo de tiempo de 35-53 días (Figura 41). El tratamiento con 11B8T protegió en gran medida los ratones, muriendo los ratones entre 72 y 98 días después de la presentación del tumor. En el grupo de tratamiento de B1, la mayoría de los ratones sobrevivieron hasta el día 98 y el 40 % de los ratones sobrevivió más allá del final del experimento, es decir, el día 100.

Ejemplo 12 Evaluación de anticuerpos anti-CD20 en un modelo de xenotrasplante de Daudi-luc usando ratones SCID

35 La eficacia terapéutica de anticuerpos anti-CD20 se evaluó en un modelo de ratón en el que el crecimiento diseminado de células de tumor de linfocitos B humanos se sigue usando formación de imágenes ópticas externa. En este modelo las células tumorales se transfectan con luciferasa de luciérnaga. Tras la administración de luciferina (Molecular Probes, Leiden, Países Bajos) a los ratones, las células marcadas pueden detectarse *in vivo* por formación de imágenes bioluminiscente usando una cámara CCD altamente sensible, consúltese Wetterwald *et al.* (2002) American Journal of Pathology, 160(3): 1143-1153.

45 Las células Daudi se transfectaron con luciferasa gWIZ de Gene Therapy Systems (San Diego, CA) y se cultivaron en RPMI con FCS 10 %, Pen/Strep, Piruvato Sódico y puromicina 1 µg/ml (Sigma). Las células se analizaron con respecto a expresión de luciferasa (expresada en URL/1 x 10⁵ células) en un luminómetro y con respecto a expresión de CD20 por FACS. Se inyectaron 2,5 x 10⁶ células Daudi transfectadas con luciferasa/ratón i.v. en ratones SCID. Ocho días después de la inoculación, los ratones recibieron un tratamiento de dosis sencilla (10 µg) de 2F2T, 11B8T, rituximab, B1 o anticuerpo de control de isotipo (hulgGI) (6 ratones por grupo de tratamiento). Para formación de imágenes, los ratones se anestesiaron por inyección i.p. de una mezcla de ketamina/xilacina/atropina. Se proporcionó luciferina D sintética (sal sódica, Molecular Probes) i.p. a una dosis de 25 mg/ml. Los ratones se colocaron después en una caja opaca a la luz y después de 3 minutos, se inició la toma de imágenes usando un detector de CCD enfriado con nitrógeno líquido VersArray 1300B (Roper Scientific). Los fotones emitidos por la luciferasa se contaron durante un periodo de exposición de 5 minutos. Bajo iluminación se tomaron imágenes en blanco y negro para referencia. Se usó software MetaVue (Universal Imaging Corp) para recogida de datos y análisis de imágenes. La significación estadística de diferencias entre grupos se estableció usando análisis de una vía de varianza con un ensayo posterior Newman-Keuls usando GraphPad PRISM versión 3.02 (Graphpad Software Inc).

60 La toma de imágenes de la parte posterior se realizó a intervalos de una semana. El día 8, el día del tratamiento, solo se detectó emisión de luz en los sitios de inoculación en la cola. Se detectó formación de tumores en sitios distantes el día 14 en todos los ratones del grupo de control de isotipo (hulgGI) y en un ratón del grupo de rituximab. Las siguientes semanas aumentó de forma continua la emisión de luz. La Figura 42 proporciona las imágenes de todos los ratones tomadas el día 39 (31 días después del tratamiento), en las que la bioluminiscencia está representada en color rojo (las áreas oscuras en los ratones) (intensidad de luz > 50 fotones por cada 5 minutos) como superposición en la imagen del cuerpo en blanco y negro del ratón. La masa tumoral en cada ratón se cuantificó el día 25, 32, 39 y 46 integrando las señales luminosas sobre la superficie corporal, consúltese Figura 43.

65

El crecimiento de tumor más rápido se observó en el grupo de control de isotipo. El tratamiento con rituximab proporcionó inhibición significativa del crecimiento tumoral. Sin embargo, la inhibición del crecimiento tumoral por 2F2T, 11B8T y B1 fue significativamente más potente (véase Tabla 2 posterior para nivel de significación).

5

Tabla 2
Niveles de significación de diferencias de la intensidad de luz integrada entre grupos en diferentes puntos temporales

	Día 25	Día 32	Día 39	Día 46
B1 vs. rituximab	P > 0,05	P < 0,05	P < 0,01	P < 0,001
B1 vs. 11B8T	P > 0,05	P > 0,05	P > 0,05	P > 0,05
B1 vs. 2F2T	P > 0,05	P > 0,05	P > 0,05	P > 0,05
B1 vs. hulgI	P < 0,001	P < 0,001	P < 0,001	
rituximab vs. 11B8T	P > 0,05	P < 0,05	P < 0,01	P < 0,001
rituximab vs. 2F2T	P > 0,05	P > 0,05	P > 0,05	P < 0,001
rituximab vs. hulgI	P < 0,001	P > 0,05	P < 0,05	
11B8T vs. 2F2T	P > 0,05	P > 0,05	P > 0,05	P > 0,05
11B8T vs. hulgI	P < 0,001	P < 0,001	P < 0,001	
2F2T vs. hulgI	P < 0,001	P < 0,01	P < 0,01	

Ejemplo 13 Estudio piloto y de farmacocinética en monos cynomolgus

10

El objetivo fue determinar el patrón farmacocinético y los efectos farmacológicos de 2F2 en monos cynomolgus (de aproximadamente 2 años de edad; intervalo de peso 2,1-2,6 kg) después de administraciones de infusión intravenosa una vez diaria (a través de la vena safena) durante 4 días consecutivos. El estudio también comparó los efectos farmacológicos de rituximab para determinar su potencial equivalente. Para este fin, se asignaron 6 monos cynomolgus macho y 6 hembra a 6 grupos de dosis que recibieron 2F2 o rituximab a niveles de dosis de 1,25, 6,25 y 12,5 mg/kg/día a un volumen de dosis constante de 10 ml/kg durante 4 días consecutivos. En total 5, 25 y 50 mg/kg respectivamente. Tras la completación de la última administración de dosis, los animales se conservaron durante un periodo de observación postdosis de 130 días. Las prácticas y procedimientos adoptados durante este estudio fueron coherentes con los Principios de Buena Práctica de Laboratorio de OECD como están expuestos por el Departamento de Salud del Reino Unido. Todos los animales se observaron a intervalos regulares con respecto a señales de mala salud o reacción al tratamiento y se sometieron a un examen físico. Se realizaron investigaciones de laboratorio de hematología, coagulación, química clínica y análisis de orina durante el estudio. Se obtuvieron muestras de sangre y biopsias de ganglios linfáticos (de los ganglios linfáticos superficiales) para análisis de citometría de flujo a lo largo de los periodos de observación de dosificación y postdosis. Los siguientes fenotipos celulares se analizaron por citometría de flujo: CD3, CD4, CD8, CD20 y CD21. Tras la completación del periodo de observación postdosis los animales se sacrificaron y se sometieron a una necropsia detallada.

15

20

25

No hubo señales clínicas adversas o ningún hallazgo que se considerara que estaba relacionado con el tratamiento con 2F2 o rituximab. Las Figuras 44 y 45 muestran el análisis de citometría de flujo de células que expresan CD20 y CD21 en sangre periférica de animales tratados, respectivamente. La Figura 46 muestra el análisis de citometría de flujo de células que expresan CD20 en ganglios linfáticos. Juntos, ambos fenotipos analizados durante el estudio indican una reducción fuerte y eficaz del número de linfocitos B después de la administración de 2F2 y rituximab a 6,25 mg/kg/día (25 mg/kg en total) y 12,5 mg/kg/día (50 mg/kg en total). Además, los datos muestran que la repoblación de células que expresan CD20 en los ganglios linfáticos y sangre periférica de animales tratados con 2F2 comenzó otra vez aproximadamente el día 75 después de la dosificación de 25 mg/kg y 50 mg/kg, es decir, notablemente más tarde que en animales tratados con rituximab.

30

35

Además, las Figuras 47A-C muestran el análisis de citometría de flujo de subpoblaciones de células que expresan CD20^{bajo}CD23⁺CD40^{alto} en la sangre periférica (Y. Vugmeyster *et al.* (2003) *Cytometry* 52A: 101-109).

40

Las células de sangre periférica obtenidas de monos tratados con 2F2 o rituximab a niveles de dosis de 1,25 mg/kg (Figura 47A), 6,25 mg/kg (Figura 47B) y 12,5 mg/kg (Figura 47C) una vez al día por administraciones de infusión intravenosa durante 4 días consecutivos se incubaron con anticuerpo monoclonal murino FITC anti-CD20 humano (Coulter) a temperatura ambiente durante 10 minutos. Después, se añadieron perlas de conteo junto con PBS y las células se lavaron dos veces (300 g durante 10 minutos), seguido de análisis inmediato de subpoblación de células que expresan CD20^{bajo}CD23⁺CD40^{alto} frente a CD20^{alto} CD23⁺CD40^{bajo} en un citómetro de flujo (Beckman Coulter). Los resultados de células CD20^{bajo} CD23⁺CD40^{alto} mostradas se expresan como células por μ l. Como puede verse a partir de la Figura 47, 2F2 fue capaz de inducir una reducción completa y más larga del número de células que expresan CD20^{bajo}CD23⁺CD40^{alto} en comparación con rituximab.

45

50

Ejemplo 14 Mapeo de epítomos usando mutagénesis dirigida

Los estudios de mapeo de epítomos usando un enfoque de mutagénesis han indicado que la alanina en la posición 170 (A170) y prolina en la posición 172 (P172) en el segundo bucle extracelular son críticas para el reconocimiento de CD20 humano por anticuerpos anti-CD20 conocidos. En los estudios de Deans y colaboradores (M. J. Polyak, *et*

55

al., Blood, (2002) 99(9): pp 3256-3262; M. J. Polyak, *et al.*, J. Immunol., (1998) 161 (7): pp 3242-3248) la unión de todos los mAb anti-CD20 ensayados se anuló cambiando A170 y P172 a los restos de CD20 murinos correspondientes S170 y S172. Se ha reconocido algo de heterogeneidad en el reconocimiento del epítipo AxP, sin embargo, puesto que la mayoría de los anticuerpos como rituximab reconocen CD20 murino con S170 y S172 mutados a la secuencia A170 x P172 humana mientras que algunos otros requieren mutaciones adiciones inmediatamente N terminales de la secuencia AxP. Para verificar si el motivo A170xP172 también es importante para unión de los anticuerpos de acuerdo con la divulgación la secuencia AxP se mutó a SxS usando mutagénesis dirigida (mutante AxP = A170S, P172S), las células se transfectaron con el mutante AxP y ADN de CD20 de tipo silvestre (WT), y se compararon las características de unión de los mAb anti-CD20.

Se prepararon mutantes adicionales, P172S (prolina en la posición 172 mutada a serina), N166D (asparagina en la posición 166 mutada a ácido aspártico) y N163D (asparagina en la posición 163 mutada a ácido aspártico), usando mutagénesis dirigida para evaluar si los restos aminoacídicos mutados son importantes para unión de los anticuerpos de la divulgación. Para examinar esto, se construyó un vector de expresión de CD20 amplificando la secuencia codificante de CD20 usando cebadores adecuados introduciendo sitios de restricción y una secuencia Kozak ideal para expresión óptima. El fragmento amplificado se digirió y ligó en el vector de expresión pEE13.4. Después de transformación en *E. coli*, las colonias se exploraron con respecto a insertos y se seleccionaron dos clones para secuenciación para confirmar la secuencia correcta. La construcción se nombró pEE13.4CD20HS.

Se realizó mutagénesis para introducir la mutación AxP y para introducir 20 mutaciones de ratón en las regiones de bucle extracelular de CD20 humano. La mutagénesis se comprobó por digestión con enzima de restricción y secuenciación. Las construcciones se transfectaron de forma transitoria en células CHO (para mutaciones AxP) o células HEK293F y se analizaron 24 o 48 horas después de la transfección usando citometría de flujo.

Cebadores de PCR oligonucleotídicos: Se sintetizaron cebadores oligonucleotídicos y se cuantificaron por Isogen BV (Maarsse, Países Bajos). Los cebadores se reconstituyeron en agua en una concentración de 100 pmol/μl y se almacenaron a -20 °C hasta que se necesitaran. Se muestra un sumario de cebadores de PCR y secuenciación en la Tabla 3.

Determinación de densidad óptica de ácidos nucleicos: La densidad óptica se determinó usando un Ultrospec 2100 pro Classic (AmershamBiosciences, Uppsala, Suecia) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La concentración de ADN se midió por análisis de la DO_{260nm}, en el que una unidad DO_{260nm} = 50 μg/ml. La solución de referencia fue idéntica a la solución usada para disolver los ácidos nucleicos.

Aislamiento de ADN plasmídico de cultivo de E. coli: Se aisló ADN plasmídico de cultivos de *E. coli* usando kits de Qiagen de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Westburg BV, Leusden, Países Bajos). Para preparación de plásmido "a granel" se usó un kit Maxi de plásmido Hi-Speed o un kit Midi de plásmido Hi-Speed (Qiagen). Para una preparación de plásmido a escala pequeña (es decir, 2 ml de cultivo de *E. coli*) se usó un Kit de Miniprep Qiaprep Spin (Qiagen) y el ADN se eluyó en 50 μl de TE (Tris-HCl 10 mM pH 8,0, EDTA 1 mM).

Amplificación por PCR: Se realizaron reacciones de PCR de acuerdo con las instrucciones del fabricante para la ADN polimerasa Pfu-Turbo[®] Hotstart (Stratagene, Ámsterdam, Países Bajos). Cada reacción de 20 μl contenía tampón de reacción de PCR 1 x, dNTP mezclados 200 μM, 6,7 pmol de cada cebador directo e inverso, aproximadamente 1 ng de ADN molde y 1 unidad de ADN polimerasa Pfu-Turbo[®] Hotstart. Se realizaron reacciones de PCR en un Termociclador de gradiente T 96 (Biometra GmbH, Goettingen, Alemania) usando un programa de 30 ciclos de: +95 °C durante 2 minutos, seguido de 30 ciclos de: +95 °C durante 30 segundos, hibridación: un gradiente de 45-65 °C durante 30 segundos y extensión: +72 °C durante 2 minutos, seguido de una etapa de extensión final de 10 minutos a 72 °C y almacenamiento posterior a 4 °C. Las reacciones completadas se analizaron por electroforesis en gel de agarosa.

Electroforesis en gel de Agarosa: Se realizó electroforesis en gel de agarosa de acuerdo con Sambrook (Molecular Cloning Laboratory Manual, 3ª edición) usando geles de 50 ml, en tampón de Tris 1 x/ácido acético/EDTA (TAB). El ADN se visualizó mediante la inclusión de bromuro de etidio en el gel y observación bajo luz ultravioleta. Las imágenes del gel se registraron por una cámara CCD y un sistema de análisis de imágenes (GeneGnome; Syngene, Cambridge, Reino Unido).

Digestión con enzimas de restricción: Se proporcionaron enzimas de restricción por New England Biolabs (Beverly, MA) y se usaron de acuerdo con las recomendaciones del proveedor. En general, se digirieron 100 ng con 5 unidades de enzima o enzimas en tampón apropiado en un volumen final de 10 μl. Los volúmenes de reacción se aumentaron de escala según fuera apropiado. Las digestiones se incubaron durante un mínimo de 60 minutos a la temperatura recomendada por el fabricante.

Para fragmentos que requerían digestiones dobles con enzimas de restricción que tienen requisitos de tampón o temperatura incompatibles, se realizaron digestiones secuencialmente para ofrecer condiciones favorables para cada enzima a su vez.

5 *Tratamiento con fosfatasa alcalina:* Se usó fosfatasa alcalina de camarón (USB, Cleveland, OH) de acuerdo con las recomendaciones del proveedor. La fosfatasa alcalina retira grupos fosfato 5' de los extremos de fragmentos de ADN evitando de este modo el autoligamiento. Esto es de particular relevancia cuando el auto-religamiento de un fragmento de ADN podría dar como resultado un vector competente para replicación. La enzima está activa en la mayoría de los tampones de enzimas de restricción y se añadió según fuera apropiado. Después de la digestión, la enzima se inactivó elevando la temperatura a 70 °C durante 15 minutos.

10 *Purificación de productos de reacción de enzima de restricción y PCR:* Se llevó a cabo purificación usando el kit de Purificación de PCR de minieluido (proporcionado por Qiagen), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Brevemente, las muestras de ADN se diluyeron en 5 volúmenes de tampón de unión I (Qiagen) y se cargaron en una columna de minieluido dentro de un tubo de centrifuga Eppendorf. El ensamblaje se centrifugó en una microcentrífuga de sobremesa. La columna se lavó dos veces con tampón II (Qiagen): Después de la aplicación de tampón, el ensamblaje se centrifugó y se descartó el flujo continuo. La columna se secó por centrifugación en ausencia de tampón añadido. El ADN se eluyó añadiendo tampón de elución a la columna y el eluato se recogió por centrifugación. El ADN aislado se cuantificó por espectroscopía UV y la calidad se evaluó por electroforesis en gel de agarosa.

20 *Aislamiento de fragmentos de ADN de gel de agarosa:* Cuando fue apropiado (es decir, cuando estaban presentes múltiples fragmentos), las muestras de ADN digeridas se separaron por electroforesis en gel y el fragmento deseado se escindió del gel y se recuperó usando el kit de extracción de gel QIAEXII (Qiagen), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Brevemente, se escindieron bandas de ADN del gel de agarosa y se fundieron en un tampón apropiado a +55 °C. Se añadió resina de QIAEX II y se incubó durante 5 minutos. La resina de QIAEX II se sedimentó por una etapa de centrifugación corta (1 minuto, 14000 g, TA) y se lavó dos veces con 500 µl de tampón de lavado PE. El sedimento final se secó en una campana y el ADN se eluyó con el volumen de TE y la temperatura apropiados (dependiendo del tamaño del ADN).

30 *Ligamiento de fragmentos de ADN:* Se realizaron ligamientos con el Kit de Ligación Quick (New England Biolabs) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Para cada ligamiento, el ADN del vector se mezcló con un exceso molar aproximadamente 3 veces de ADN de inserción de modo que la cantidad total de ADN fue menor de 200 ng en 10 µl, con el volumen ajustado con agua según sea apropiado. A esto se añadieron 10 µl de Tampón de Ligación Quick 2 x y 1 µl de ADN ligasa T4 Quick y la mezcla de ligación se incubó durante 5-30 minutos a temperatura ambiente.

35 *Transformación de ADN en bacterias:* Se usaron muestras de ADN para transformar células de *E. coli* competentes One Shot DH5α-T1 R (Invitrogen, Breda, Países Bajos) usando el método de choque térmico de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Brevemente, se añadieron 1-5 µl de solución de ADN (típicamente 2 µl de mezcla de ligamiento de ADN) a una alícuota de células bacterianas competentes para transformación y la mezcla se incubó en hielo durante 30 minutos. Las células se sometieron después a choque térmico transfiriéndolas a un baño de agua a 42 °C durante 30 segundos seguido de una incubación adicional en hielo durante 5 minutos. Se dejó que las células se recuperaran por incubación en un medio de cultivo no selectivo (SOC) durante 1 hora con agitación a 37 °C y se extendieron posteriormente en placas de agar que contenían agente selectivo apropiado (ampicilina a 50 µg/ml). Las placas se incubaron durante 16-18 horas a +37 °C o hasta que las colonias de bacterias resultaron evidentes.

45 *Exploración de colonias bacterianas por PCR:* Se exploraron colonias bacterianas con respecto a la presencia de vectores que contenían las secuencias deseadas usando la técnica de exploración de colonias de PCR. Se añadieron 20 µl de mezcla de reacción de PCR que contenía 0,5 volúmenes de Mezcla Maestra de HotStarTaq (Qiagen), 4 pmoles de los cebadores directo e inverso y completado con agua a un tubo de PCR. Se tocó ligeramente una colonia con una punta de pipeta de 20 µl, se tocó una vez en 2 ml de LB en un tubo de cultivo (para cultivar bacterias que contienen el plásmido correspondiente) y se resuspendieron en la mezcla de PCR de 20 µl. Se realizó PCR en un Termociclador de gradiente T 96 (Biometra) usando un programa de 35 ciclos de +95 °C durante 15 minutos, seguido de 35 ciclos de: +94 °C durante 30 segundos, hibridación: 55 °C durante 30 segundos y extensión: +72 °C durante 2 minutos, seguido de una etapa de extensión final de 10 minutos a 72 °C y almacenamiento posterior a 4 °C. Las reacciones completadas se analizaron por electroforesis en gel de agarosa. Véase Tabla 3 para detalles de pares de cebadores usados para PCR de colonias.

60 *Secuenciación de ADN:* Se enviaron muestras de ADN plasmídico a AGOWA (Berlín, Alemania) para análisis de secuencia. Las secuencias se analizaron usando el paquete de software VectorNTI (Informax, Frederick, MD, Estados Unidos).

Tabla 3

Nombre	Aplicación	Longitud	Secuencia de Oligo
CD20P172S	Mutagénesis de CD20	36	TGGGGAGTTTTTCTCAGAGGAATTCGATGGTTCACAGTTGTA

Nombre	Aplicación	Longitud	Secuencia de Oligo
CD20N166D	Mutagénesis de CD20	39	TGTAACAGTATTGGGTAGATGGG
CD20N163D	Mutagénesis de CD20	36	AATCATGGACATACTTAATATTA
cd20exfor	Construcción de CD20	41	TATAGCCCGGGGCCGCCACCATGACAACACCCAGAAATTCA
cd20exrev	Construcción de CD20	38	GCGTCTCATGTACATTAAGGAGAGCTGTCATTTTCTAT
pee13.4seqrev2	PCR de colonias	23	TCGGACATCTCATGACTTTCTTT
pConKseq1	PCR de colonias	23	GTAGTCTGAGCAGTACTCGTTGC
cd20hsapmutr (AxP)	Mutagénesis de CD20	42	TGGGGAGTTTTTCAGAGGAATTCGATGGTTCACAGTTGTA
cd20hsapmutf (AxP)	Mutagénesis de CD20	42	TACAACGTGAACCATCGAATTCCTCTGAGAAAACTCCCCA
CD20seq2	Secuenciación de CD20	23	TGTAACAGTATTGGGTAGATGGG
cd20seq1	Secuenciación de CD20	23	AATCATGGACATACTTAATATTA

Mutagénesis: La mutagénesis se realizó, usando el kit de Mutagénesis Dirigida QuikChange® XL (Cat 200517-5, Lote 1120630, Stratagene Europe) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

5 Las reacciones de mutagénesis se concentraron usando precipitación con etanol y se transformaron en células *E. coli* competentes oneshot DH5 α -T1 R o se introdujeron por electroporación en Células Competentes para Electroporación ElectroTen-Blue®. Las colonias se comprobaron por PCR de colonias y digestión de restricción antes de la transfección.

10 *Transfección de células HEK293F:* Se obtuvieron células HEK293F de Invitrogen y se transfectaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante, usando 293fectin. Las células HEK293F se usaron para todas las secuencias de mutante sencillo.

15 *Transfección de células CHO:* Se transfectaron de forma transitoria células CHO cultivadas hasta aproximadamente 95 % de confluencia con ADNc de CD20 de tipo silvestre, mutante o una combinación de ambas construcciones usando lipofectamine 2000 (M668-019, Invitrogen, Breda, Países Bajos). Para este fin, se diluyeron 24 μ g de ADN precipitado (1 μ g/ml) en 500 μ l de optimen, en relaciones de AxP 100 %: WT 0 %; AxP 33,3 %: WT 66,6 %; AxP 66,6 %: WT 33,3 %; AxP 0 %: WT 100 %. Para cada transfección se diluyeron 24 μ l de lipofectamine en 500 μ l de optimem. Después, el lipofectamine diluido se incubó (TA, 5 minutos) y el ADN diluido se combinó con el
20 lipofectamine diluido. Después de mezclar suavemente e incubar la solución (TA, 20 minutos), se añadieron 1000 μ l de ADN/lipofectamine a las células CHO, se mezclaron minuciosamente y se incubaron durante 48 horas a 37 °C, CO₂ 5 %. Dos días después de la transfección de células CHO, las células se lavaron dos veces con tampón FACS (PBS complementado con BSA 0,1 % y NaN₃ 0,002 %). Las células CHO se trataron con tripsina/EDTA (Gibco BRL, Life Technologies, Paisley, Escocia) y se levantaron de las placas de cultivo.

25 *Unión de Anticuerpo anti-CD20:* Se recogieron células HEK293F y células CHO en PBS a una concentración de 2 x 10⁶/ml y se añadieron a placas de fondo redondo (1 x 10⁵/pocillo). Después se añadieron 50 μ l de mAb de CD20, en diluciones seriadas de 10, 5, 2,5 o 0 μ g por pocillo (4 °C, 30 minutos). Después de lavar en tampón FACS (PBS complementado con BSA 0,1 % y NaN₃ 0,002 %), las células se analizaron en un citómetro de flujo (Becton Dickinson, San Diego, CA, Estados Unidos) y se adquirieron 5.000 acontecimientos por muestra a caudal alto.
30

Como puede verse a partir de las Figuras 48A-E, todos los mAb anti-CD20 se unieron eficazmente a células CHO que expresaban CD20 WT. Como se esperaba, rituximab no se unió al mutante AxP (Figura 48A) y B 1 se unió poco a este mutante (Figura 48D). Tanto 2F2 como 11B8, por el contrario, se unieron a CD20 WT y mutante AxP igualmente bien (Figura 48B y Figura 48C). La valoración de la cantidad de CD20 WT en la superficie valoró de hecho la unión de rituximab y B1. Tanto 2F2 como 11B8 fueron de nuevo insensibles a la ausencia o presencia de la mutación.
35

Este estudio indica que la unión de 2F2 y 11B8 con CD20 humano es insensible a mutaciones en las posiciones de aminoácidos 170 y 172. 2F2 y 11B8 representan por lo tanto una nueva clase de mAb de CD20 que reconocen un nuevo epítipo CD20.
40

La Figura 49A muestra porcentaje de unión de 2F2, 11B8T, B1 o rituximab con CD20 mutante P172S frente a WT, la Figura 49B muestra el porcentaje de unión de 2F2T, 11B8T, B1, CAT (CAT 13.6E12, un anticuerpo anti-CD20 de IgG2A monoclonal de ratón, Diotec.Com), un anticuerpo de isotipo de control (KLH), o rituximab con CD20 mutante (AxP) frente a CD20 WT.
45

Para el mutante en el que la asparagina en la posición 166 se ha reemplazado con ácido aspártico (CD20N166D) 2F2 mostró unión muy baja, mientras que B1, rituximab y 11B8T fueron capaces de unirse, véase Figura 49C. En un experimento similar CAT 13.6E12 y rituximab fueron capaces de unirse a CD20N166D, mientras que 2F2T solamente mostró unión muy baja, véase Figura 49D. Para el mutante en el que la asparagina en la posición 163 se ha reemplazado por ácido aspártico (CD20N163D) frente a rituximab, 11B8T y B1 fueron capaces de unirse a CD20N163D, mientras que 2F2 y 2F2T solamente mostraron unión muy baja, véase Figura 49E. En un experimento similar CAT 13.6E12 y rituximab fueron capaces de unirse a CD20N163D, mientras que 2F2T mostró solamente unión muy baja, véase Figura 49F.

Estos experimentos indican que 2F2 y 11B8 se unen a diferentes epítomos.

Ejemplo 15 mapeo de epítomos usando método Pepscan

Síntesis de péptidos: Se sintetizaron péptidos 7, 9 y 15 mer de acuerdo con métodos convencionales. En algunos casos enlace químico de las piernas de un péptido 15-mer ayuda a identificar secuencias de aminoácidos de un epítomo potencialmente discontinuo. De acuerdo con procedimientos conocidos (H. M. Geysen *et al.* (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81: 3998; J. W. Slootstra *et al.* (1996) Mol. Divers. 1: 87; y documento WO 01/60769), se sintetizaron péptidos 7, 9 y 15-mer que podrían ser posibles sitios de unión o epítomos implicados en la unión de 2F2 u 11B8 con la molécula CD20 humana. Los 9 y 15 mer se sintetizaron como bucles y se exploraron usando tarjetas mini-PEPSCAN de formato de tarjeta de crédito (formato de 455 péptidos/tarjeta). En todos los péptidos con bucles se reemplazaron aminoácidos en diversas posiciones por una cisteína (por ejemplo, acetil-XCXXXXXXXXXXXXCX-minitarjeta). Los péptidos se sintetizaron usando química de Fmoc convencional y se desprotegieron usando TFA con neutralizantes. Posteriormente, se hizo reaccionar los péptidos desprotegidos en la micromatriz con una solución 0,5 mM de 1,3-bis(bromometil) benceno en bicarbonato de amonio (20 mM, pH 7,9), complementado con acetonitrilo (1:1 (v/v)). Las micromatrices se agitaron suavemente en la solución durante 30-60 minutos, mientras estaban completamente cubiertas en la solución. Finalmente, las micromatrices se lavaron exhaustivamente con exceso de H₂O Millipore y se sonicaron en tampón de ruptura que contenía dodecilsulfato sódico 1 %, β-mercaptoetanol 0,1 %, en PBS (pH 7,2) a 70 °C durante 30 minutos, seguido de sonicación en H₂O millipore durante otros 45 minutos. Posteriormente, los micropocillos estaban listos para exploración en un ensayo de ELISA.

Ensayo de ELISA Pepscan: Las tarjetas de polietileno de formato de tarjeta de crédito de 455 pocillos, que contenían los péptidos ligados covalentemente, se incubaron con suero (diluido 1:1000 en solución de bloqueo que contiene suero de caballo 5 % (v/v) y ovalbúmina 5 % (p/v)) (4 °C, durante una noche). Después de lavar, los péptidos se incubaron con peroxidasa de anticuerpo antihumano (dilución 1:1000, 1 hora, 25 °C) y después de lavar el sustrato de peroxidasa, se añadió 2,2'-azino-di-3-etilbenzotiazolin sulfonato y H₂O₂ 3 % 2 µl/ml. Después de una hora, se midió el desarrollo de color. El desarrollo de color del ELISA se cuantificó con una cámara CCD y un sistema de procesamiento de imágenes. La preparación consiste en una cámara CCD y una lente de 55 mm (Video Cámara CCD de Sony XC-77RR, lente Nikon micro-nikk o 55 mm f/2,8), un adaptador de cámara (adaptador de Cámara Sony DC-77RR) y el paquete de Software de Procesamiento de Imágenes Optimas, versión 6.5 (Media Cybernetics, Silver Spring, MD 20910, Estados Unidos). Optimas se ejecuta en un sistema informático pentium II.

Las absorbancias (valores de DO) para los péptidos a diferentes concentraciones de anticuerpo se muestran en la Tabla 4 y Tabla 5 a continuación.

Tabla 4

	11B8 10 µg/ml	11B8 100 µg/ml	7D8 10 µg/ml	7D8 100 µg/ml	rituximab 10 µg/ml	2F2 10 µg/ml	2F2 100 µg/ml	B1 10 µg/ml	B1 100 µg/ml
KMECLNFIRAHCPYI	763	2997	134	41	90	48	66	147	304
LKMECLNFIRCHTPY	165	738	160	41	120	49	87	179	216
KNESCNFIRACTPYI	625	3090	142	52	123	39	78	170	308
MESLCFIRAHCPYIN	179	956	127	55	102	41	65	119	178
CFIRAHTPC	188	534	181	69	134	91	114	170	212
CIRAHTPYC	151	449	186	60	132	57	92	151	195
CRAHTPYIC	427	1605	188	64	145	48	87	179	216
CAHTPYINC	179	452	174	65	125	42	106	161	172

	11B8 10 µg/ml	11B8 100 µg/ml	7D8 10 µg/ml	7D8 100 µg/ml	rituximab 10 µg/ml	2F2 10 µg/ml	2F2 100 µg/ml	B1 10 µg/ml	B1 100 µg/ml
IPAGIYA	217	950	164	76	177	48	85	165	192
PAGIYAP	449	2501	170	64	111	43	85	165	300
AGIYAPI	251	2207	188	73	110	44	98	187	143
GIYAPIC	99	251	152	64	141	34	93	177	147
IYAPICV	137	313	174	58	159	58	99	175	90
GIYAPIA	172	857	177	96	156	62	96	165	121
IYAPIAV	161	654	181	58	116	62	76	161	106

Tabla 5

	11B8 10 µg/ml	7D8 10 µg/ml	rituximab 10 µg/ml	2F2 10 µg/ml
PCINIYNAEPANPCE	118	163	152	65
YCNIYNAEPANPCK	287	181	2418	86
ICIYNAEPANPSECN	138	192	142	78
NCYNAEPANPSEKCS	93	121	2649	49
ICNAEPANPSEKNCP	115	165	3283	43
YCAEPANPSEKNSCS	106	188	3770	65
NCEPANPSEKNSPCT	159	183	3476	61
ACPANPSEKNSPSCQ	146	148	250	77
ECANPSEKNSPSTCY	134	179	188	68

5 Como parece a partir de la Tabla 4, 11B8 mostró unión con AGIYAP del primer bucle extracelular pequeño de CD20 humano tanto a 10 µg/ml como a 100 µg/ml, mientras que los otros anticuerpos ensayados no mostraron unión significativa con AGIYAP.

10 Además, 11B8 mostró unión con MESLNFIHAHTPYI del segundo bucle extracelular del segundo bucle extracelular de CD20 humano tanto a 10 µg/ml como a 100 µg/ml, mientras que los otros anticuerpos ensayados no mostraron unión significativa con MESLNFIHAHTPYI.

15 Como parece a partir de la Tabla 5, rituximab mostró unión con EPANPSEK del segundo bucle extracelular de CD20 humano tanto a 1 µg/ml como a 10 µg/ml, mientras que los otros anticuerpos ensayados no mostraron unión significativa con EPANPSEK.

Ejemplo 16 Anticuerpos antiidiotípicos

20 *Generación de anticuerpos antiidiotípicos:* Se prepararon anticuerpos antiidiotípicos de ratón inmunizando ratones Balb/C con 2F2 u 11B8T, y generando hibridomas a partir de bazos de estos ratones por fusión con células de mieloma NS1 usando técnicas convencionales. Se generaron los siguientes anticuerpos antiidiotípicos: sab anti-2F2 1.1, sab anti-2F2 1.2, sab anti-2F2 1.3, sab anti-11B8T 2.2, sab anti-11B8T 2.3, sab anti-11B8T 2.4, sab anti-11B8T 2.5 y sab anti-11B8T 2.6. Estos se ensayaron con respecto a unión específica con 2F2T, 7D8 y 11B8T. Las placas de ELISA se recubrieron con 2F2T, 7D8 u 11B8T purificados (diluidos en PBS a una concentración final de 1-2 µg/ml, 37 °C, 2 horas). Las placas se bloquearon con PBS que contenía Tween-20 0,05 % y suero de pollo 2 % (TA, 1 hora). Posteriormente, las placas se incubaron con sobrenadantes de cultivos de los anticuerpos antiidiotípicos (concentración final ajustada a 1-10 µg/ml, TA, 2 horas). Se detectaron anticuerpos antiidiotípicos de ratón unidos con anticuerpo conjugado con HRP anti IgG de ratón de conejo (Jackson ImmunoResearch).

30 Como se muestra en la Figura 50 sab anti-2F2 1.1, sab anti-2F2 1.2, y sab anti-2F2 1.3 se unen a 2F2T y 7D8, pero no a 11B8T o un anticuerpo humano de control de isotipo no relacionado. Puesto que 2F2T y 7D8 son muy homólogos en secuencia V_L y V_H, se esperaba reacción de anticuerpos antiidiotípicos 2F2 con 7D8.

35 La Figura 51 muestra que sab anti-11B8T 2.2, sab anti-11B8T 2.3, sab anti-11B8T 2.4, sab anti-11B8T 2.5 y sab anti-11B8T 2.6 se unen todos a 11B8T en un grado similar.

Anticuerpos antiidiotípicos como una herramienta de inmunodiagnóstico: Los anticuerpos antiidiotípicos específicos de 2F2/7D8 y 11B8T pueden usarse como una herramienta de inmunodiagnóstico para detectar y cuantificar niveles

de anticuerpos monoclonales humanos contra CD20 en muestras de laboratorio o de pacientes. Esto puede ser útil para examinar la farmacocinética del anticuerpo anti-CD20 o para determinar y ajustar la dosificación del anticuerpo anti-CD20 y para controlar la enfermedad y el efecto de tratamiento en un paciente. Como ejemplo de un ensayo tal, se recubrieron placas de ELISA con sab anti-2F2 1.1, sab anti-2F2 1.2 o sab anti-2F2 1.3 4 µg/ml. Las placas se bloquearon con PBS que contenía Tween-20 0,05 % y suero de pollo 2 % (TA, 1 hora). Posteriormente, las placas se incubaron con una dilución en serie de 2F2T (10.000-9,77 ng/ml, TA, 2 horas). Se detectó 2F2T unido con anticuerpo conjugado con HRP anti-IgG humana de ratón. Como se muestra en las Figuras 52A-C se observó una unión dependiente de dosis de 2F2T.

10 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Genmab A/S

<120> ANTICUERPOS MONOCLONALES HUMANOS CONTRA CD20

<130> N94565E-EP

<140> EP 17179855.6

<141> 17-10-2003

<150> US 60/419,163

<151> 17-10-2002

<150> US 60/460.028

<151> 02-04-2002

<160> 57

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 424

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400> 1

```

atggagttgg gactgagctg gattttcctt ttggctatth taaaaggtgt ccagtgtgaa      60
gtgcagctgg tggagtctgg gggaggcttg gtacagcctg gcagggtccct gagactctcc      120
tgtgcagcct ctggattcac ctttaatgat tatgccatgc actgggtccg gcaagctcca      180
gggaagggcc tggagtgggt ctcaactatt agttggaata gtggttccat aggctatgag      240
gactctgtga agggccgatt caccatctcc agagacaacg ccaagaagtc cctgtatctg      300
caaatgaaca gtctgagagc tgaggacacg gccttgtatt actgtgcaaa agatatacag      360
tacggcaact actactacgg tatggacgtc tggggccaag ggaccacggt caccgtctcc      420
tcag                                                                                   424

```

<210> 2

<211> 122

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 2

ES 2 744 275 T3

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

<210> 3
 <211> 382
 5 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

<400> 3

atggaagccc cagctcagct tctcttcctc ctgctactct ggctcccaga taccaccgga 60
 gaaattgtgt tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 120
 ctctcctgca gggccagtca gagtgtagc agctacttag cctggtacca acagaaacct 180
 ggccaggctc ccaggctcct catctatgat gcatccaaca gggccactgg catcccagcc 240
 aggttcagtg gcagtggtc tgggacagac ttcactctca ccatcagcag cctagagcct 300
 gaagattttg cagtttatta ctgtcagcag cgtagcaact ggccgatcac ctctggccaa 360
 10 gggacacgac tggagattaa ac 382

<210> 4
 <211> 107
 <212> PRT
 15 <213> *Homo sapiens*

<400> 4

ES 2 744 275 T3

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

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

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

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

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

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

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

<210> 5
 <211> 424
 5 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

<400> 5

atggagttgg gactgagctg gattttcctt ttggctatatt taaaaggtgt ccagtgtgaa 60
 gtgcagctgg tggagtctgg gggaggcttg gtacagcctg acaggtccct gagactctcc 120
 tgtgcagcct ctggattcac ctttcatgat tatgccatgc actgggtccg gcaagctcca 180
 gggaagggcc tggagtgggt ctcaactatt agttggaata gtggtacat aggctatgcg 240
 gactctgtga agggccgatt caccatctcc agagacaacg ccaagaactc cctgtatctg 300
 caaatgaaca gtctgagagc tgaggacacg gccttgatt actgtgcaaa agatatacag 360
 tacggcaact actactacgg tatggacgtc tggggccaag ggaccacggt caccgtctcc 420
 10 tcag 424

<210> 6
 <211> 122
 <212> PRT
 15 <213> *Homo sapiens*

<400> 6

ES 2 744 275 T3

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

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

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

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

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

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

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

<210> 13
 <211> 5
 5 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 13

10 Asp Tyr Ala Met His
 1 5

<210> 14
 <211> 17
 <212> PRT
 15 <213> *Homo sapiens*
 <400> 14

Thr Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Ile Gly Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15

20 Gly
 <210> 15
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 25 <400> 15

Asp Ile Gln Tyr Gly Asn Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val
 1 5 10

ES 2 744 275 T3

<210> 16
<211> 11
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

5
<400> 16

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

10 <210> 17
<211> 7
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

15 <400> 17

Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr
1 5

20 <210> 18
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

25 <400> 18

Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Ile Thr
1 5

30 <210> 19
<211> 5
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 19

Asp Tyr Ala Met His
1 5

35 <210> 20
<211> 17
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 20

Thr Ile Ser Trp Asn Ser Gly Thr Ile Gly Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

45 <210> 21
<211> 13
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

50 <400> 21

ES 2 744 275 T3

Asp Ile Gln Tyr Gly Asn Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val
 1 5 10

<210> 22
 <211> 11
 5 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 22

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala
 1 5 10

<210> 23
 <211> 7
 15 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 23

Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr
 1 5

<210> 24
 <211> 9
 <212> PRT
 25 <213> *Homo sapiens*
 <400> 24

Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Ile Thr
 1 5

<210> 25
 <211> 5
 <212> PRT
 30 <213> *Homo sapiens*
 35 <400> 25

Tyr His Ala Met His
 1 5

<210> 26
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 26

Ile Ile Gly Thr Gly Gly Val Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly
 1 5 10 15

<210> 27
 <211> 17
 50 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 27

ES 2 744 275 T3

Asp Tyr Tyr Gly Ala Gly Ser Phe Tyr Asp Gly Leu Tyr Gly Met Asp
 1 5 10 15

Val

<210> 28
 <211> 11
 5 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 28

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala
 1 5 10

<210> 29
 <211> 7
 <212> PRT
 15 <213> *Homo sapiens*
 <400> 29

Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr
 1 5

20 <210> 30
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 25 <400> 30

Gln Gln Arg Ser Asp Trp Pro Leu Thr
 1 5

30 <210> 31
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> primer

<400> 31
 gcaggcacac aacagaggca gttccagatt tc 32

40 <210> 32
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> primer

<400> 32
 50 gctgtgcccc cagagtgct cttggagg 28

<210> 33
 <211> 20
 <212> ADN
 55 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> primer
 5 <400> 33
 caggtkcagc tggcgagtc 20
 <210> 34
 <211> 20
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> primer
 15 <400> 34
 saggtgcagc tgktggagtc 20
 <210> 35
 <211> 20
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> primer
 25 <400> 35
 gaggtgcagc tggcgagtc 20
 <210> 36
 <211> 21
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> primer
 35 <400> 36
 atggactgga cctggagcat c 21
 40 <210> 37
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 45 <220>
 <223> primer
 <400> 37
 50 atggaattgg ggctgagctg 20
 <210> 38
 <211> 20
 <212> ADN
 55 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> primer
 60 <400> 38
 atggagtttg grctgagctg 20
 <210> 39
 <211> 21
 65 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> primer
 5 <400> 39
 atgaaacacc tgggttct c 21
 <210> 40
 <211> 20
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> primer
 15 <400> 40
 atggggtcaa ccgccatcct 20
 <210> 41
 <211> 21
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> primer
 25 <400> 41
 tgccaggggg aagaccgatg g 21
 30 <210> 42
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <223> primer
 <400> 42
 racatccaga tgayccagtc 20
 40 <210> 43
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 45 <220>
 <223> primer
 <400> 43
 50 gycatcyrga tgaccagtc 20
 <210> 44
 <211> 20
 <212> ADN
 55 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> primer
 60 <400> 44
 gatatttga tgaccagac 20
 <210> 45
 <211> 20
 65 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> primer
 5 <400> 45
 gaaattgtgt tgacrcagtc 20
 <210> 46
 <211> 20
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> primer
 15 <400> 46
 gaaatwgtra tgacacagtc 20
 <210> 47
 <211> 20
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> primer
 25 <400> 47
 gatgttga tgacacagtc 20
 <210> 48
 <211> 20
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> primer
 35 <400> 48
 gaaattgtgc tgactcagtc 20
 40 <210> 49
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 45 <220>
 <223> primer
 <400> 49
 50 cccgctcagc tcctggggc cctg 24
 <210> 50
 <211> 23
 <212> ADN
 55 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> primer
 60 <400> 50
 ccctgctcag ctctggggc tgc 23
 <210> 51
 <211> 26
 65 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> primer
 5 <400> 51
 cccagcgag cttctctcc tcctgc 26
 <210> 52
 <211> 27
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> primer
 15 <400> 52
 atggaacct ggaagcccca gcacagc 27
 <210> 53
 20 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 25 <223> primer
 <400> 53
 cggaagatg aagacagatg 20
 30 <210> 54
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 35 <400> 54

ES 2 744 275 T3

Met Glu Ala Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Leu Trp Leu Pro
 1 5 10 15

Asp Thr Thr Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser
 20 25 30

Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser
 35 40 45

Val Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro
 50 55 60

Arg Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala
 65 70 75 80

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 85 90 95

Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser
 100 105 110

Asn Trp Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 115 120 125

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro
 130 135

<210> 56
 <211> 141
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 56

ES 2 744 275 T3

Met Glu Leu Gly Leu Ser Trp Ile Phe Leu Leu Ala Ile Leu Lys Gly
1 5 10 15

Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
20 25 30

Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
35 40 45

Asp Asp Tyr Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
50 55 60

Glu Trp Val Ser Gly Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Ile Gly Tyr Ala
65 70 75 80

Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn
85 90 95

Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu
100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Lys Asp Ile Asp Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met
115 120 125

Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
130 135 140

<210> 57

<211> 127

5 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 57

Met Glu Ala Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Leu Trp Leu Pro
1 5 10 15

Asp Thr Thr Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser
20 25 30

Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser
35 40 45

Val Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro
50 55 60

10

ES 2 744 275 T3

Arg Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala
65 70 75 80

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
85 90 95

Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser
100 105 110

Asn Trp Pro Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
115 120 125

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo monoclonal humano aislado que se une a CD20 humano, y que comprende:

- 5 (i) regiones CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada que tienen las regiones de aminoácido establecidas en la SEQ ID NO: 13, 14 y 15; y regiones CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena ligera que tienen las regiones de aminoácidos establecidas en la SEQ ID NO: 16, 17 y 18;
- 10 (ii) regiones CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada que tienen las regiones de aminoácidos establecidas en la SEQ ID NO: 19, 20 y 21; y regiones CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena ligera que tienen las regiones de aminoácidos establecidas en la SEQ ID NO: 22, 23 y 24; o
- (iii) regiones CDR1 y CDR3 de cadena pesada que tienen las regiones de aminoácidos establecidas en la SEQ ID NO: 25, 26 y 27; y regiones CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena ligera que tienen las regiones de aminoácidos establecidas en la SEQ ID NO: 28, 29, y 30;
- 15 para su uso en un método de tratamiento o prevención de esclerosis múltiple.

2. El anticuerpo para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, que se selecciona del grupo que consiste en un anticuerpo de IgG1, una IgG2, una IgG3, una IgG4, una IgM, una IgA1, una IgA2, una IgA secretora, una IgD y una IgE.

20 3. El anticuerpo para su uso de acuerdo con la reivindicación 2, que es un anticuerpo IgG1.

4. El anticuerpo para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 3, que está codificado por los ácidos nucleicos de la cadena pesada humana y de la cadena ligera kappa humana que comprenden las secuencias de nucleótidos en sus regiones variables tal como se establecen en la SEQ ID NO:1 y en la SEQ ID NO:3, respectivamente.

25 5. El anticuerpo para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que está codificado por los ácidos nucleicos de la cadena pesada humana y de la cadena ligera kappa humana que comprenden secuencias de nucleótidos en sus regiones variables tal como se establecen en las SEQ ID NO: 5 y 7, respectivamente.

30 6. El anticuerpo para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que está codificado por los ácidos nucleicos de la cadena pesada humana y de la cadena ligera kappa humana que comprenden las secuencias de nucleótidos en sus regiones variables tal como se establecen en la SEQ ID NO:9 y en la SEQ ID NO:11, respectivamente.

35 7. El anticuerpo para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que tiene:

- (i) regiones variables de cadena pesada humana y cadena ligera kappa humana que comprenden las secuencias de aminoácidos tal como se establecen en la SEQ ID NO:2 y en la SEQ ID NO:4, respectivamente; o
- 40 (ii) regiones variables de cadena pesada humana y de cadena ligera kappa humana que son al menos el 90 % homólogas, preferentemente al menos el 95 % homólogas, y más preferentemente al menos el 98 % homólogas, o al menos el 99 % homólogas a las secuencias de aminoácidos tal como se establecen en las SEQ ID NO:2 y la SEQ ID NO:4, respectivamente.

45 8. El anticuerpo para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que tiene:

- (i) regiones variables de cadena pesada humana y cadena ligera kappa humana que comprenden las secuencias de aminoácidos tal como se establecen en la SEQ ID NO:6 y en la SEQ ID NO:8, respectivamente; o
- 50 (ii) regiones variables de cadena pesada humana y de cadena ligera kappa humana que son al menos el 90 % homólogas, preferentemente al menos el 95 % homólogas, y más preferentemente al menos el 98 % homólogas, o al menos el 99 % homólogas a las secuencias de aminoácidos tal como se establecen en las SEQ ID NO:6 y la SEQ ID NO:8, respectivamente.

9. El anticuerpo para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que tiene:

- 55 (i) regiones variables de cadena pesada humana y cadena ligera kappa humana que comprenden las secuencias de aminoácidos tal como se establecen en la SEQ ID NO:10 y en la SEQ ID NO:12, respectivamente; o
- 60 (ii) regiones variables de cadena pesada humana y de cadena ligera kappa humana que son al menos el 90 % homólogas, preferentemente al menos el 95 % homólogas, y más preferentemente al menos el 98 % homólogas, o al menos el 99 % homólogas a las secuencias de aminoácidos tal como se establecen en las SEQ ID NO:10 y la SEQ ID NO:12, respectivamente.

10. El anticuerpo para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que es un anticuerpo intacto seleccionado del grupo que consiste en: un anticuerpo IgG1 intacto, un anticuerpo IgG2 intacto, un anticuerpo IgG3 intacto, un anticuerpo IgG4 intacto, un anticuerpo IgM intacto, un anticuerpo IgA1 intacto, un anticuerpo IgA2 intacto, un anticuerpo IgA secretor intacto, un anticuerpo IgD intacto, y un anticuerpo IgE intacto, en

65

donde el anticuerpo se glucosila en una célula eucariota.

11. El anticuerpo para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, que es un fragmento de anticuerpo o un anticuerpo de cadena simple.

5 12. El anticuerpo para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el método de tratamiento o de prevención de la esclerosis múltiple comprende administrar por separado otro agente terapéutico al sujeto.

10 13. El anticuerpo para su uso en un método de la reivindicación 12, en donde el agente terapéutico es:

(i) un agente citotóxico o un agente radiotóxico;

(ii) un inmunosupresor;

(iii) un agente modulador inmunológico, tal como una citocina o una quimiocina; o

15 (iv) seleccionado del grupo que consiste en doxorubicina, cisplatino, bleomicina, carmustina, clorambucil y ciclofosfamida.

14. El anticuerpo para su uso en un método de la reivindicación 12, en donde el agente terapéutico se selecciona del grupo que consiste en anticuerpos anti-CD25, anticuerpos anti-CD19, anticuerpos anti-CD21, anticuerpos anti-CD22, anticuerpos anti-CD37, anticuerpos anti-CD38, anticuerpos anti-IL6R, anticuerpos anti-IL8, anticuerpos anti-IL15, anticuerpos anti-IL15R, anticuerpos anti-CD4, anticuerpos anti-CD11a, anticuerpos anti-integrina alfa-4/beta-1 (VLA4), CTLA4-Ig y anticuerpos anti-C3b(i).

15. Uso de un anticuerpo monoclonal humano aislado que se une a la CD20 humana y que comprende

25 (i) regiones CDR1, CDR2, CDR3 de cadena pesada que tienen las regiones de aminoácidos establecidas en la SEQ ID NO: 13, 14, y 15; y regiones CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena ligera que tienen las regiones de aminoácidos establecidas en la SEQ ID NO: 16, 17 y 18;

30 (ii) regiones CDR1, CDR2, CDR3 de cadena pesada que tienen las regiones de aminoácidos establecidas en la SEQ ID NO: 19, 20, y 21; y regiones CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena ligera que tienen las regiones de aminoácidos establecidas en la SEQ ID NO: 22, 23 y 24; o

35 (iii) regiones CDR1, CDR2, CDR3 de cadena pesada que tienen las regiones de aminoácidos establecidas en la SEQ ID NO: 25, 26, y 27; y regiones CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena ligera que tienen las regiones de aminoácidos establecidas en la SEQ ID NO: 28, 29 y 30;

en la fabricación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de esclerosis múltiple.

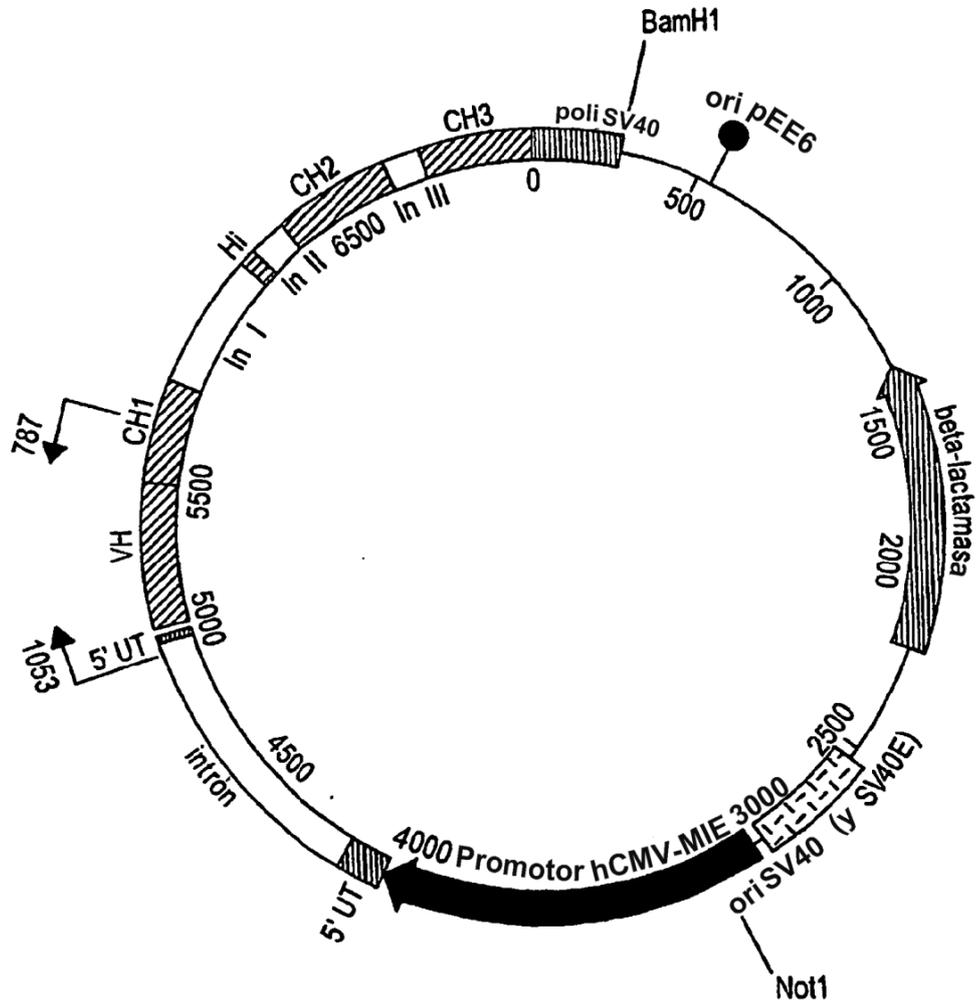


Fig. 1

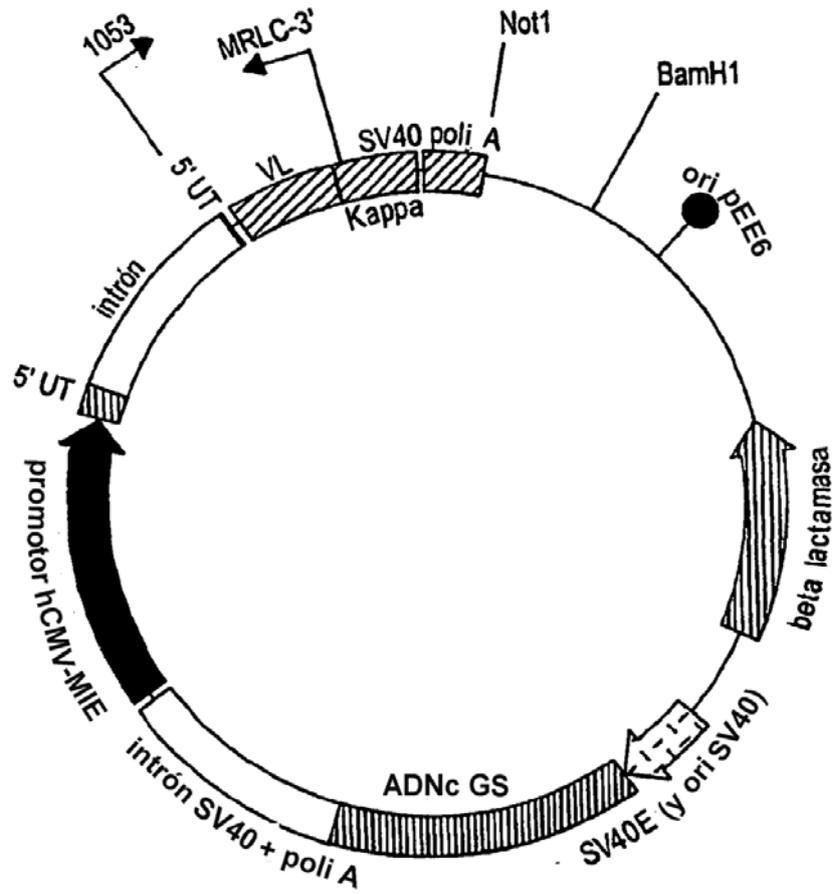


Fig. 2

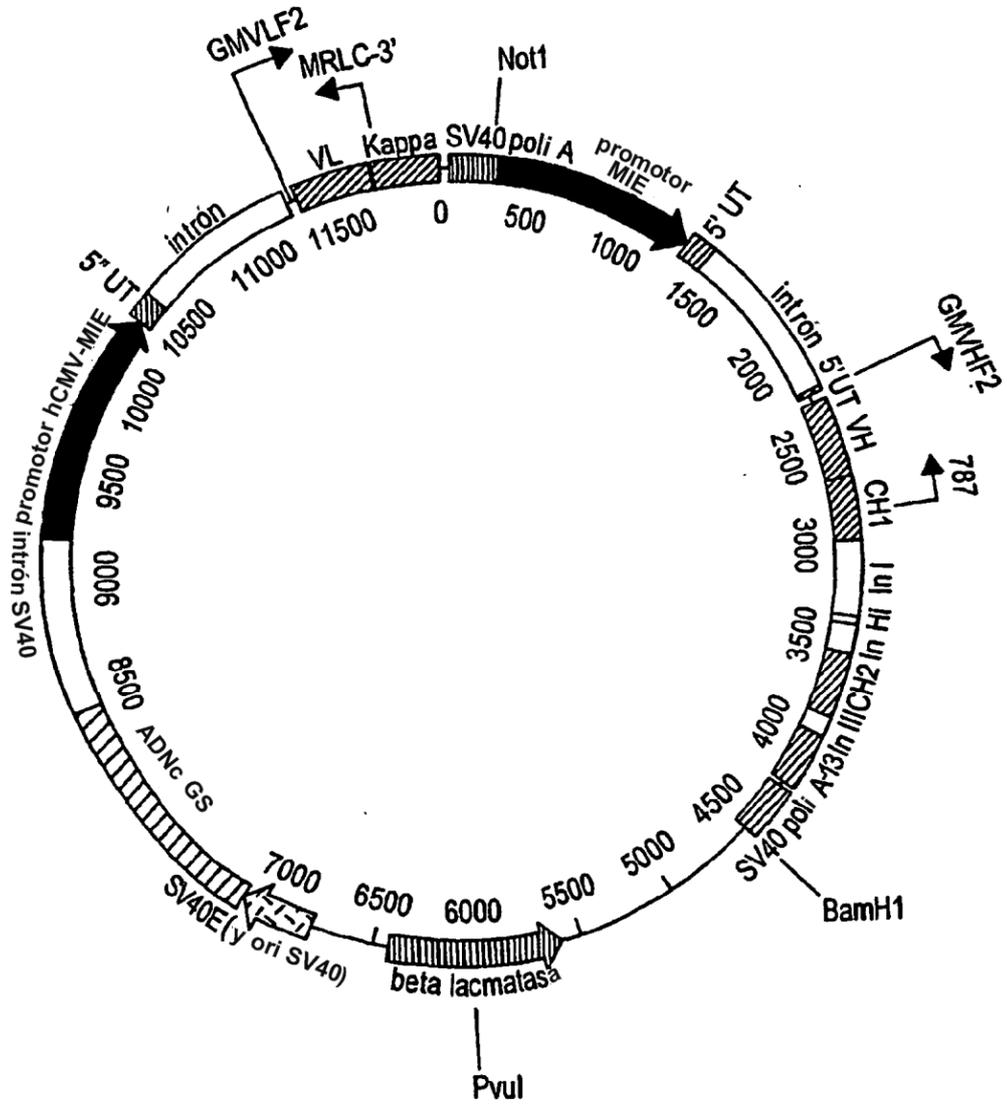


Fig. 3

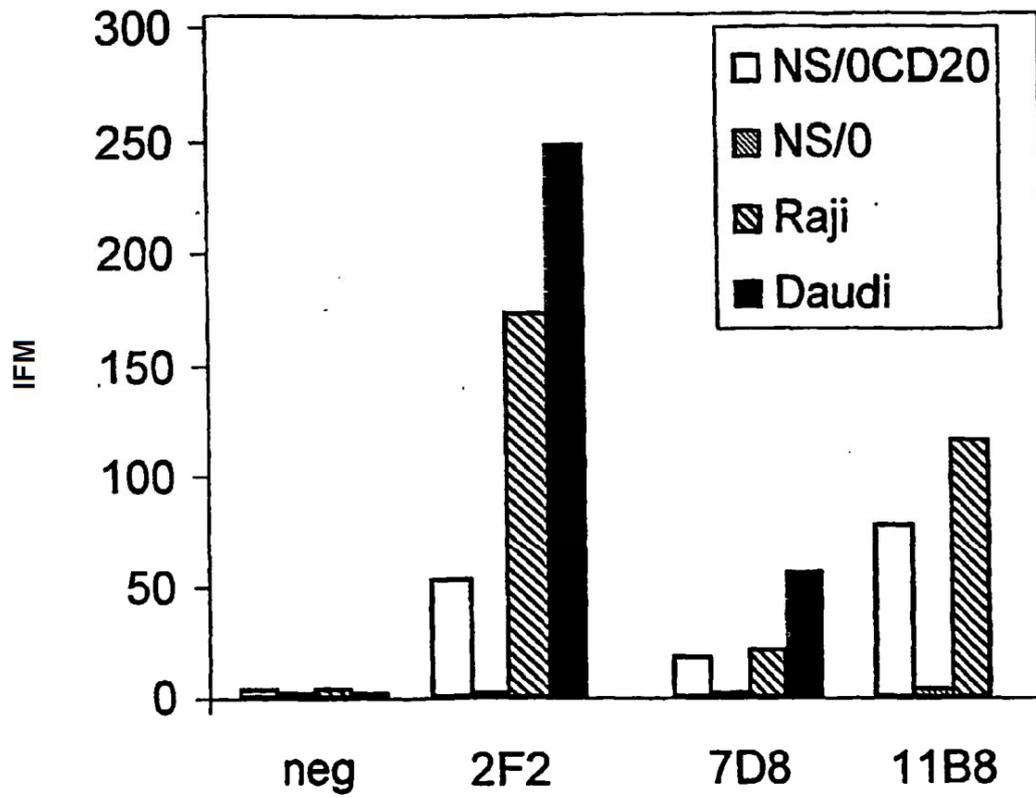


Fig. 4

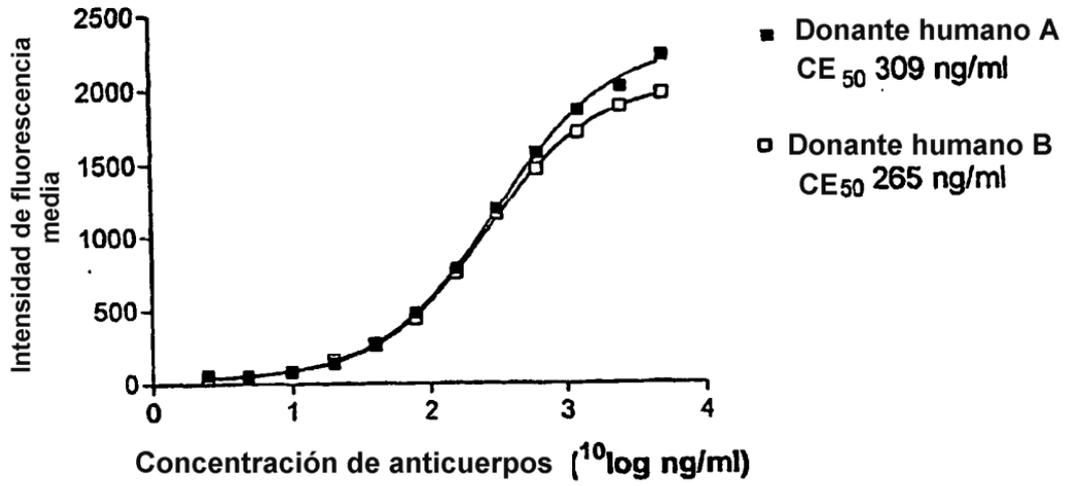


Fig. 5A

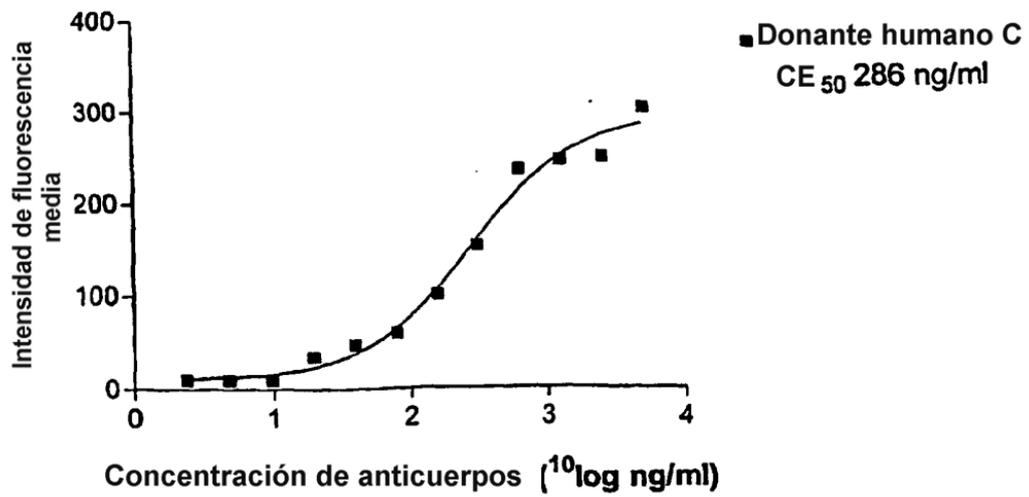


Fig. 5B

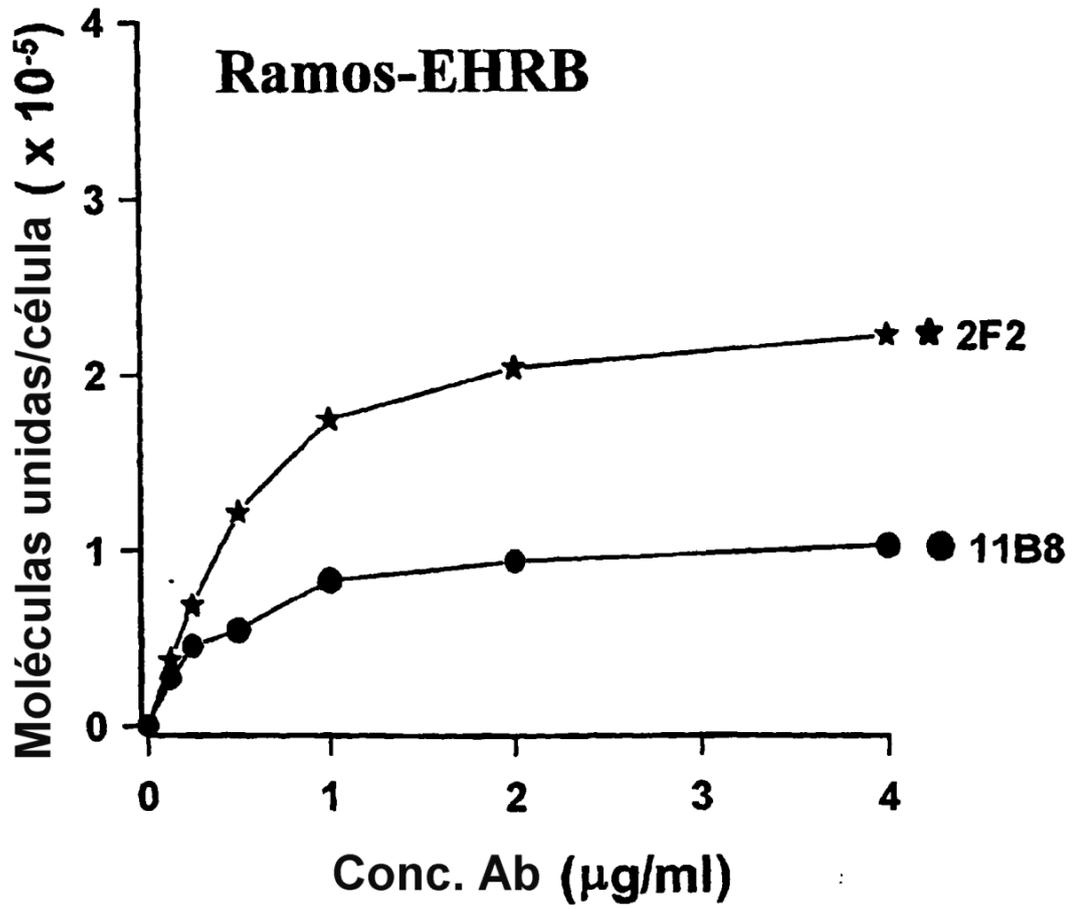


Fig 6

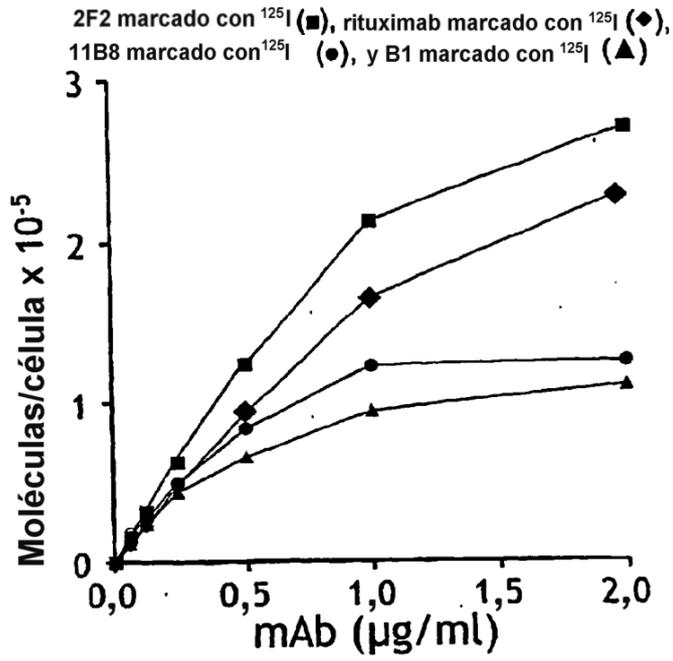


Fig. 7A

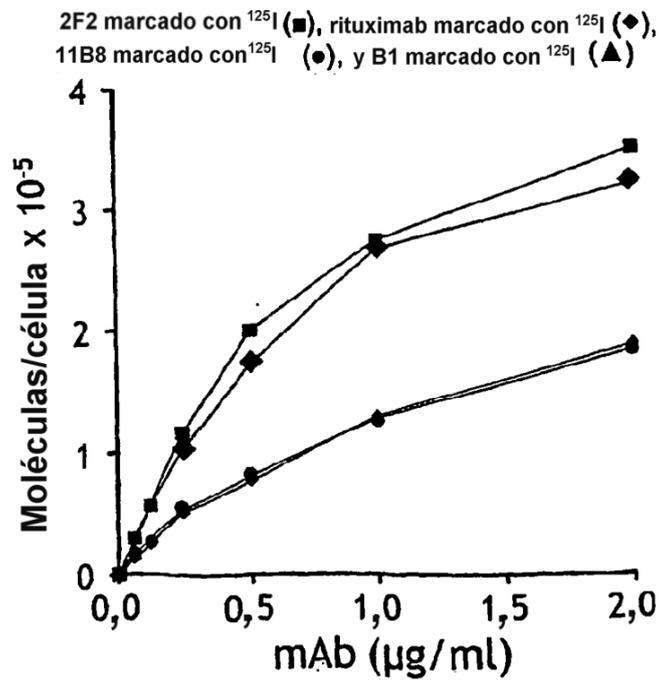


Fig. 7B

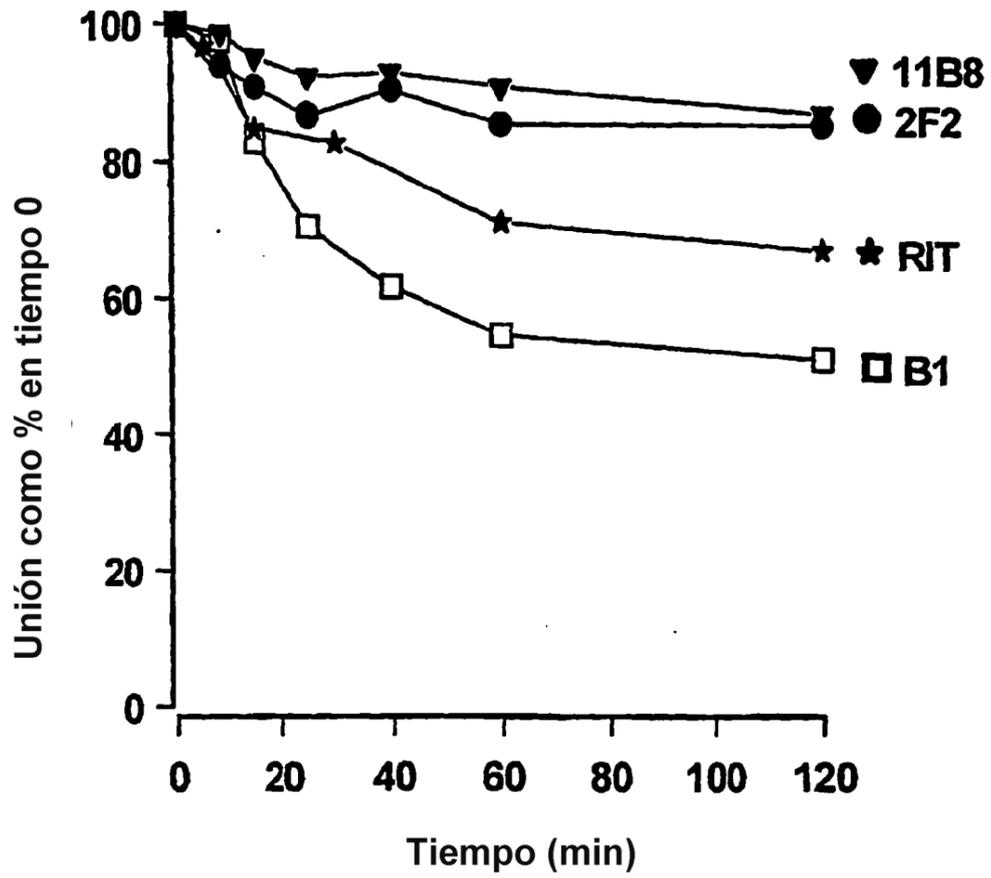


Fig. 8

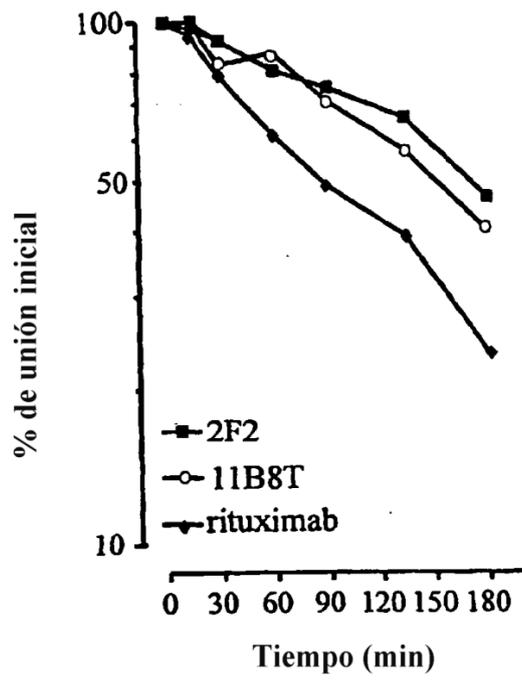


Fig. 9

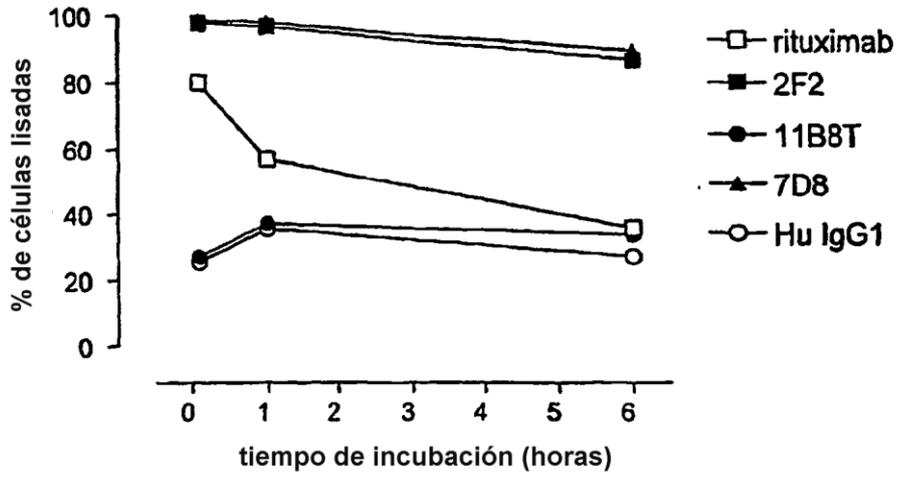


Fig. 10A

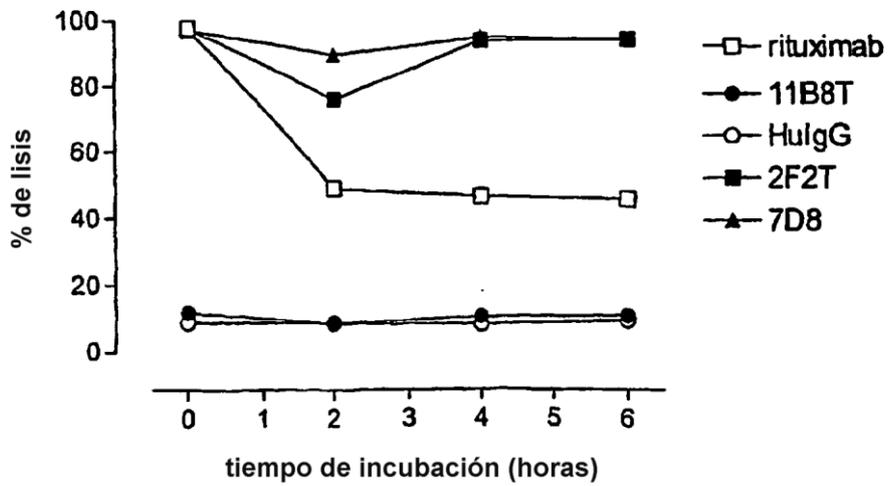


Fig. 10B

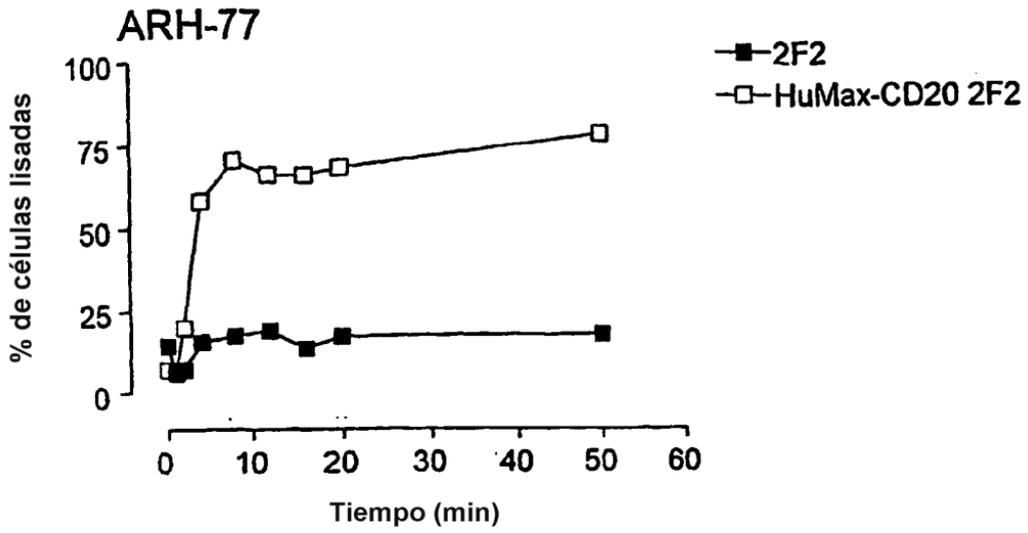


Fig. 11A

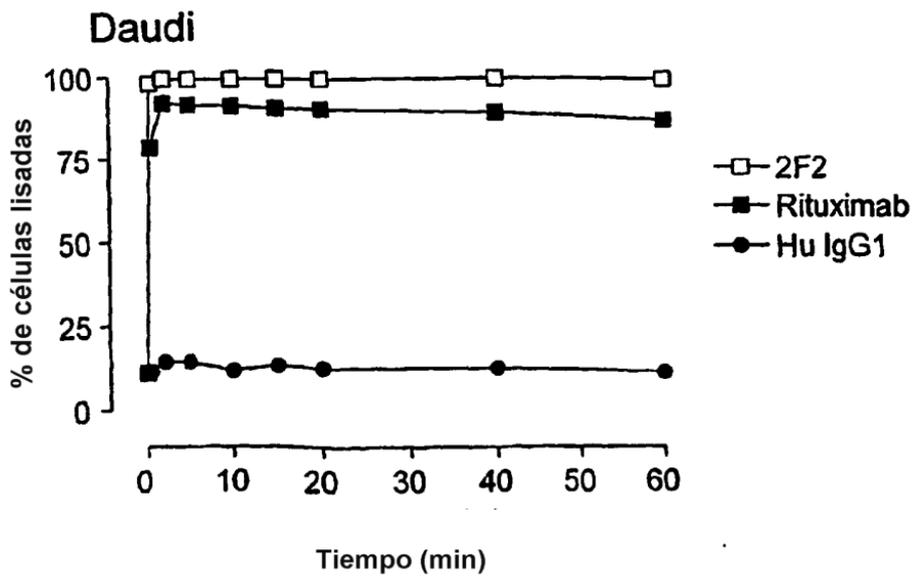


Fig. 11A

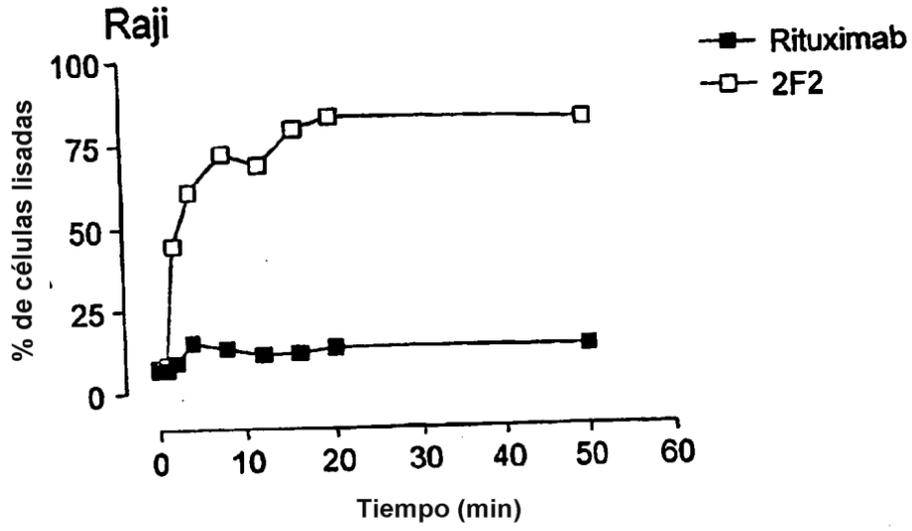


Fig. 11C

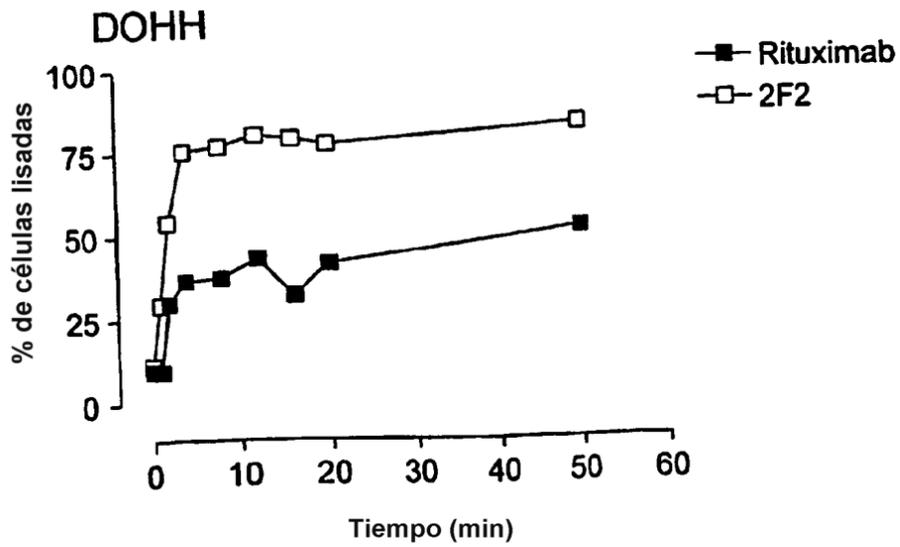


Fig. 11D

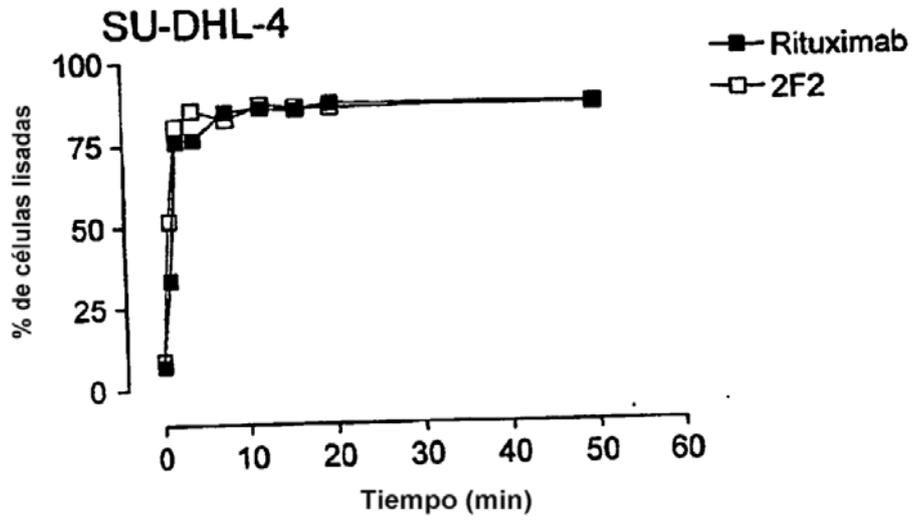


Fig. 11E

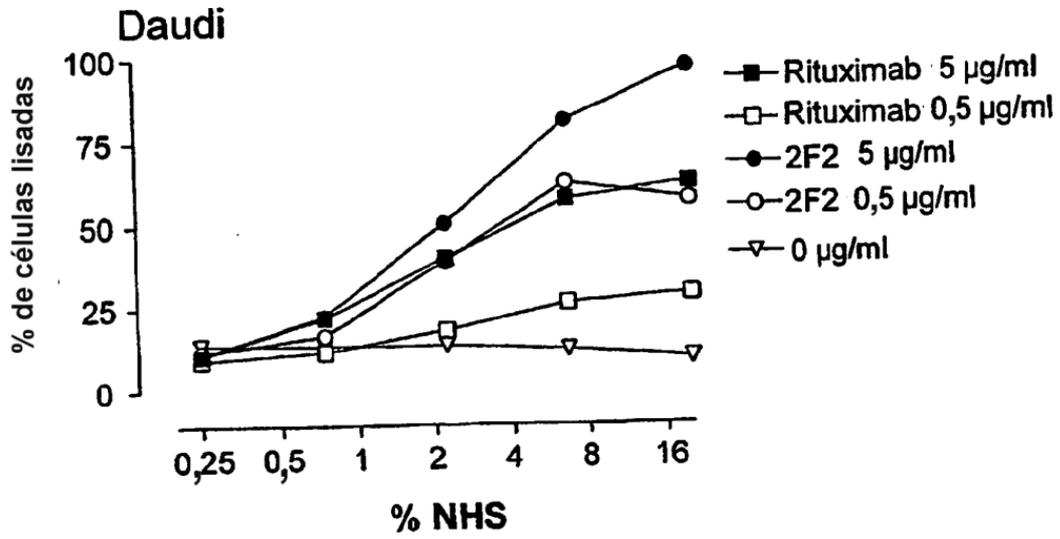


Fig. 12A

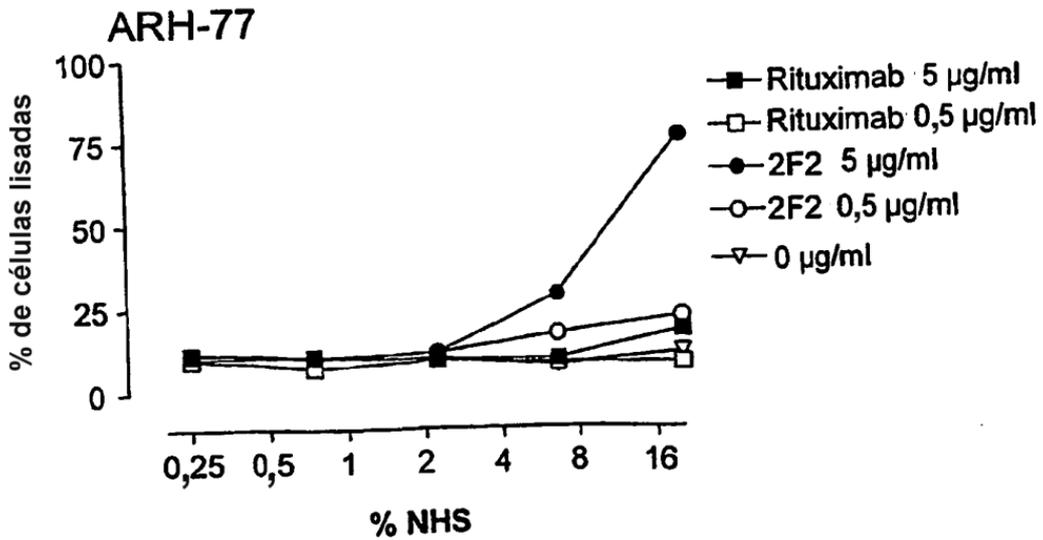


Fig. 12B

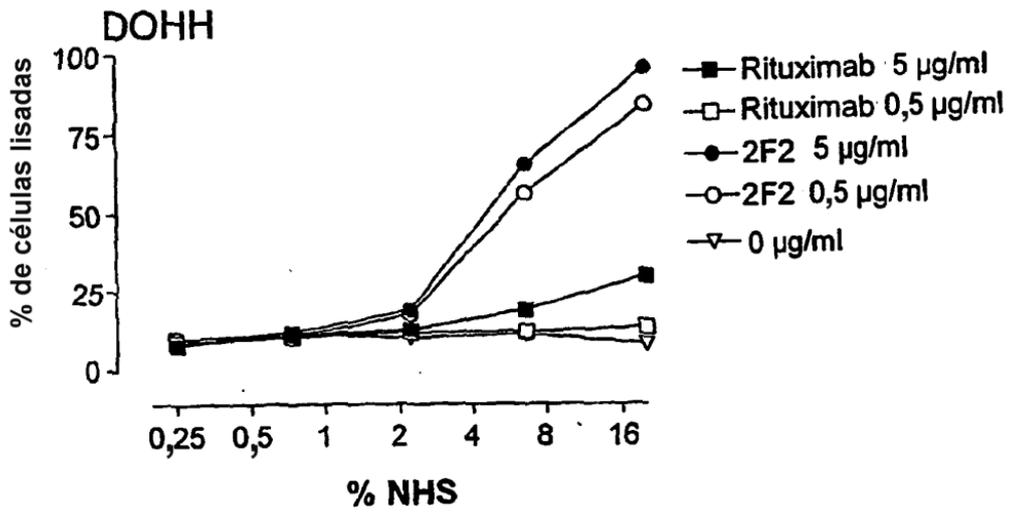


Fig. 12C

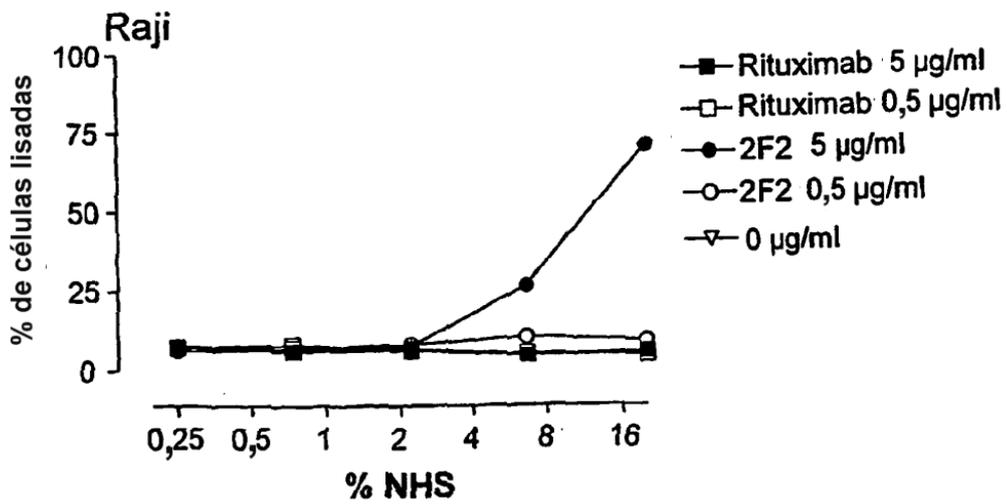


Fig. 12D

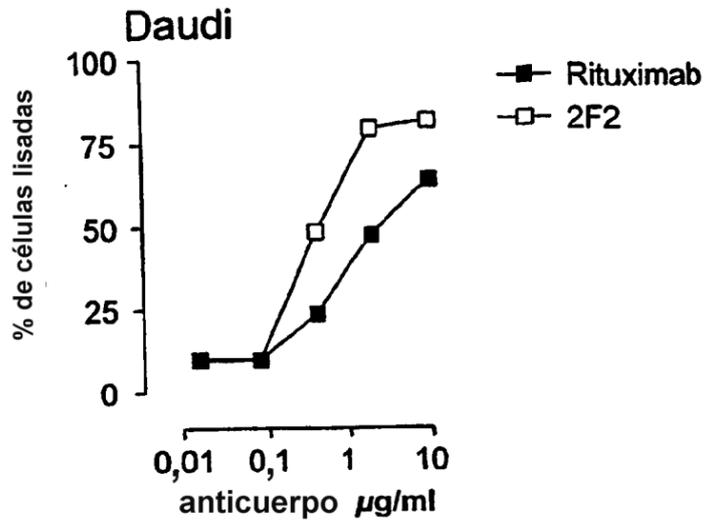


Fig. 13A

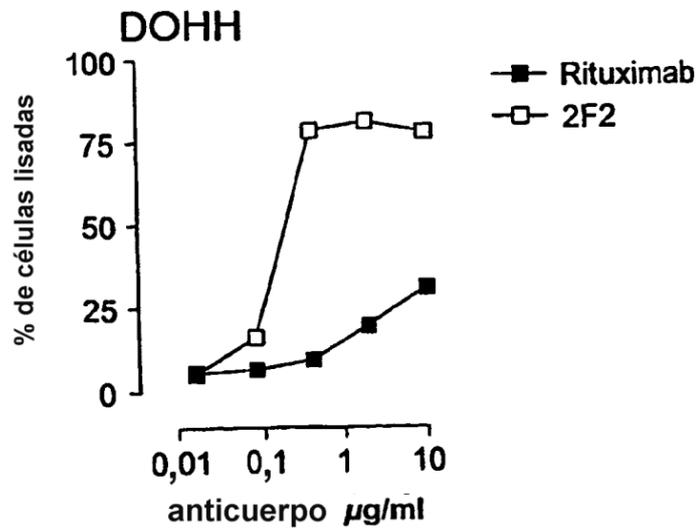


Fig. 13B

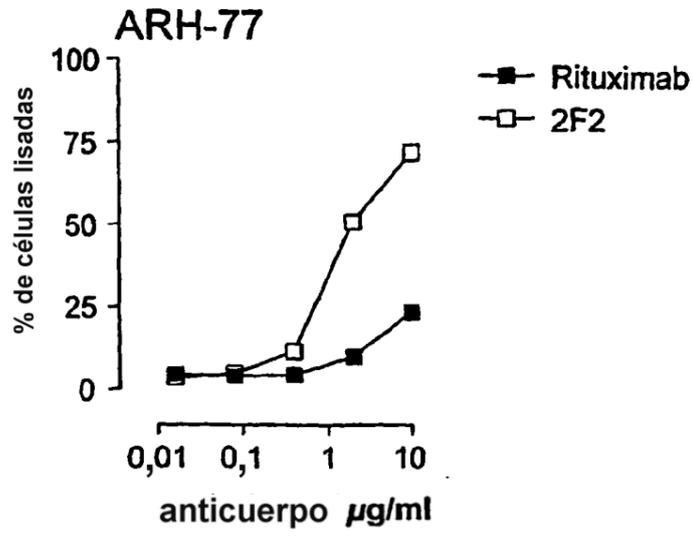


Fig. 13C

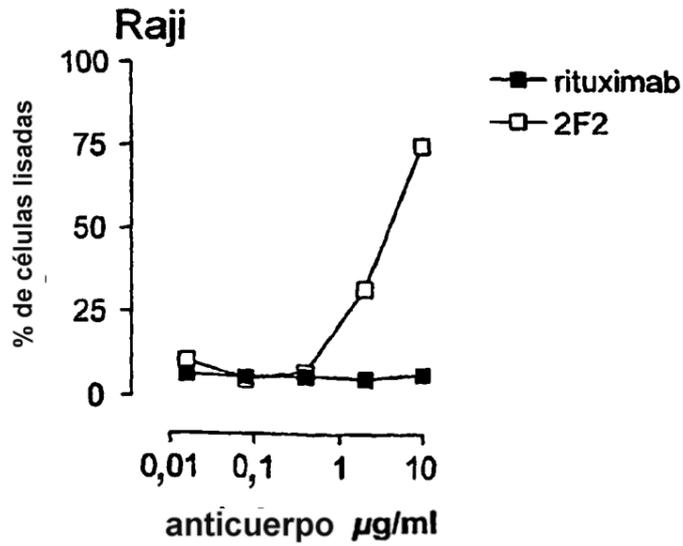


Fig. 13D

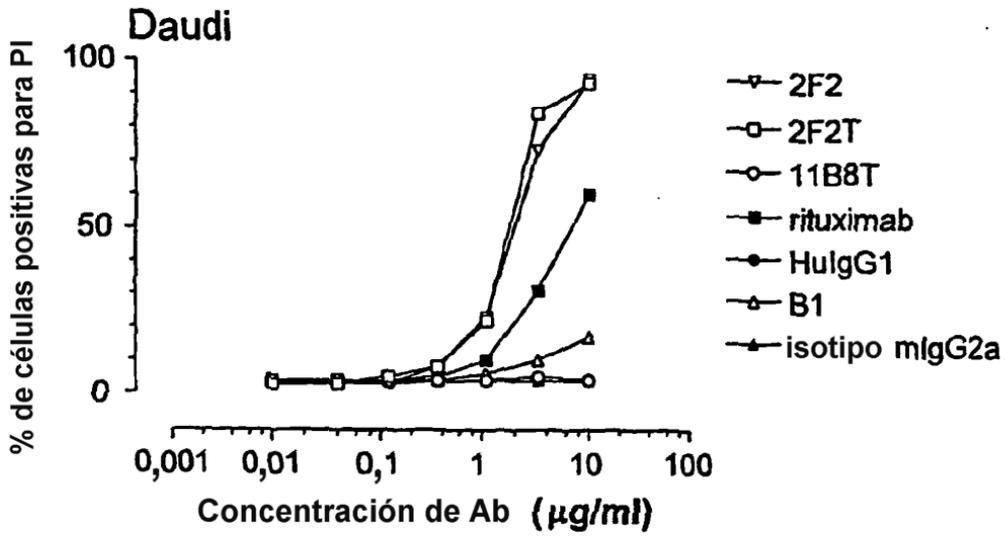


Fig. 14A

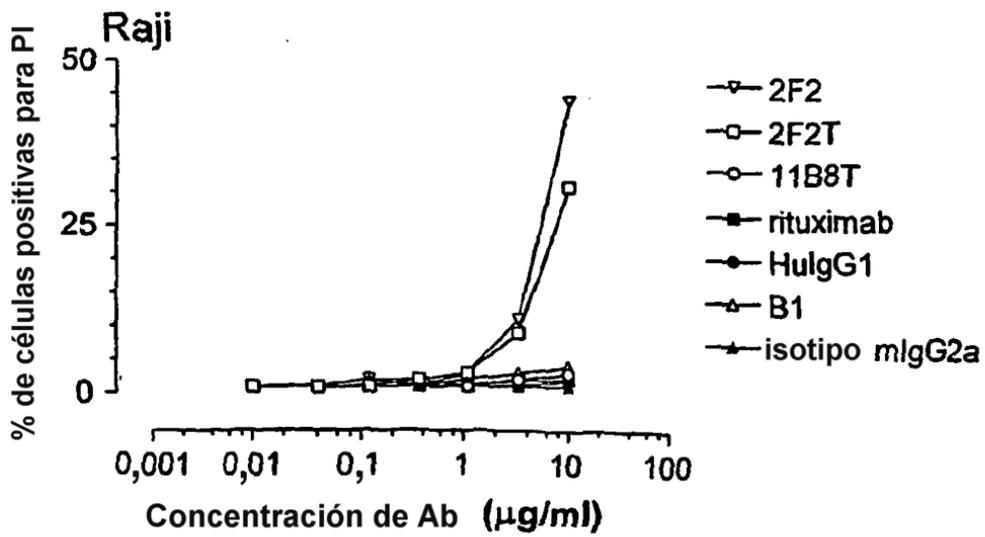


Fig. 14B

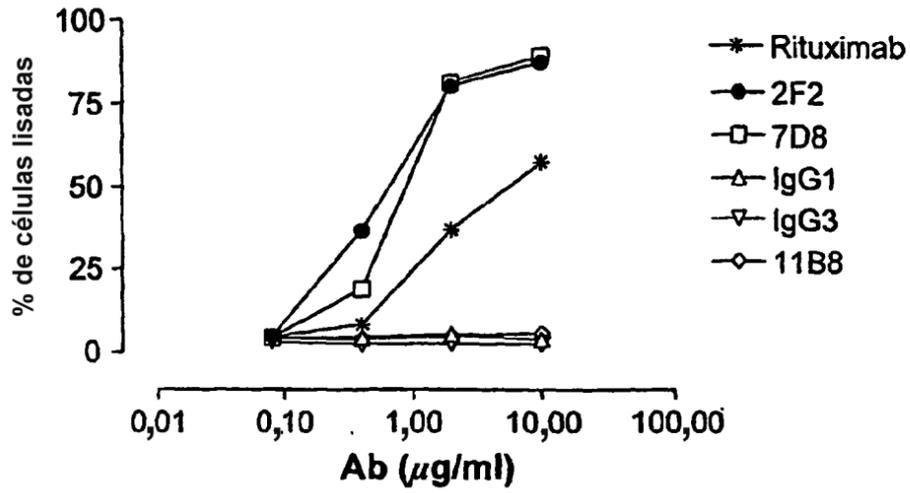


Fig. 15A

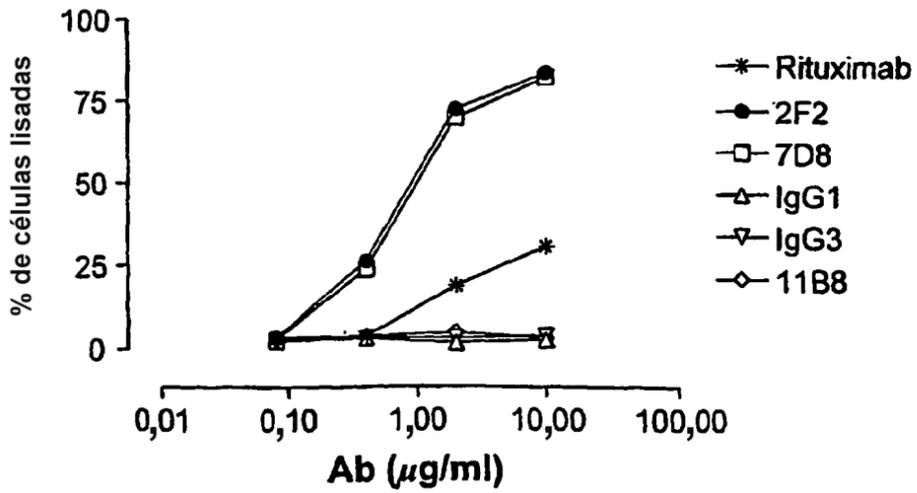


Fig. 15B

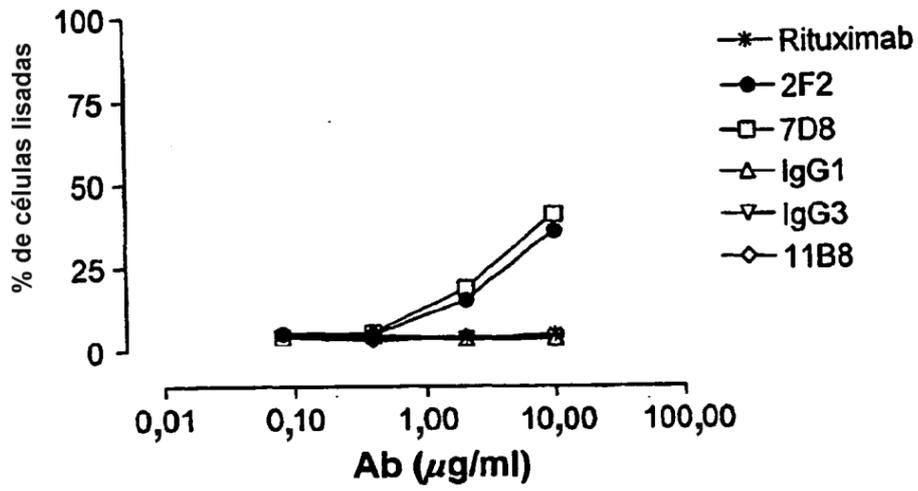


Fig. 16A

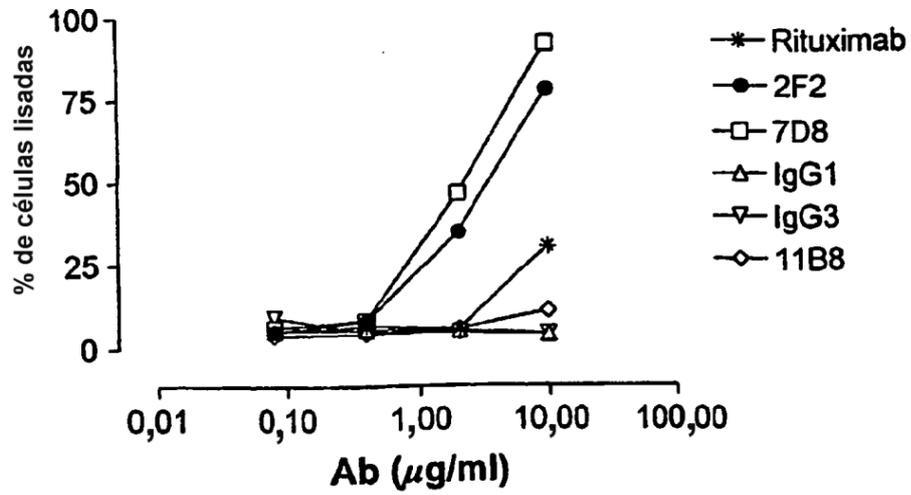


Fig. 16B

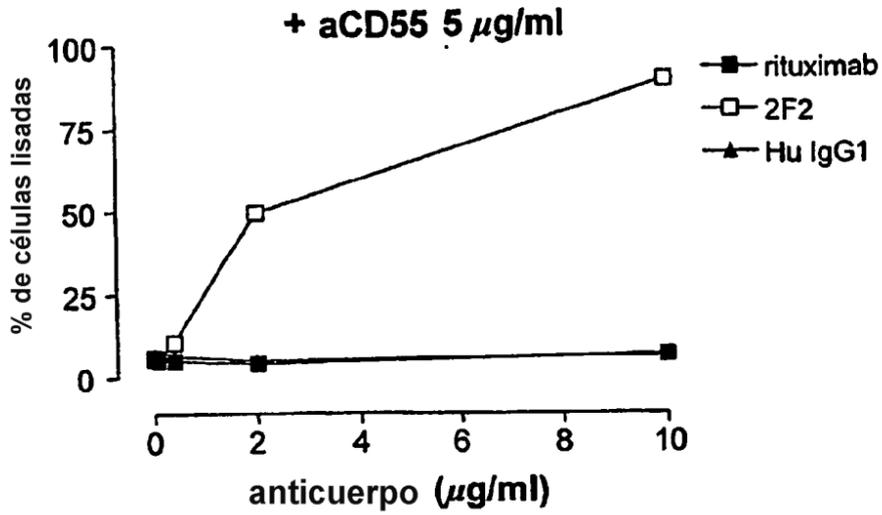


Fig. 17A

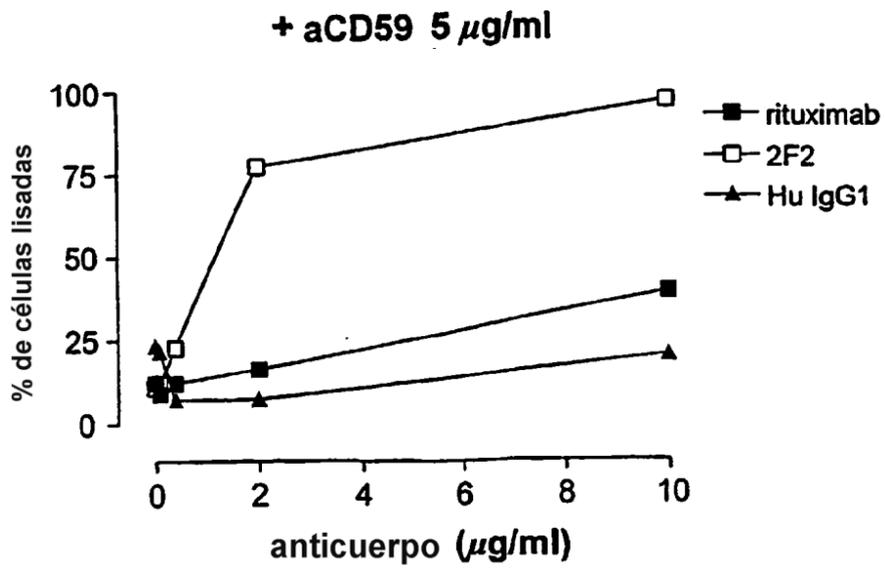


Fig. 17B

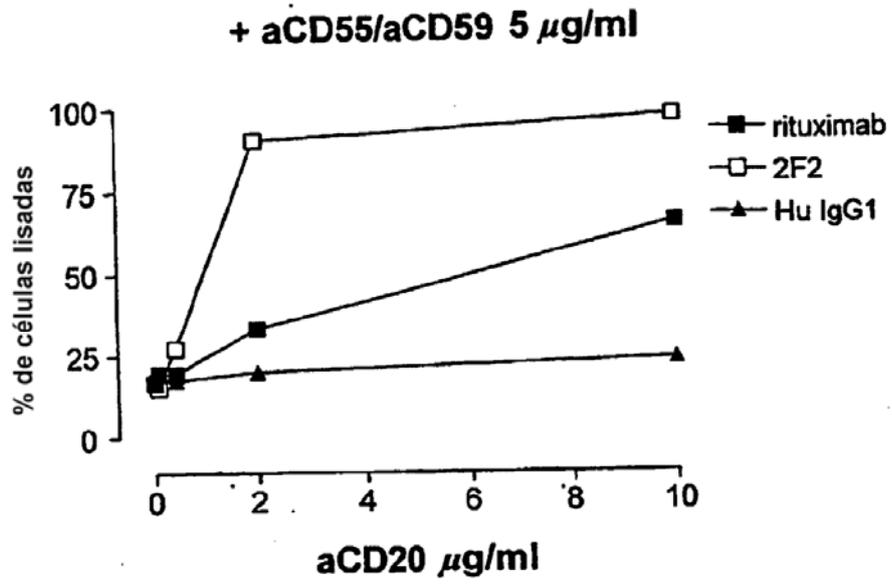


Fig. 17C

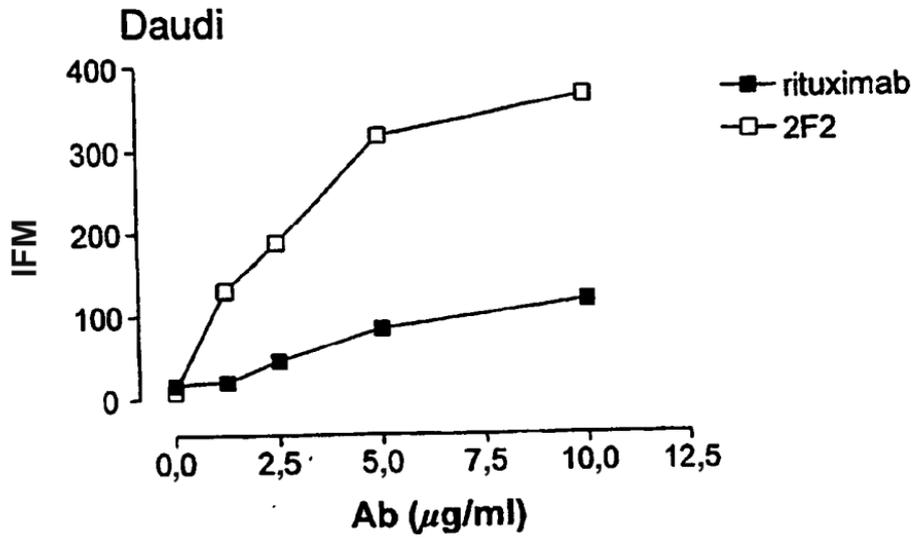


Fig. 18A

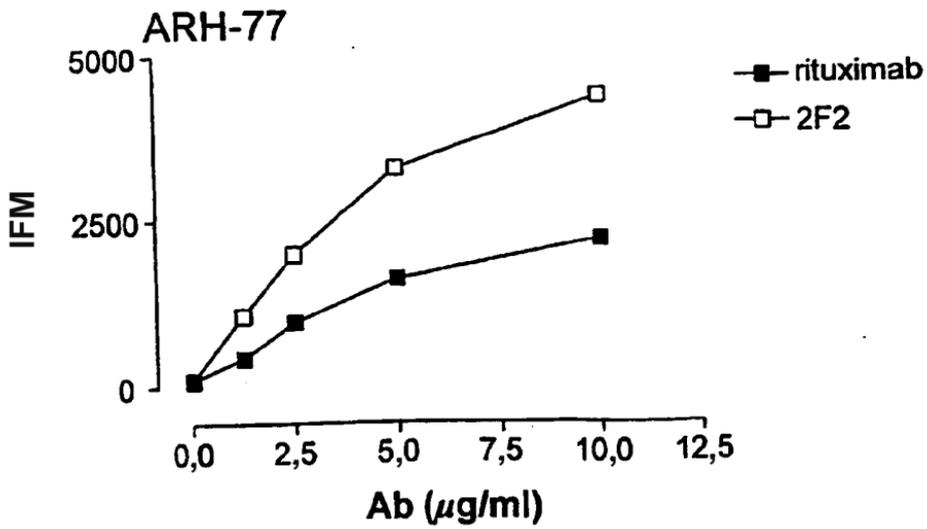


Fig. 18B

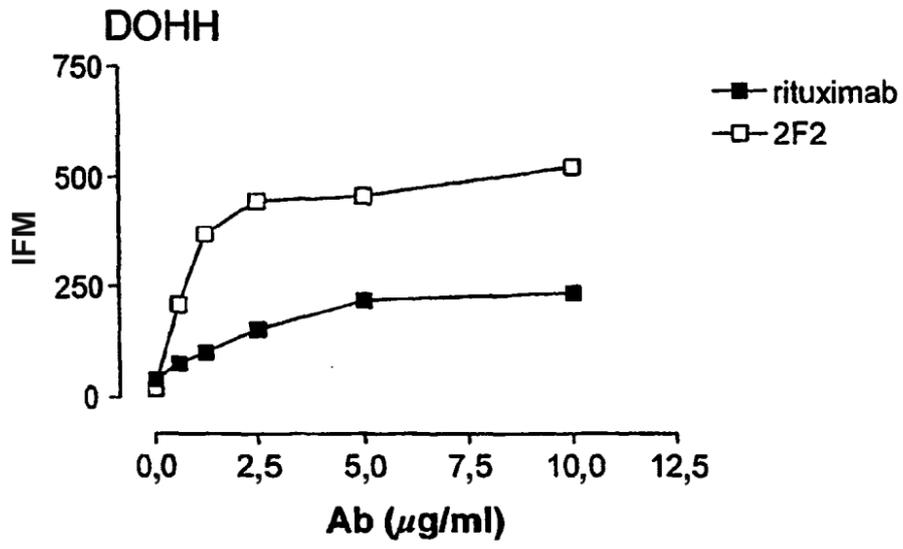


Fig. 18C

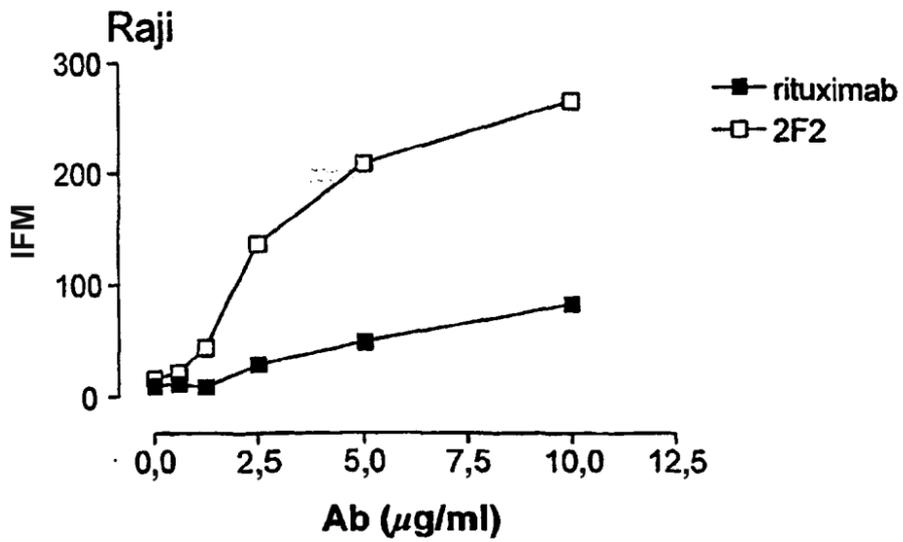


Fig. 18D

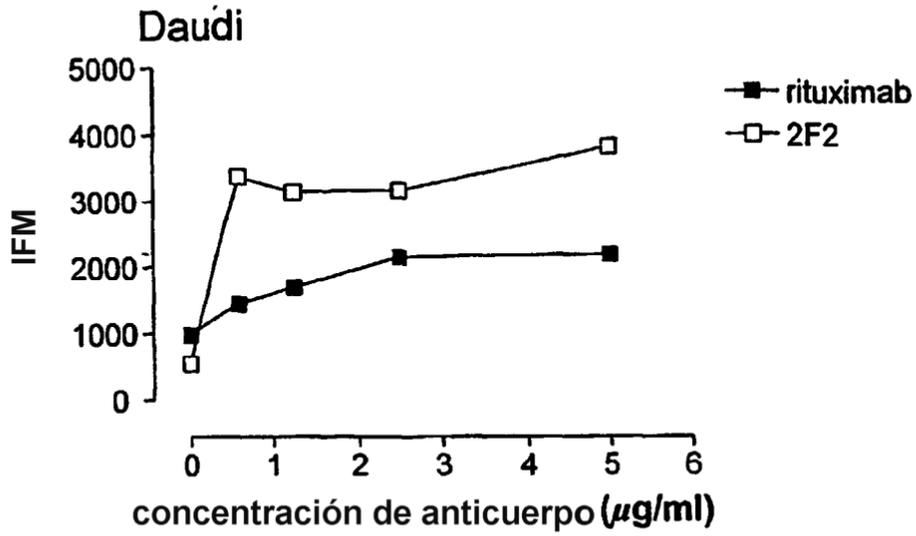


Fig. 19A

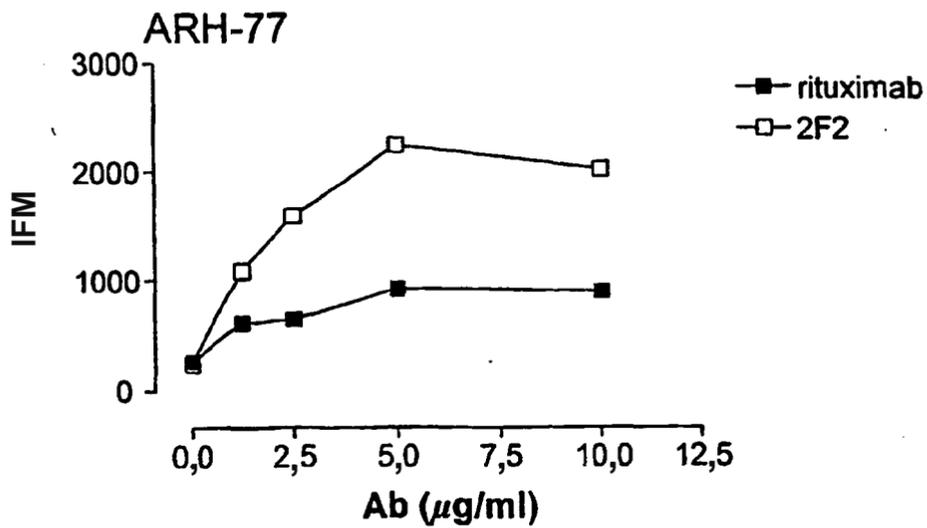


Fig. 19B

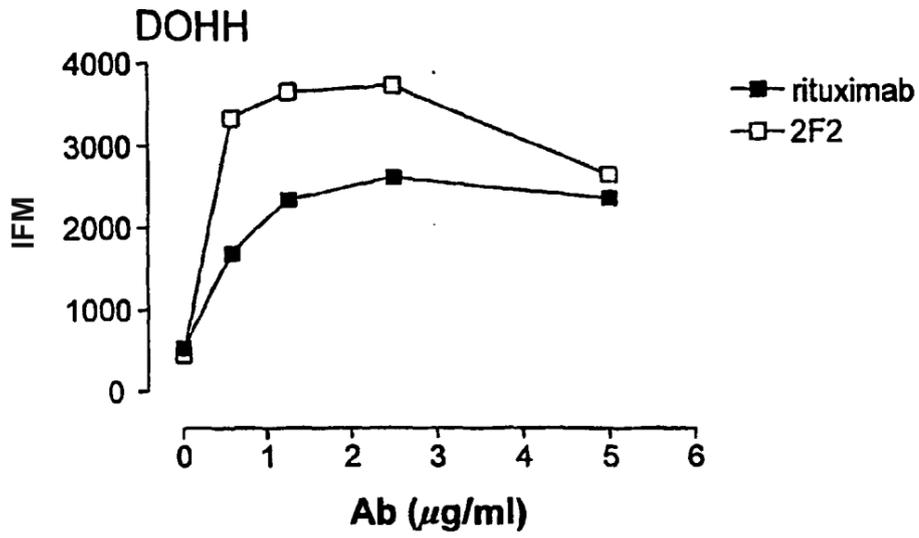


Fig. 19C

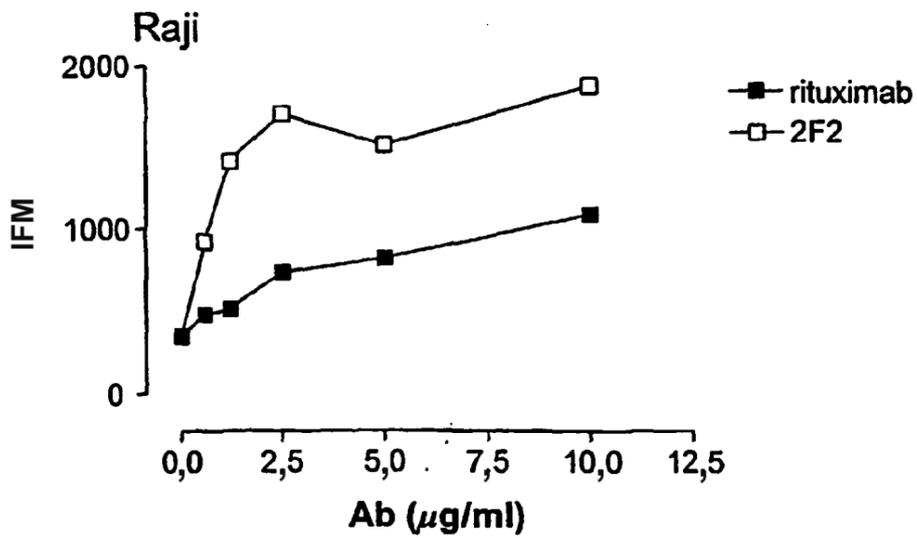


Fig. 19D

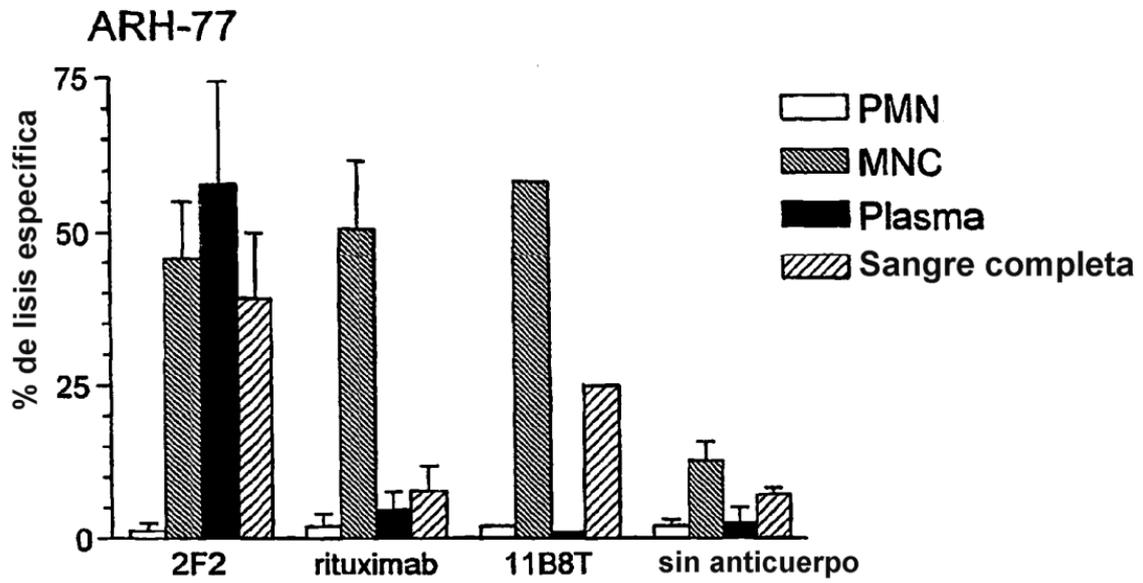


Fig. 20

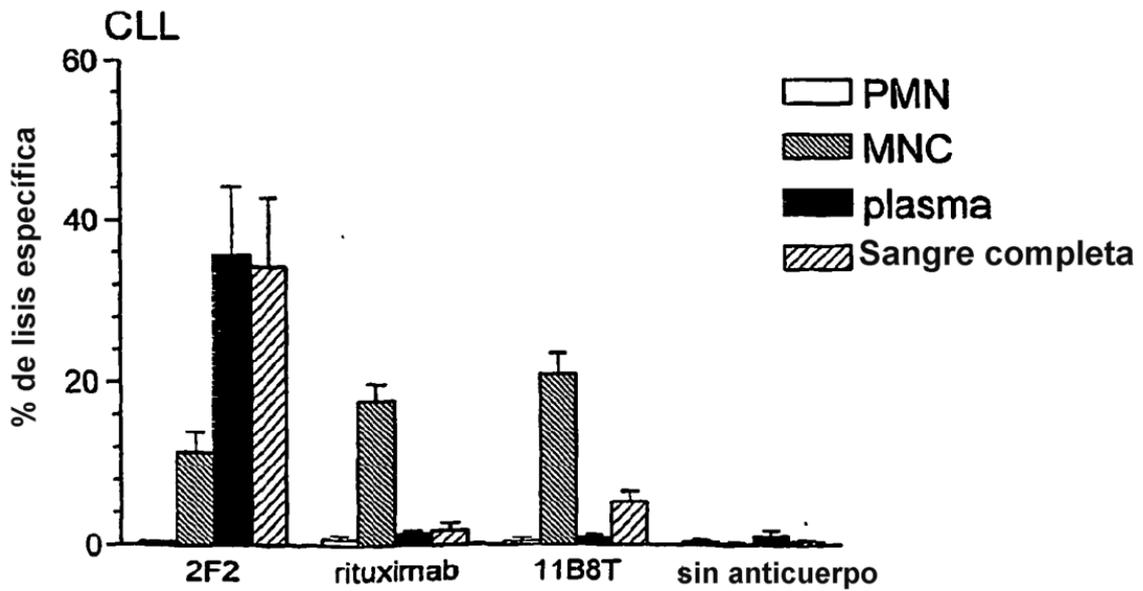


Fig. 21

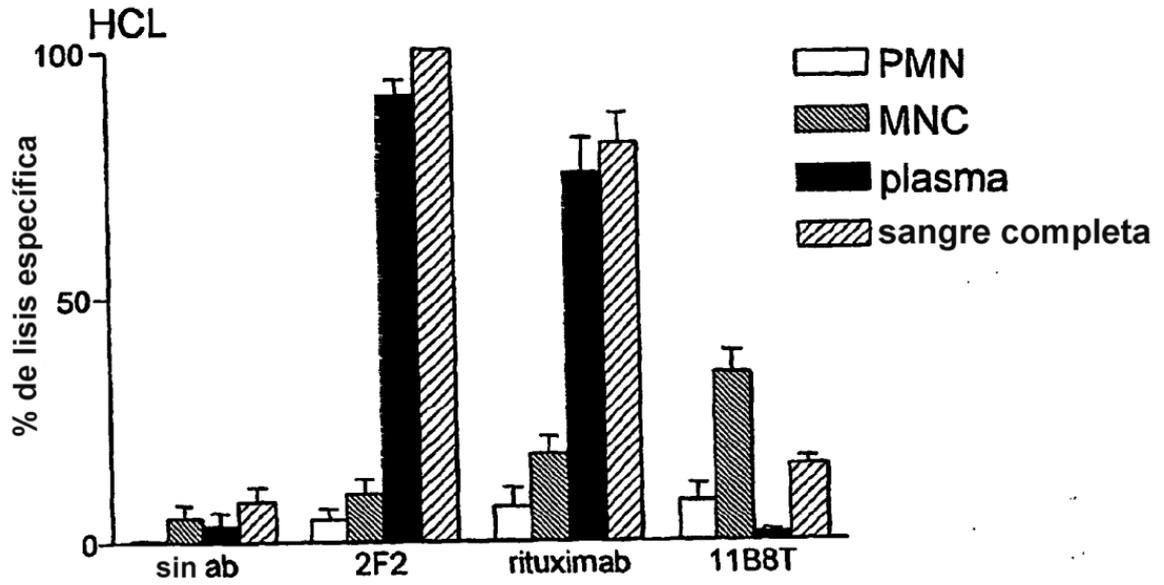


Fig. 22

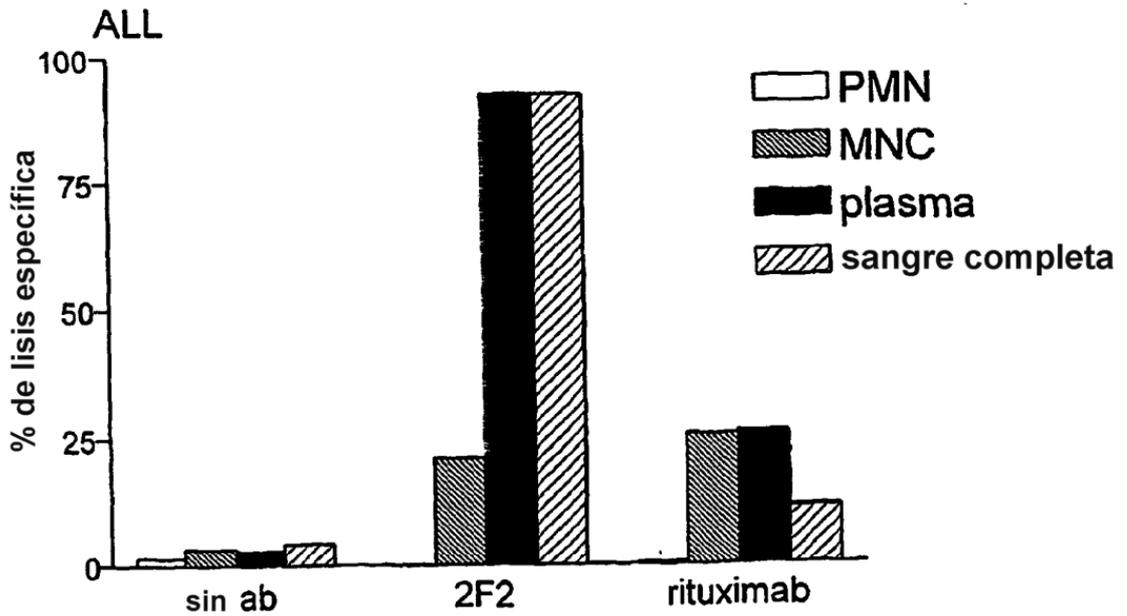


Fig. 23

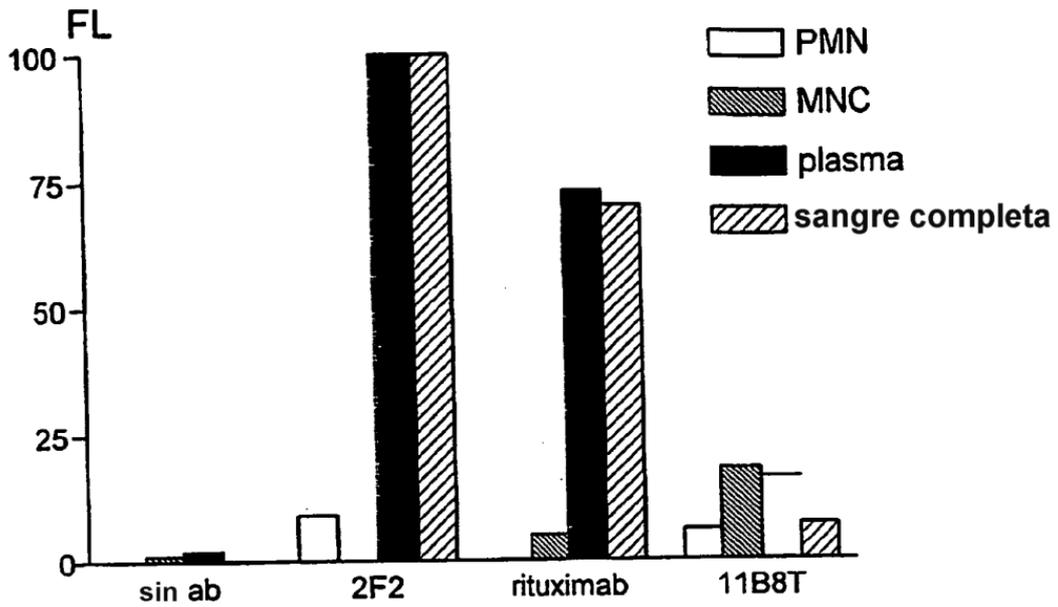


Fig. 24

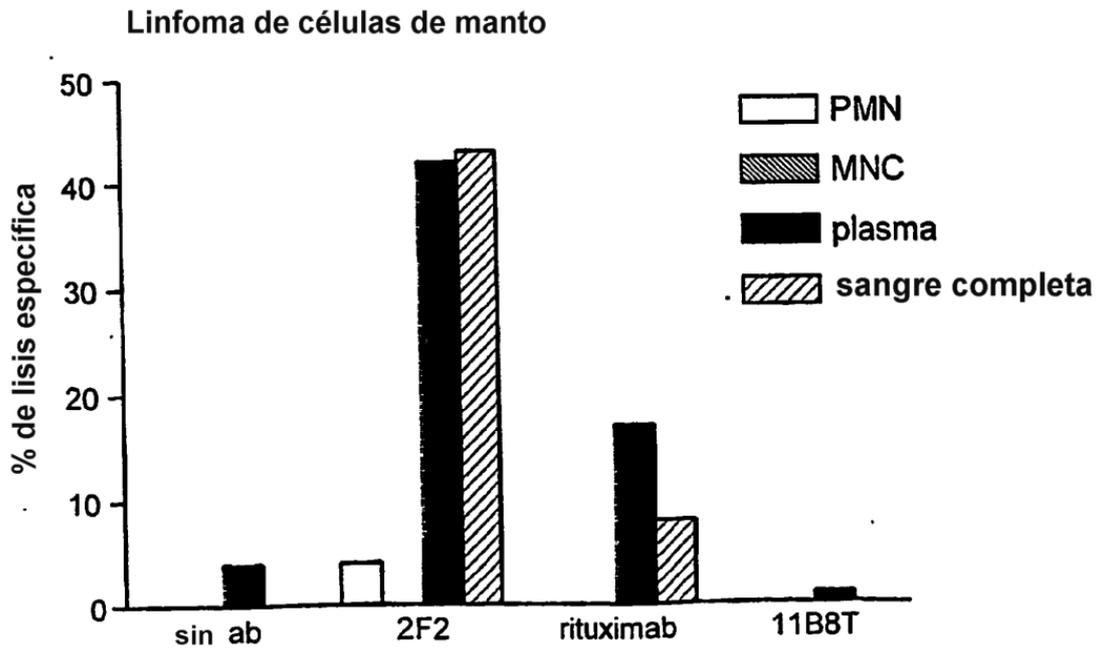


Fig. 25

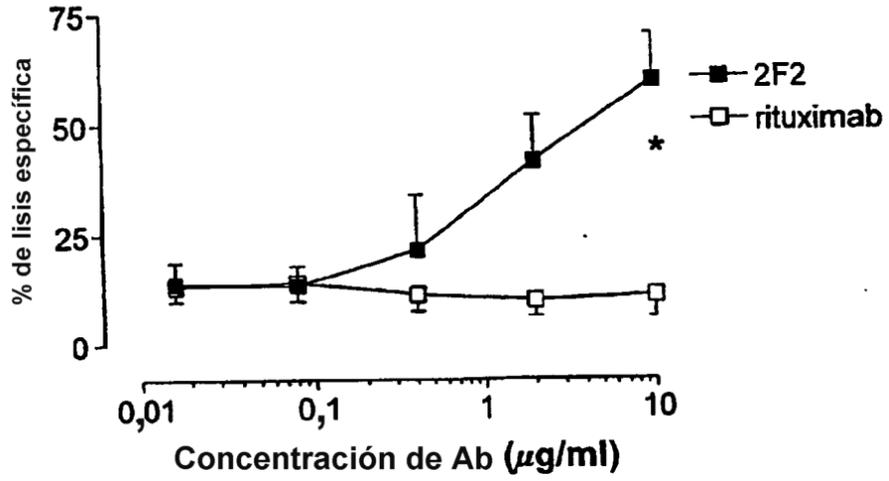


Fig. 26

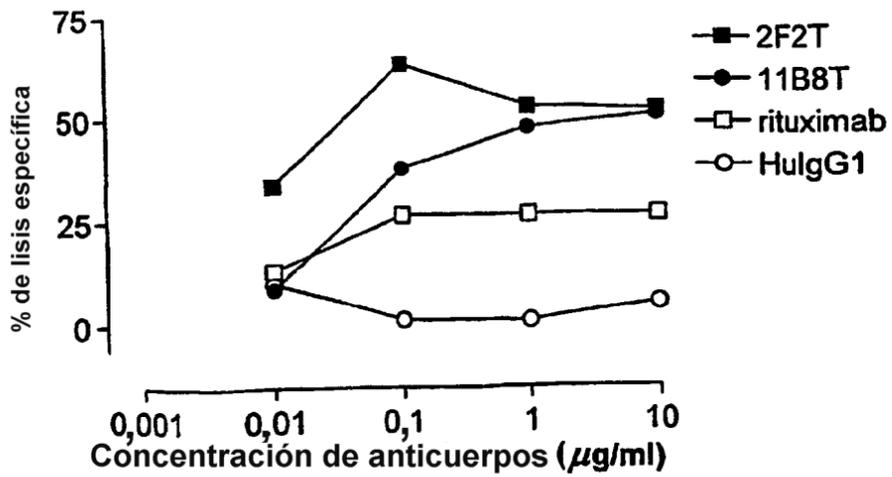


Fig. 27

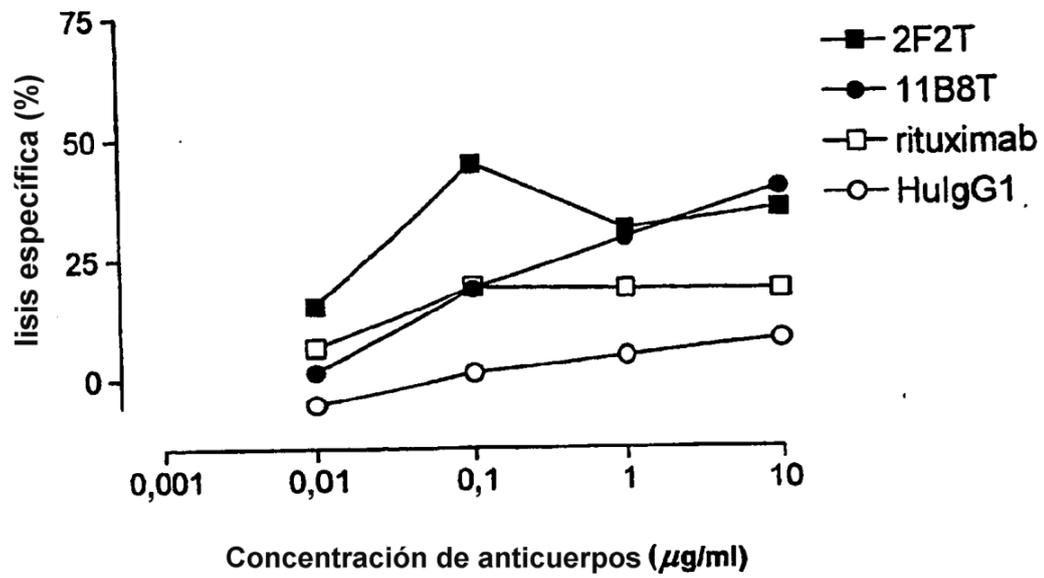


Fig. 28

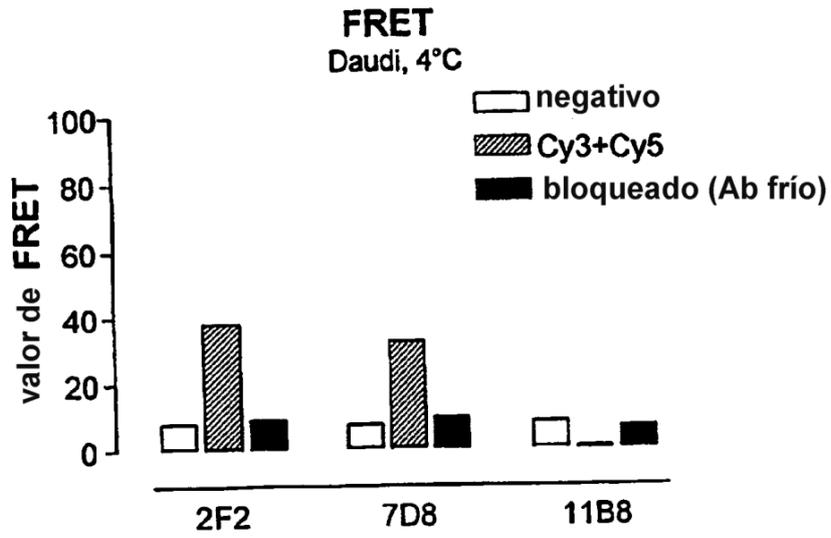


Fig. 29A

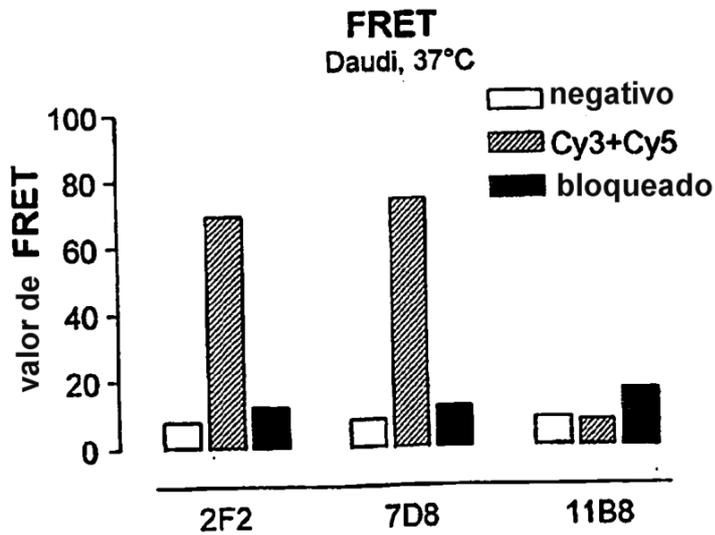


Fig. 29B

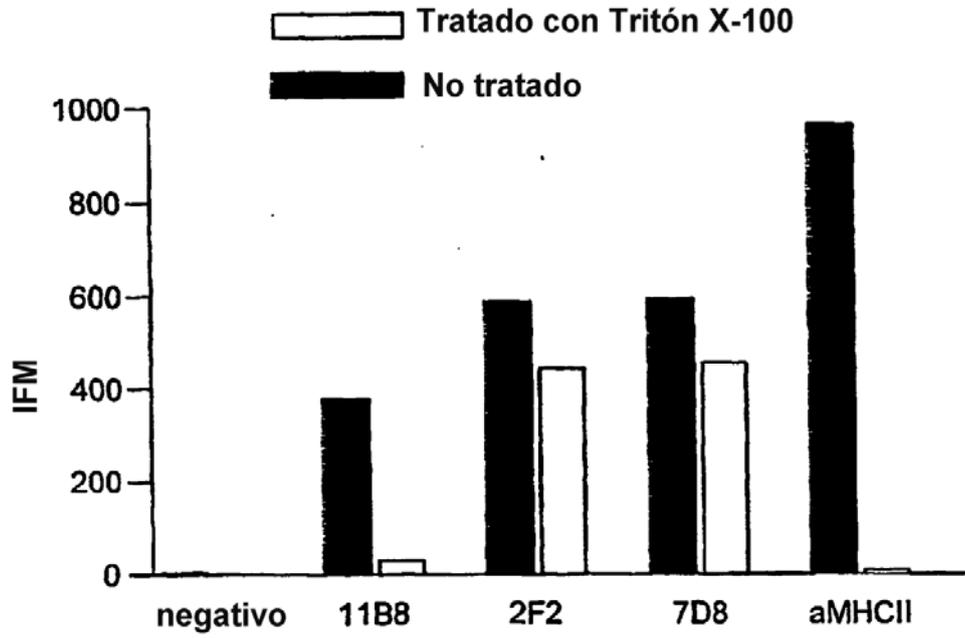


Fig. 29C

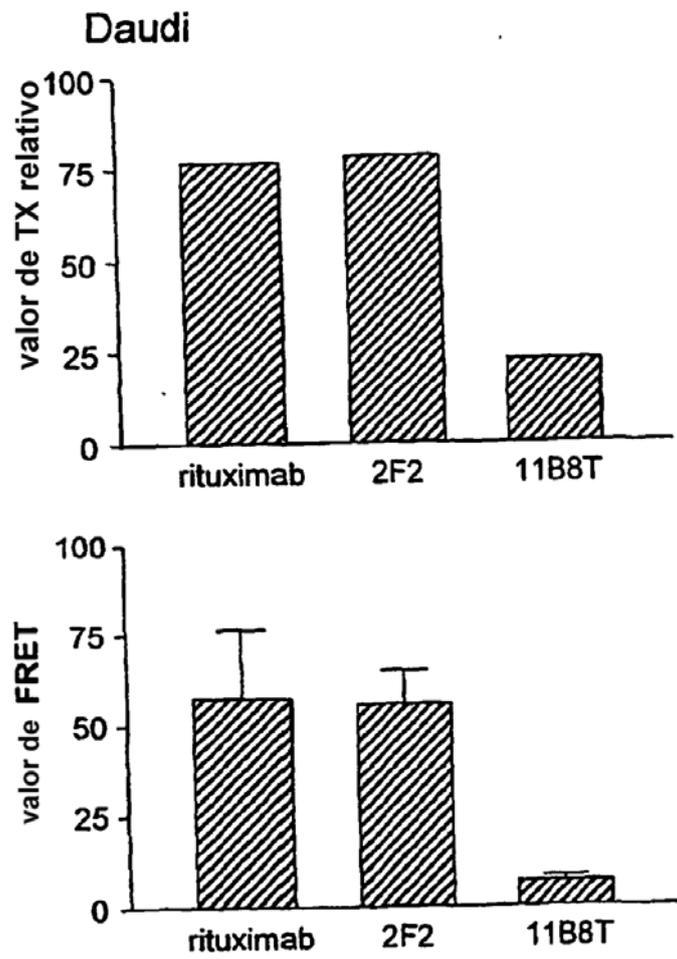


Fig. 30

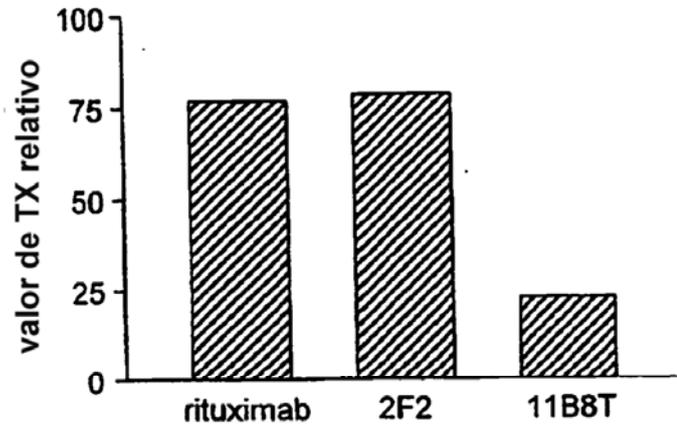


Fig. 31

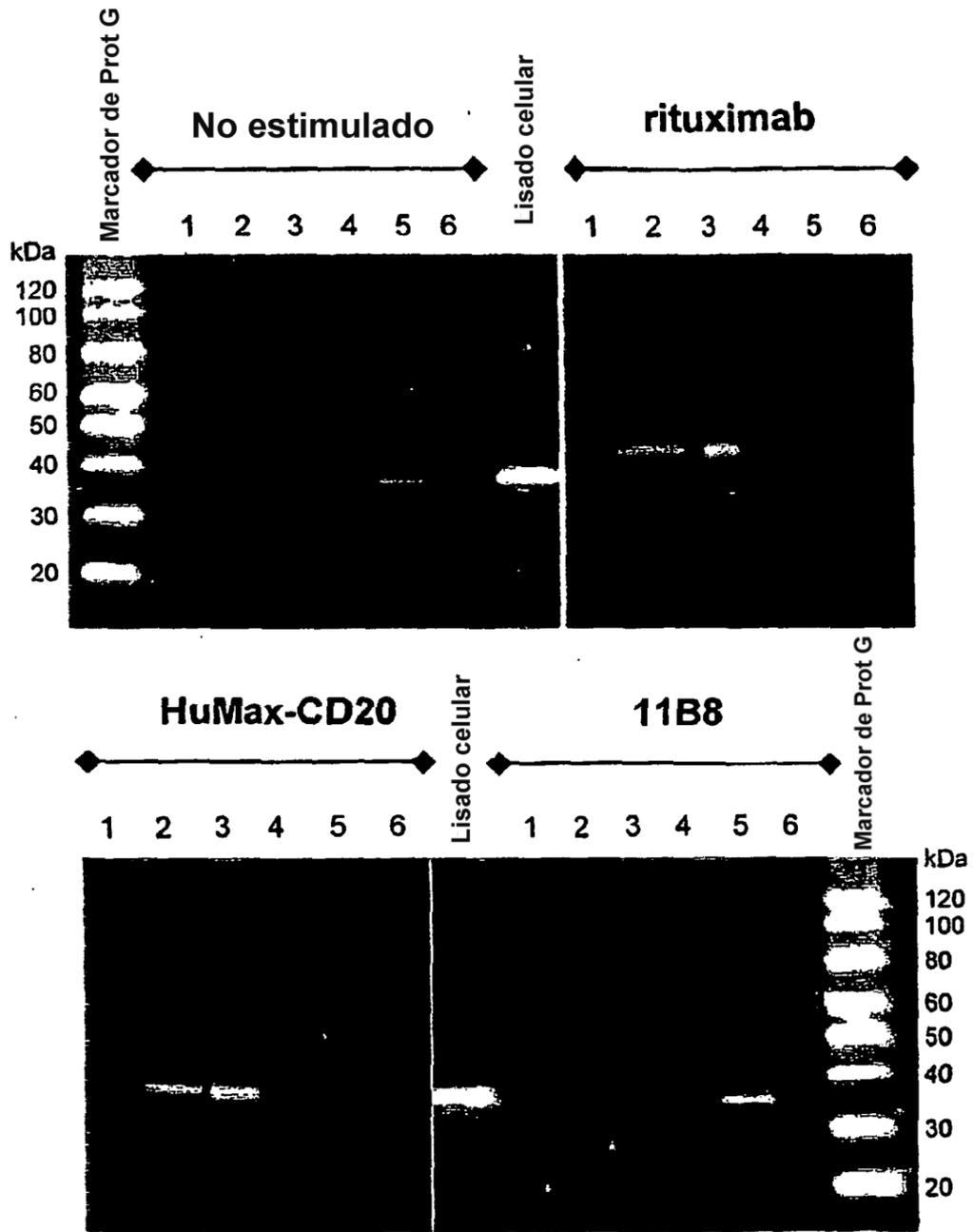


Fig. 32

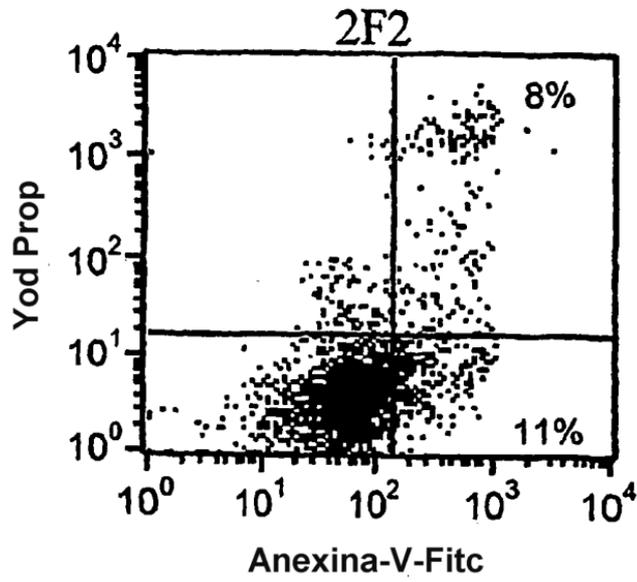


Fig. 33A

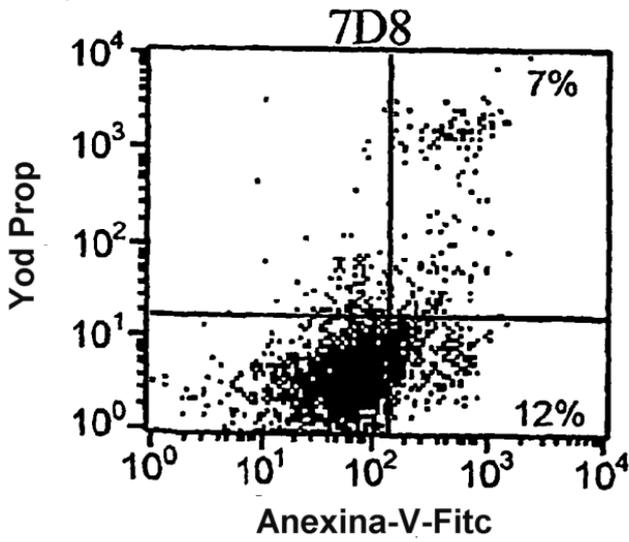


Fig. 33B

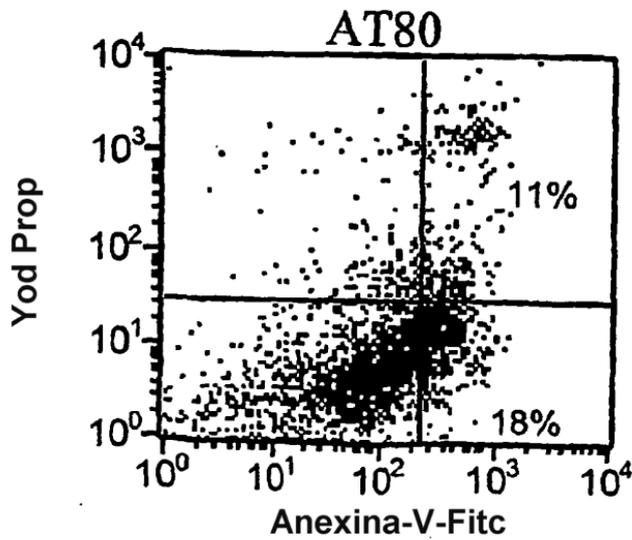


Fig. 33C

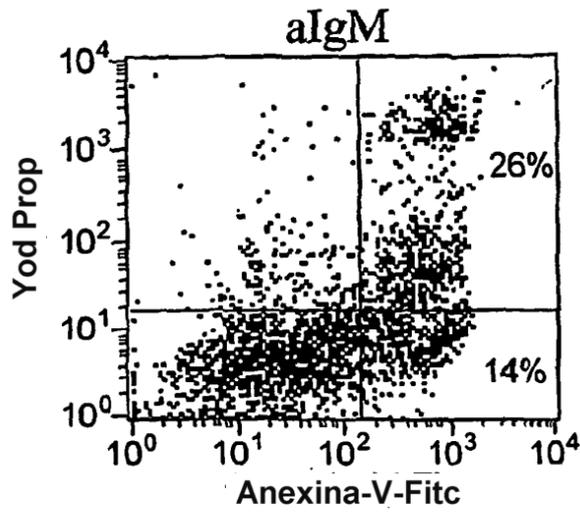


Fig. 33D

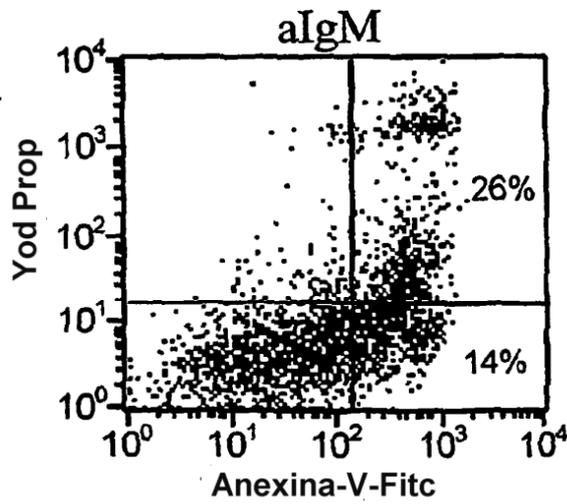


Fig. 33E

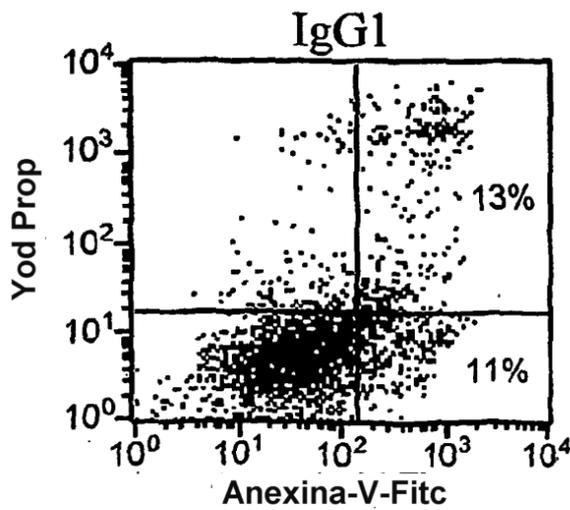


Fig. 33F

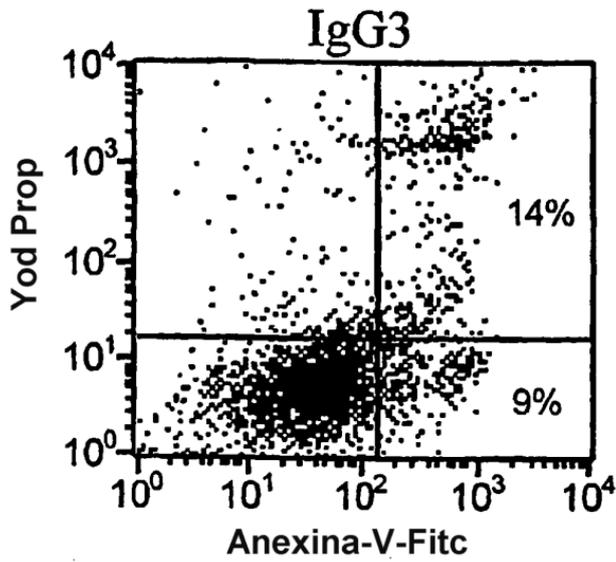


Fig. 33G

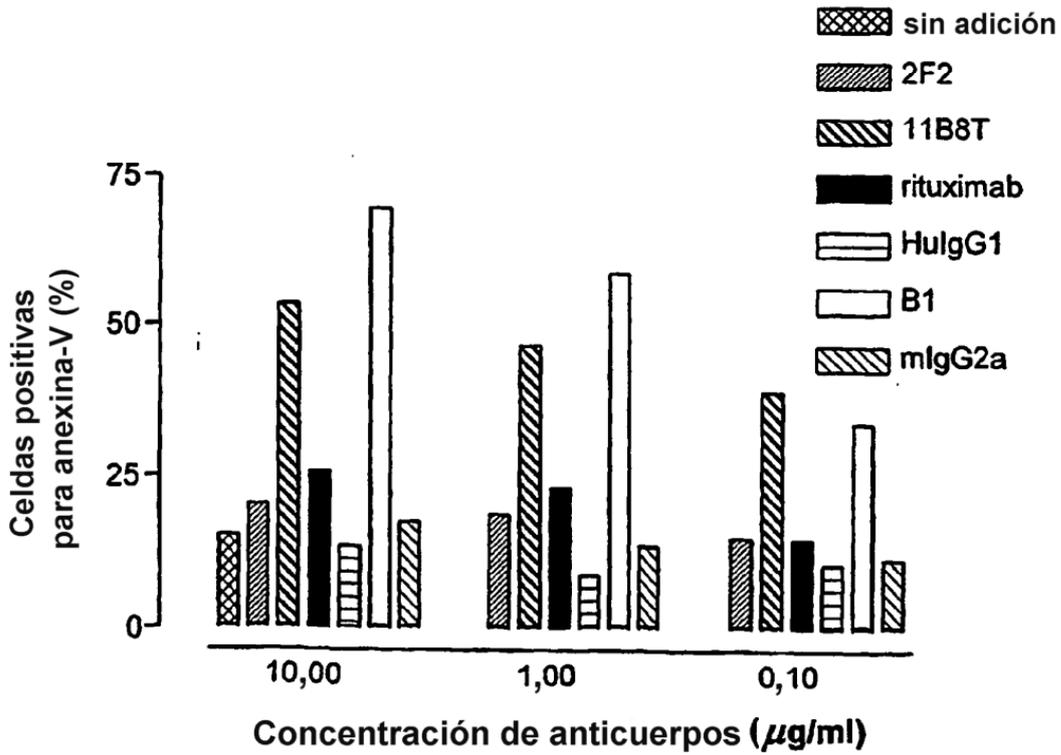


Fig. 34

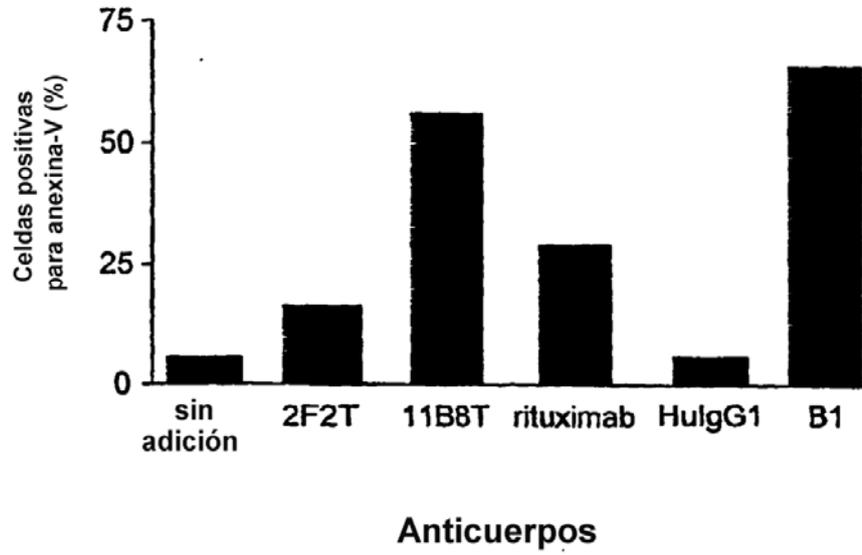


Fig. 35A

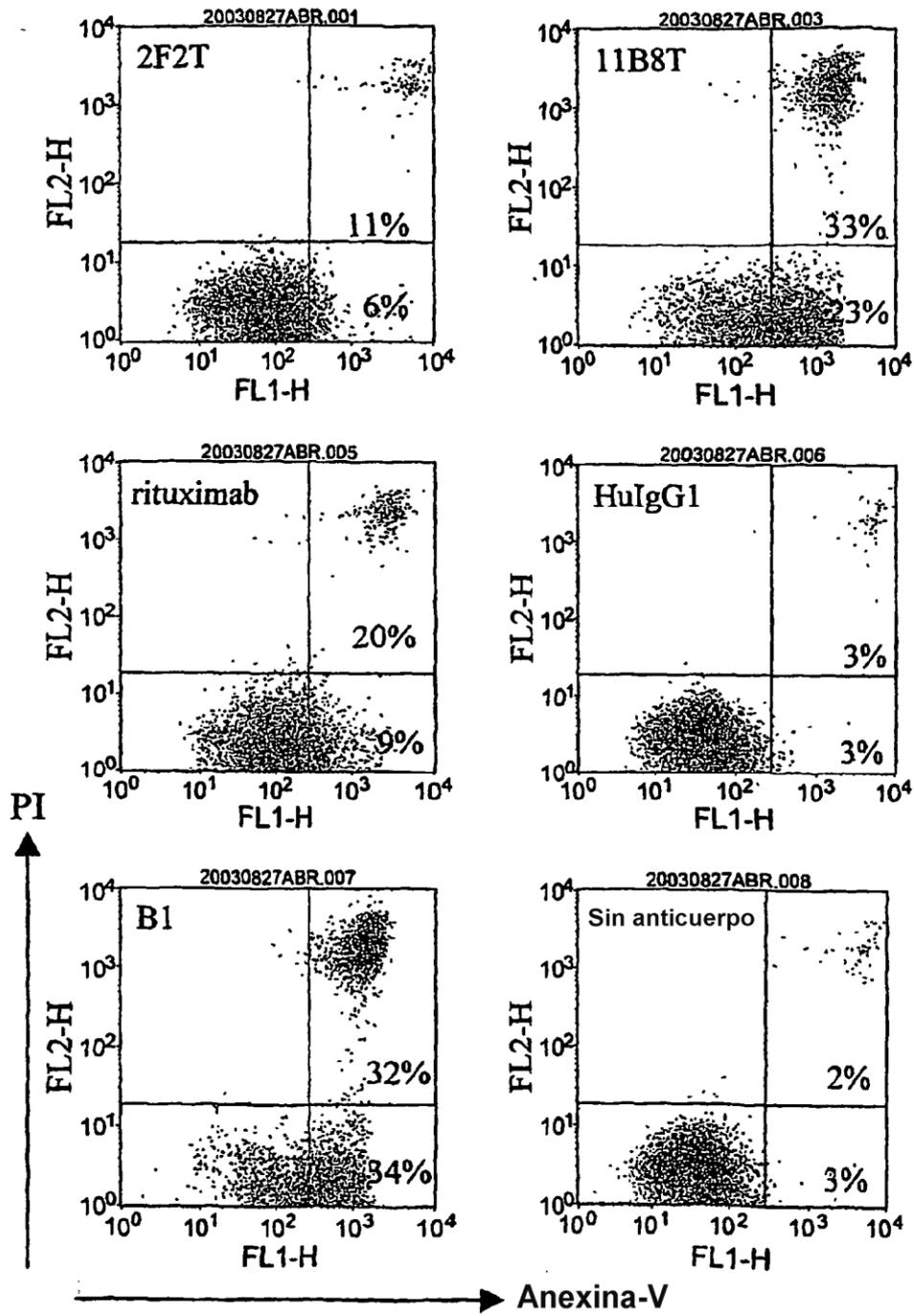


Fig. 35B

Adhesión homotípica de células Ramos.

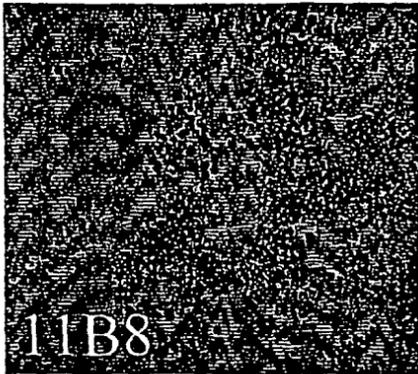


Fig. 36A

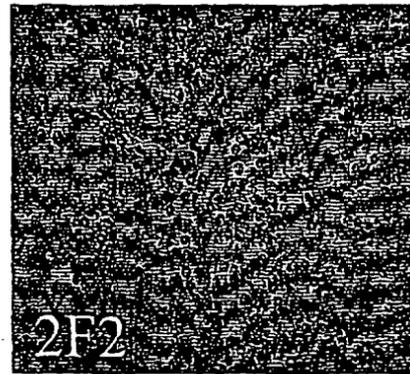


Fig. 36B

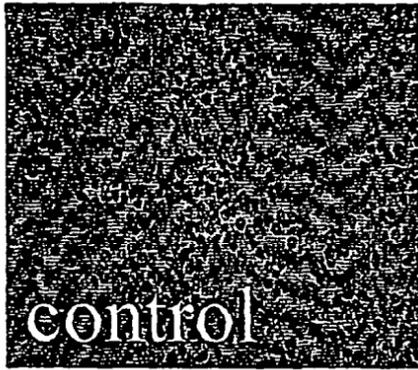


Fig. 36C

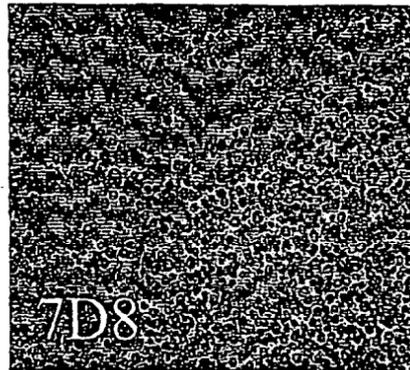


Fig. 36D

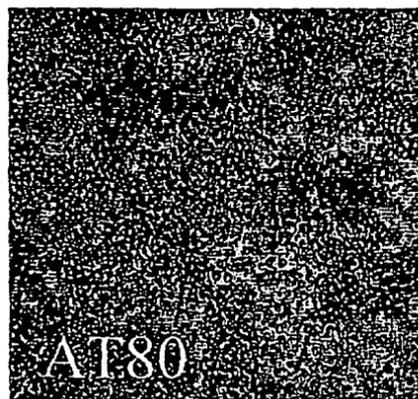


Fig. 36E

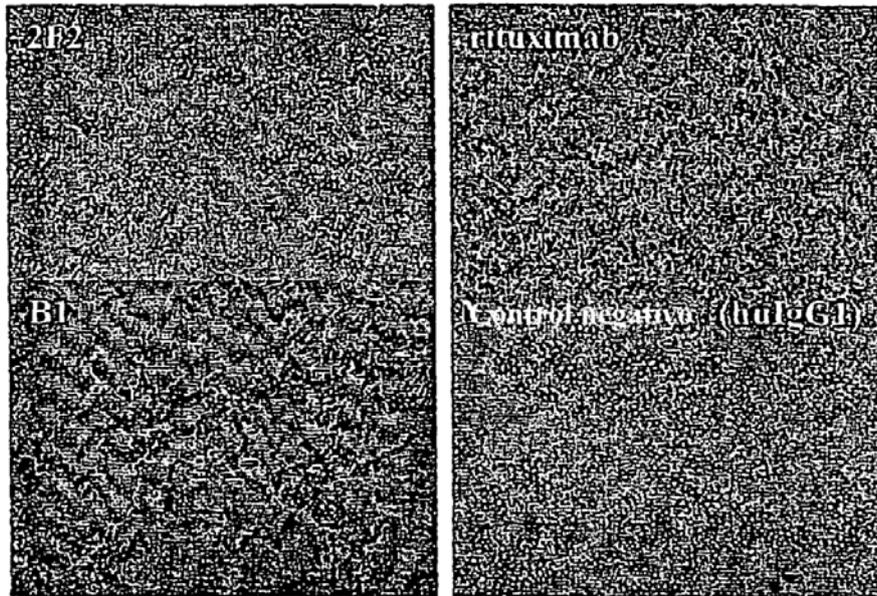


Fig. 37

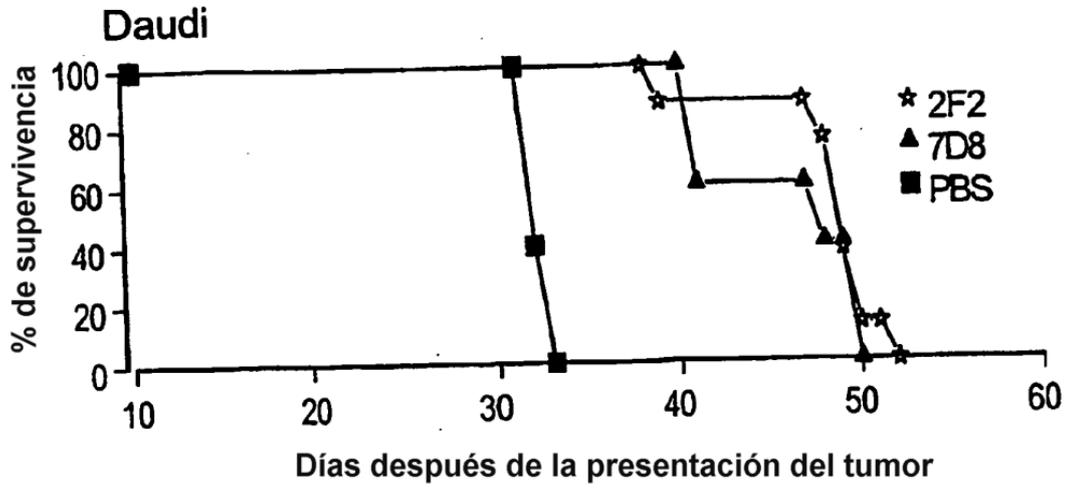


Fig. 38

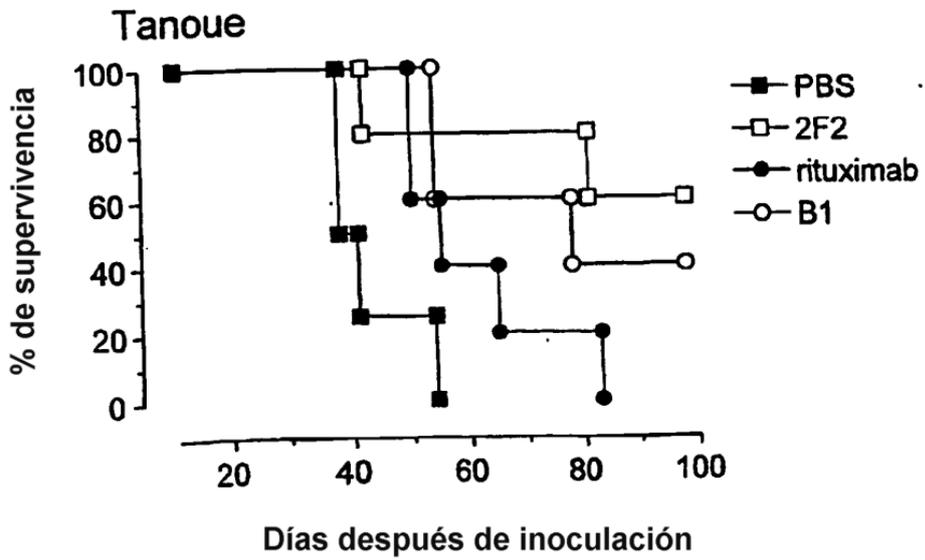


Fig. 39

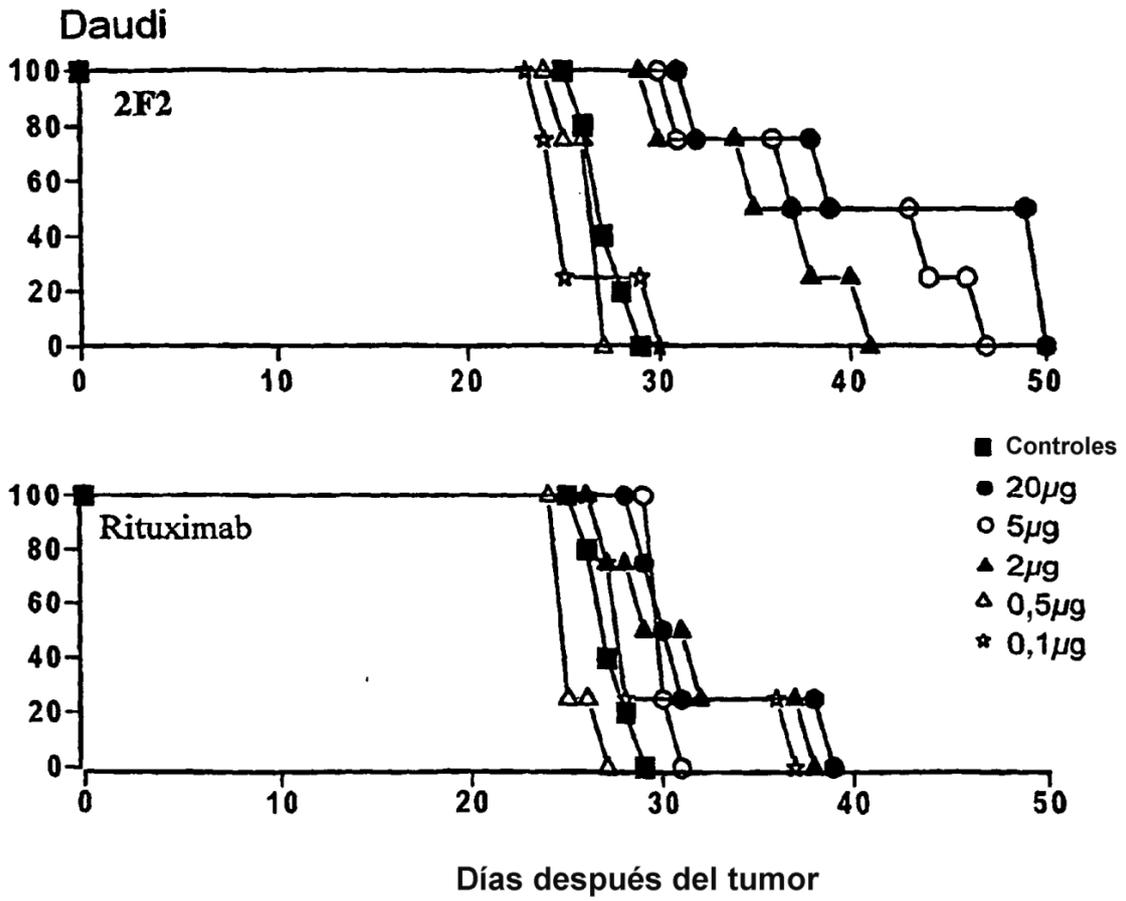


Fig. 40

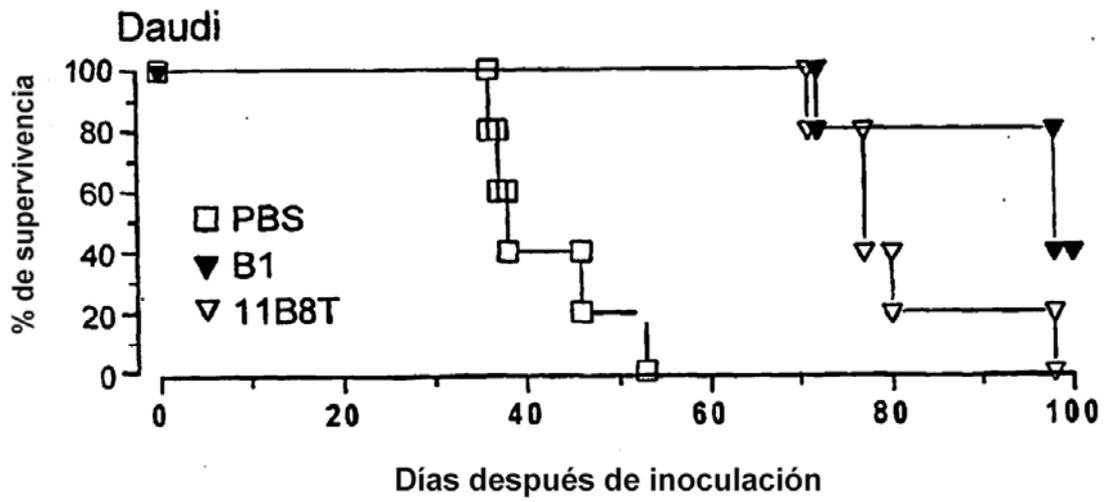


Fig. 41

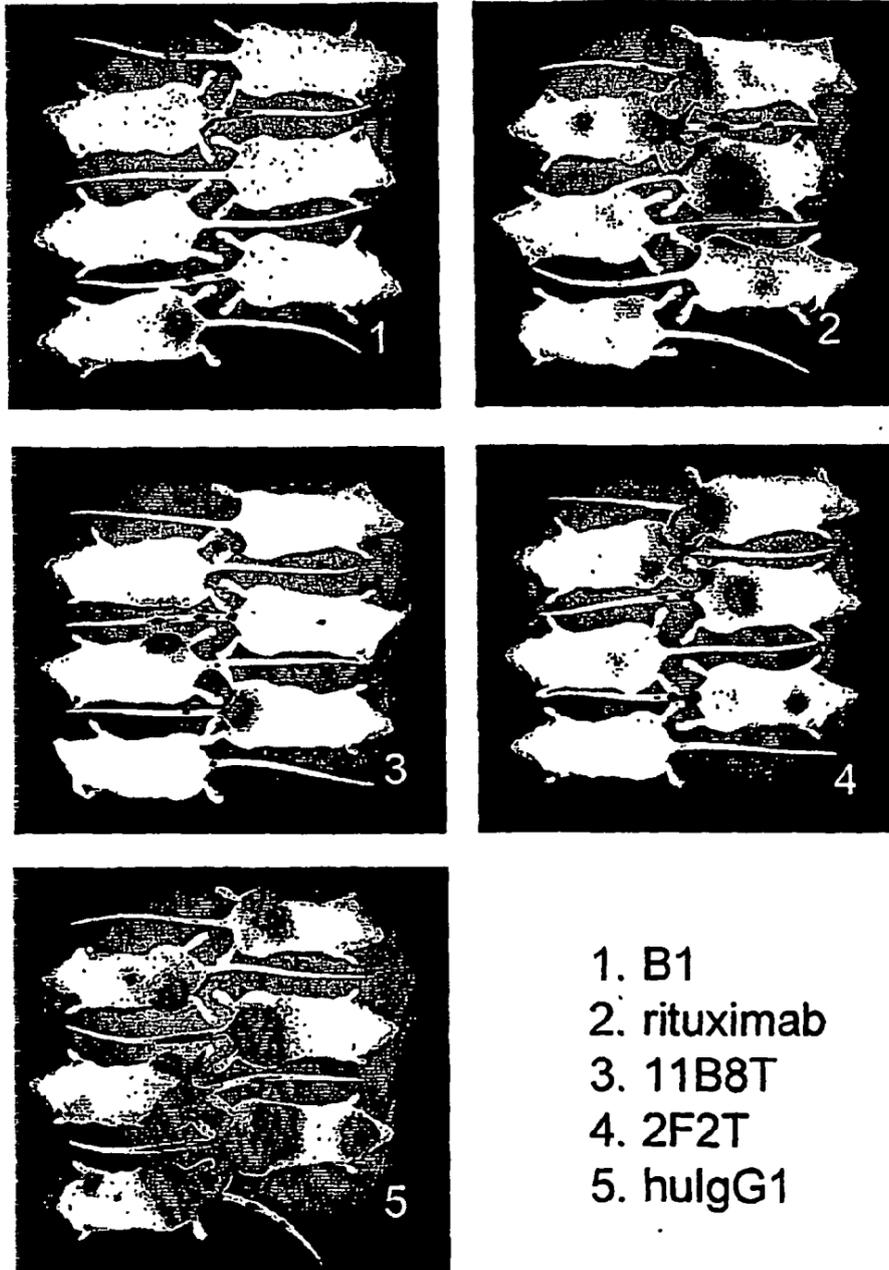


Fig. 42

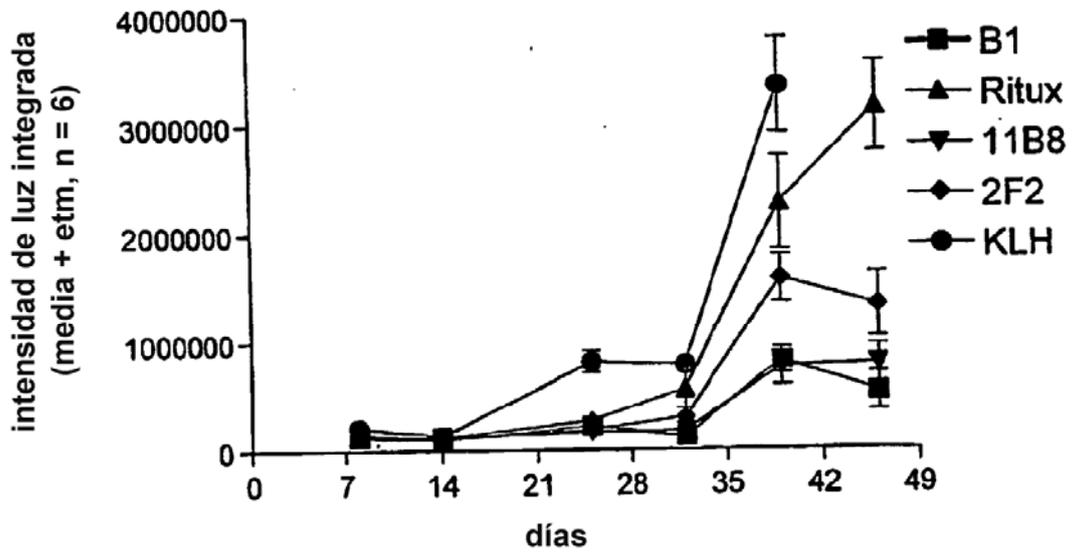


Fig. 43

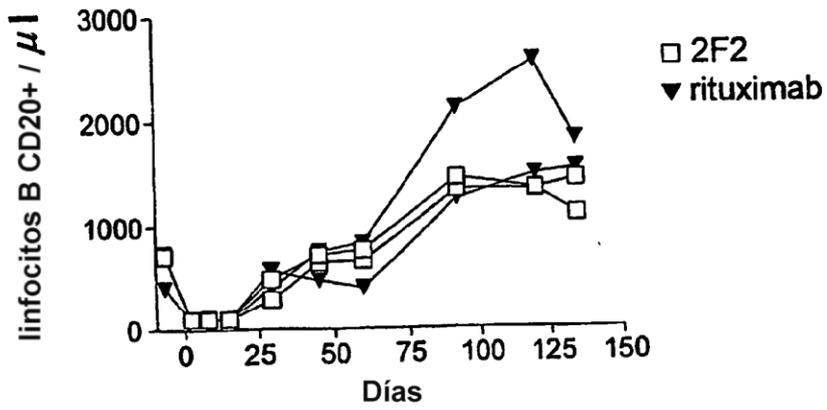


Fig. 44A

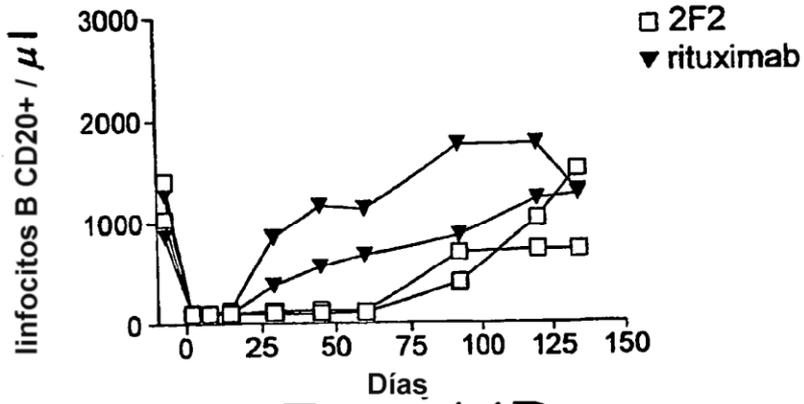


Fig. 44B

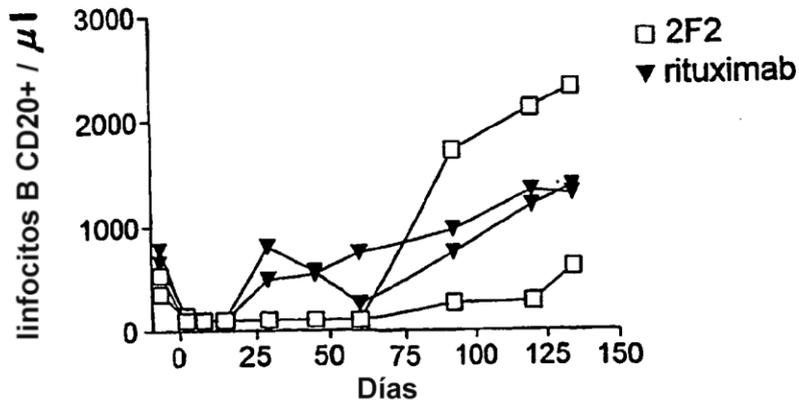


Fig. 44C

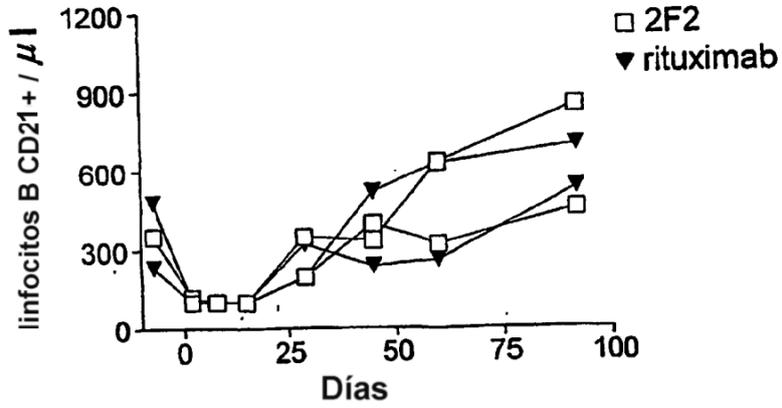


Fig. 45A

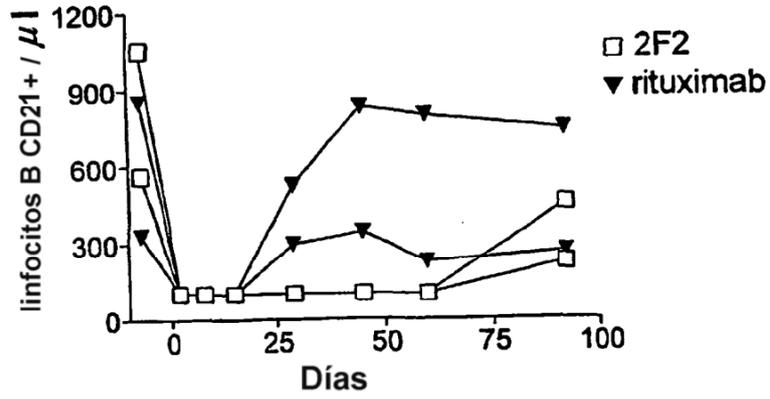


Fig. 45B

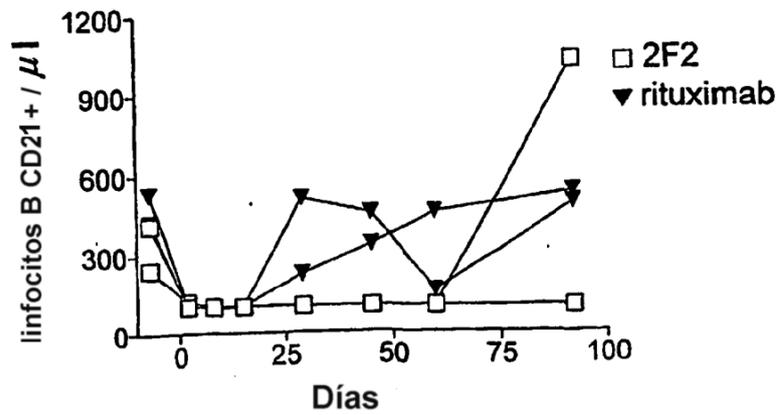


Fig. 45C

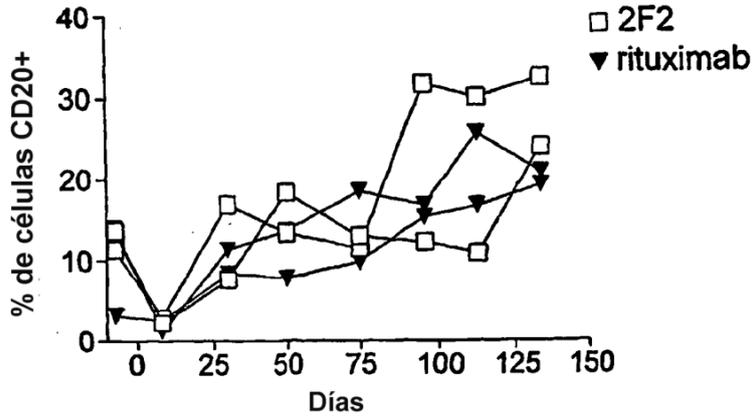


Fig. 46A

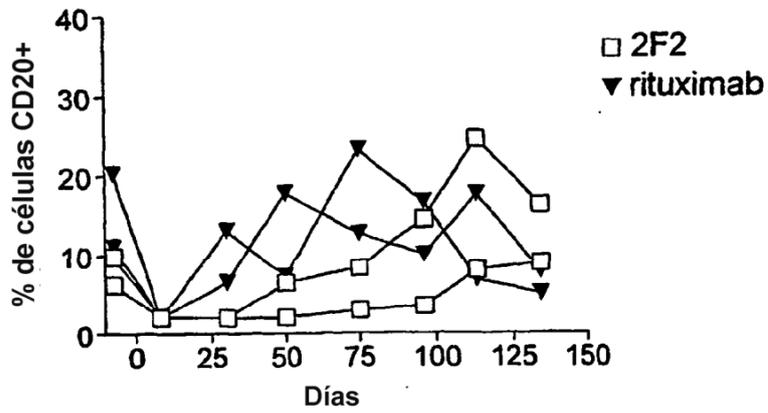


Fig. 46B

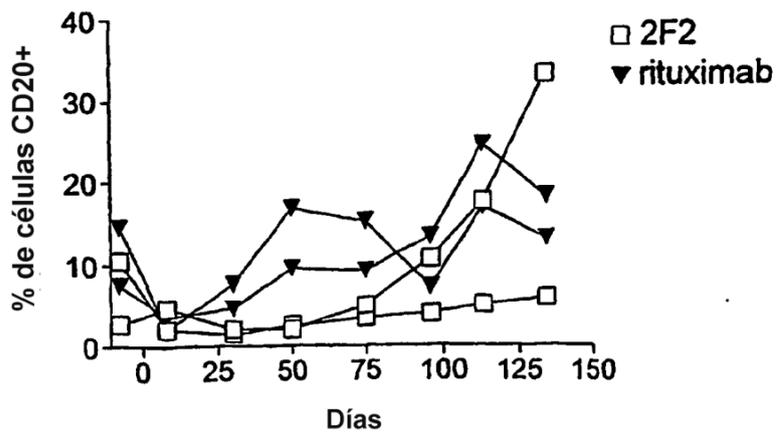


Fig. 46C

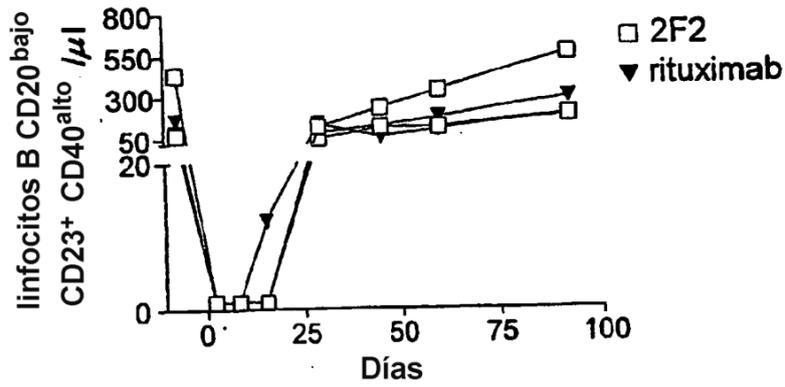


Fig. 47B

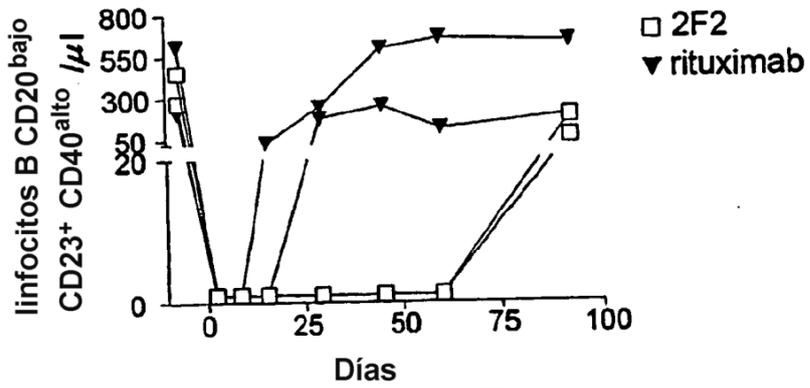


Fig. 47B

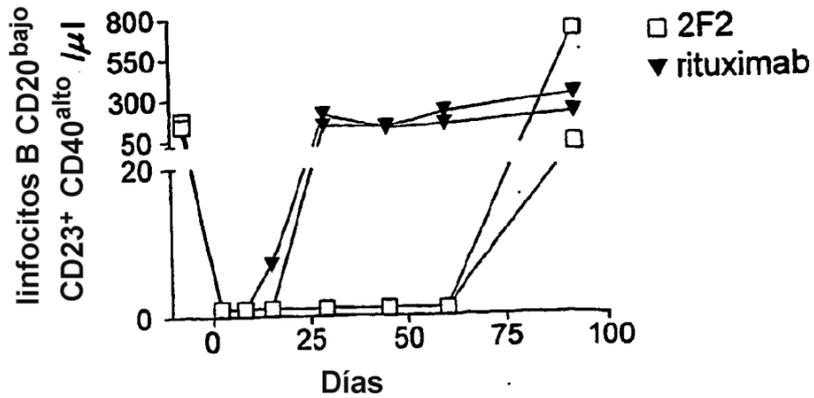


Fig. 47C

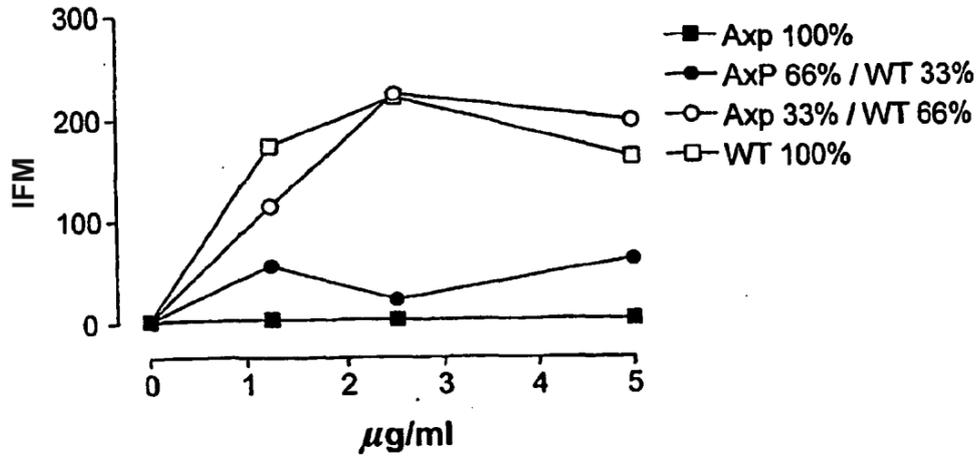


Fig. 48A

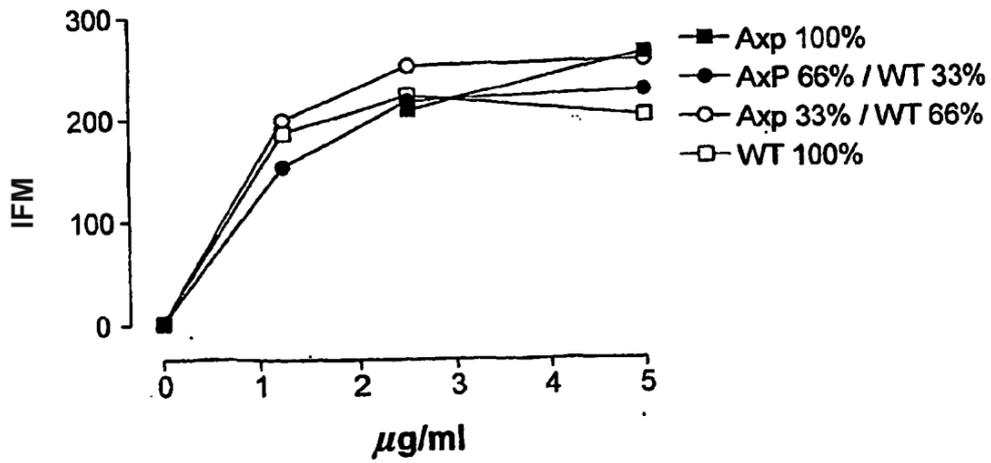


Fig. 48B

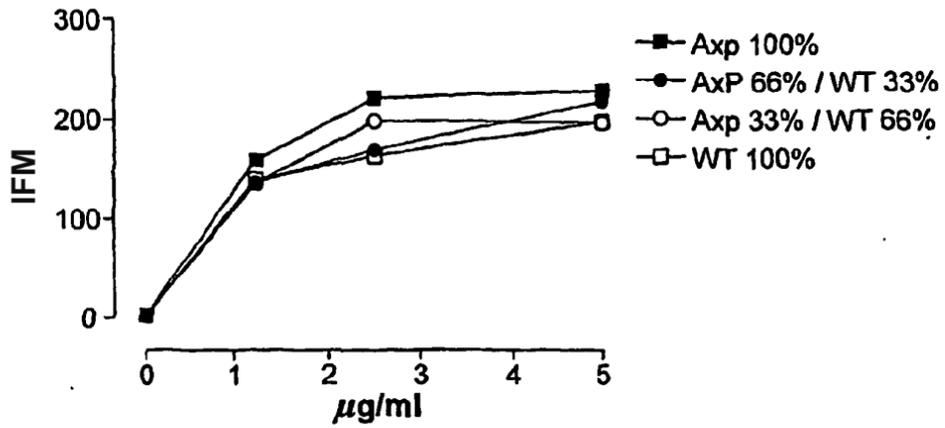


Fig. 48C

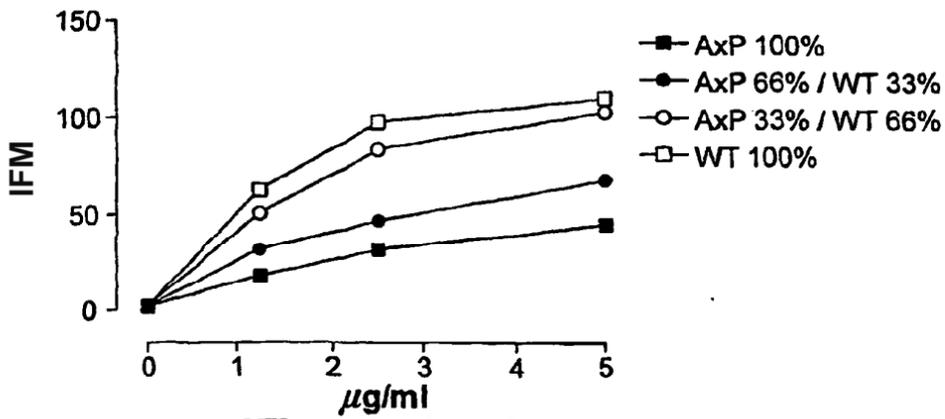


Fig. 48D

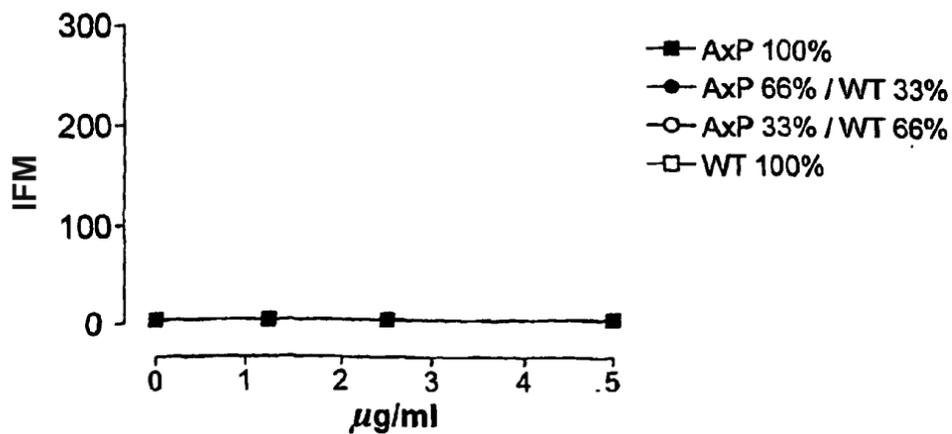


Fig. 48E

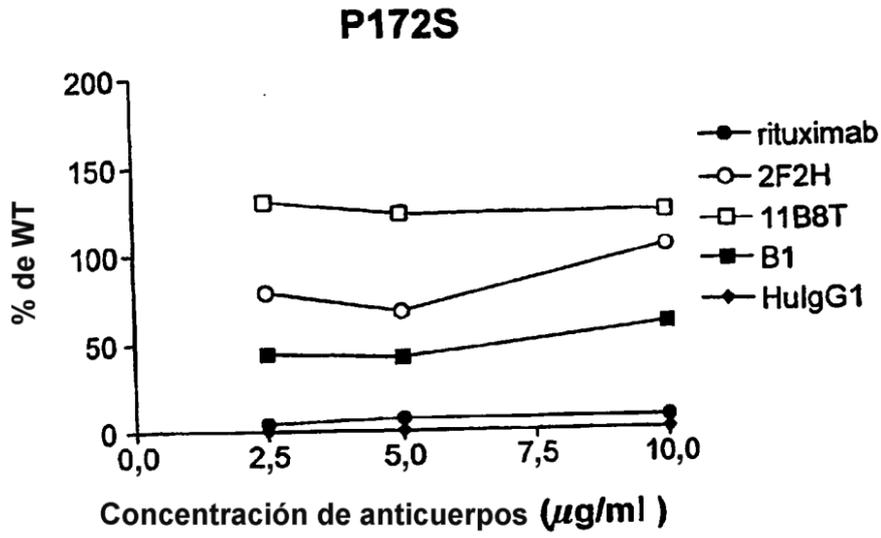


Fig. 49A.

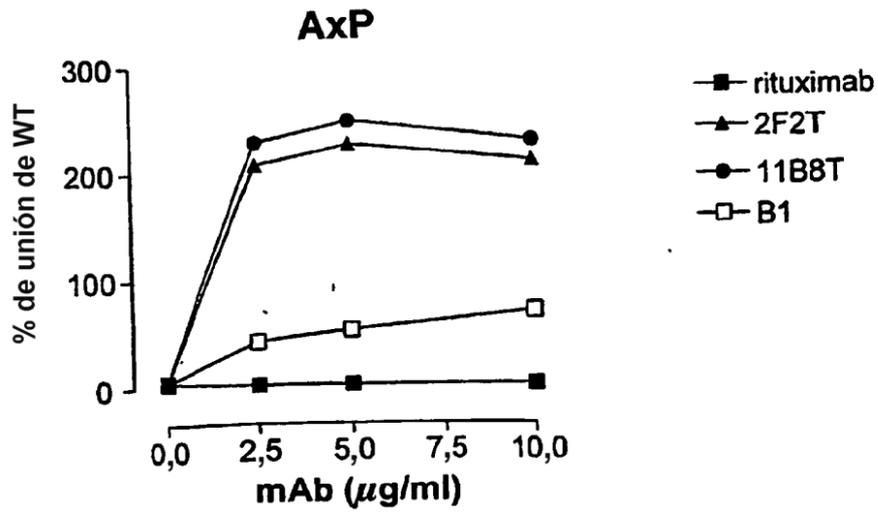


Fig. 49B

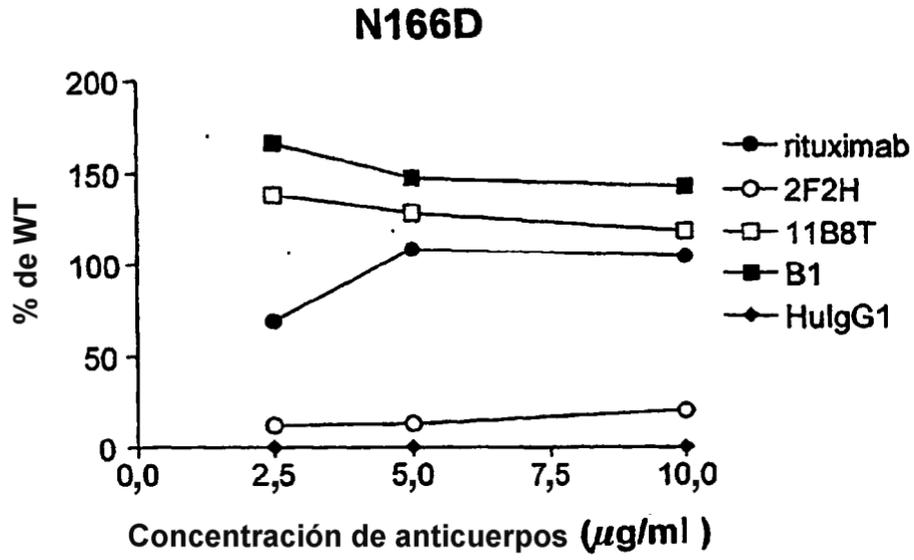


Fig. 49C

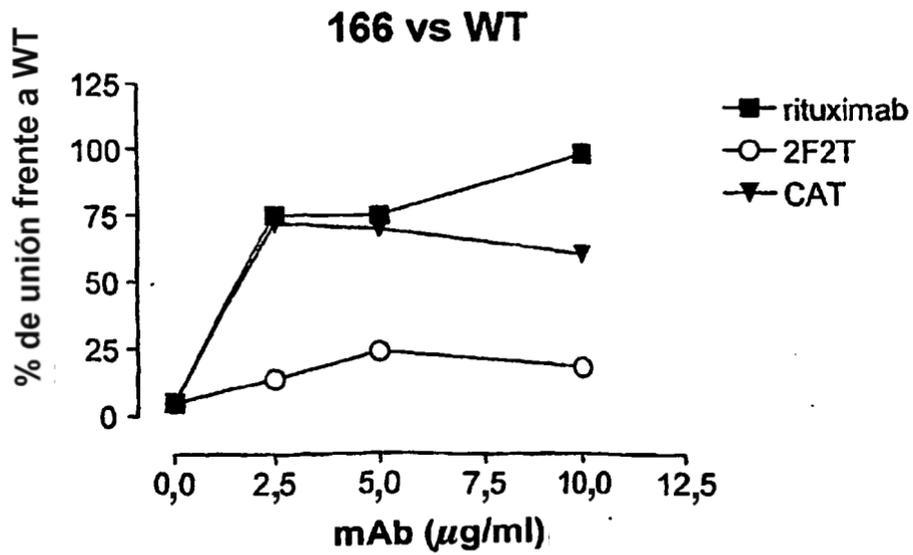


Fig. 49D

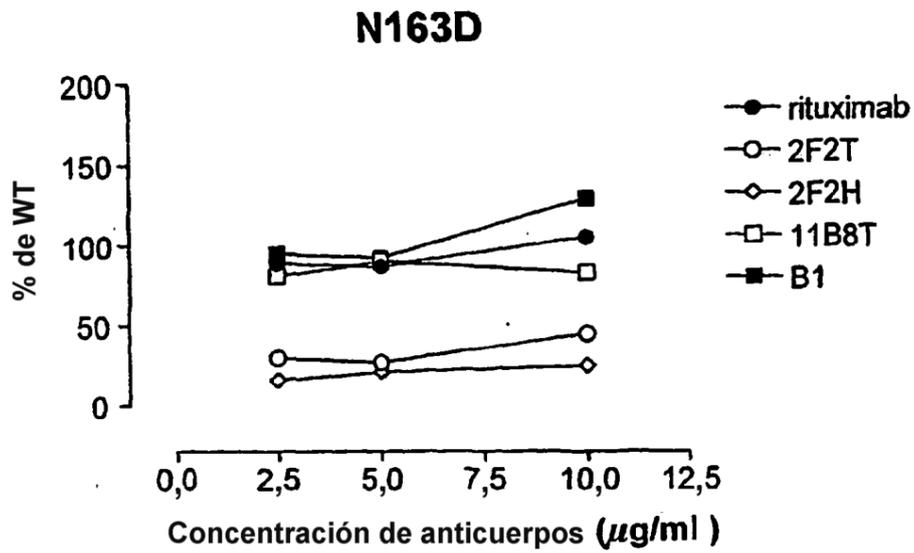


Fig. 49E

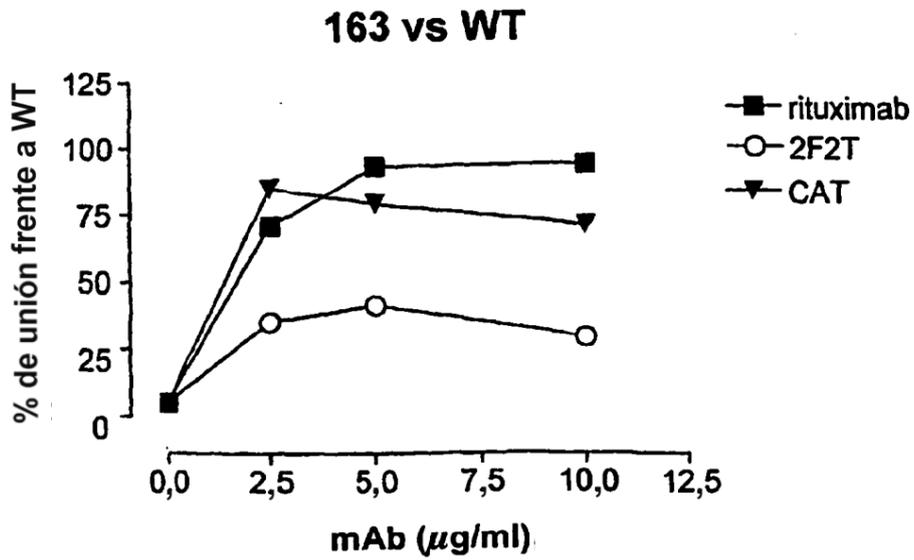


Fig. 49F

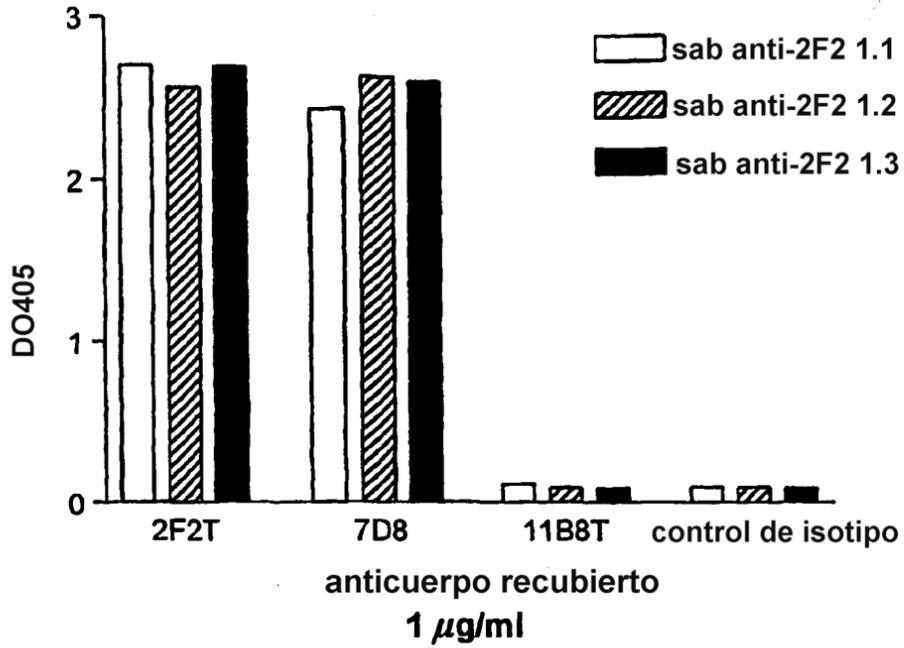


Fig. 50

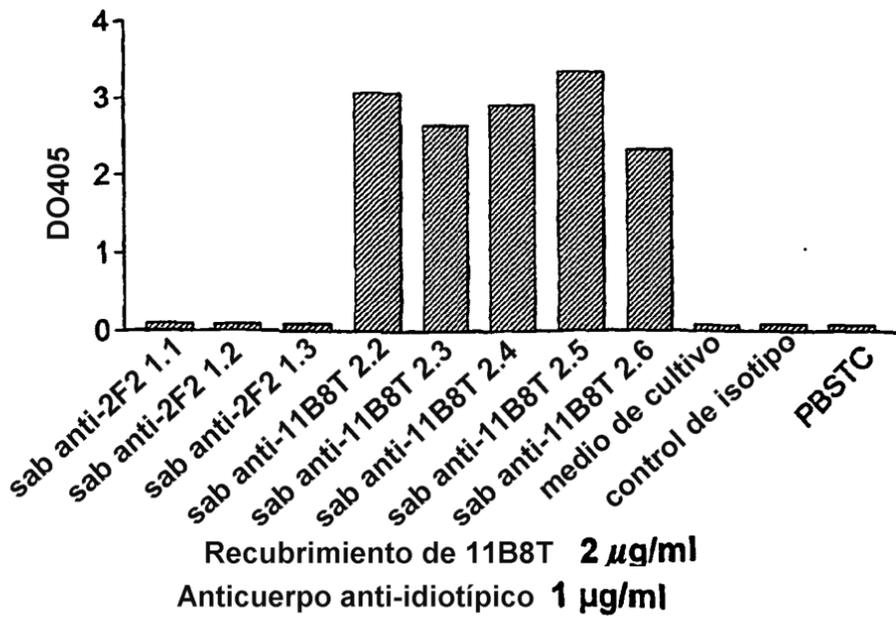


Fig. 51

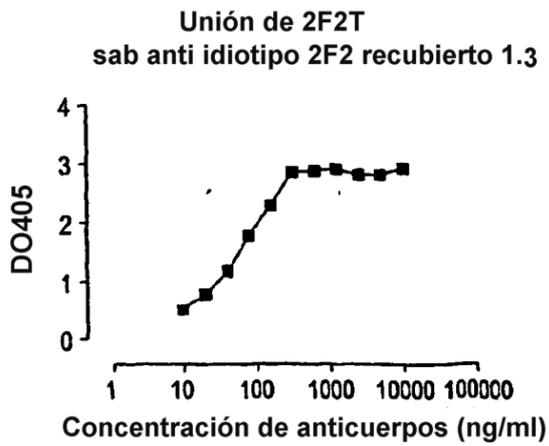
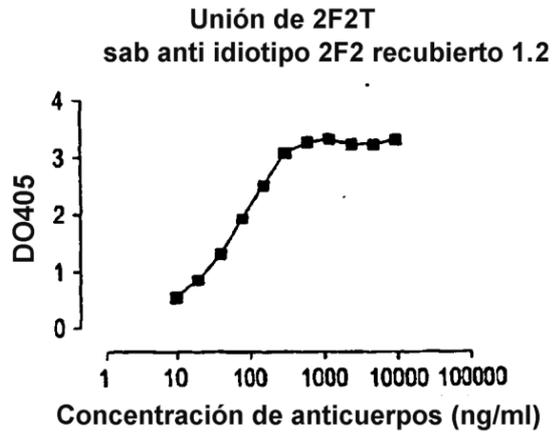
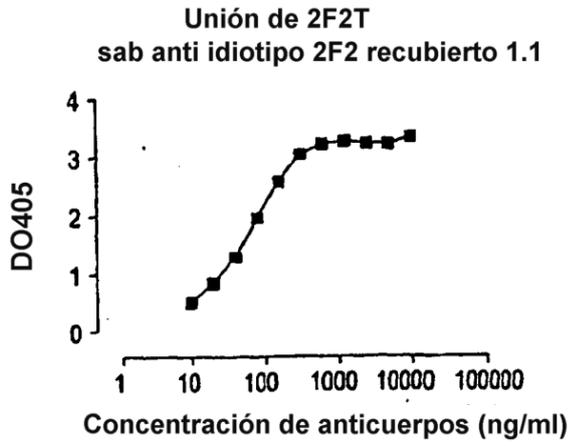


Fig. 52

Traducción de 2F2 VH

1 MFLGLSWIFL LAILKGVQCE VOLVESGGGL VQGRSLRLS CAASGFTFND
 51 YAMHWVRQAP GKGLEWVSTI SWNSGSIGYA DSVKGRFTIS RDNAKKSLYL
 101 QMNSLRAEDT ALYYCAKDTQ YGNYYGMDY WGQGTTVTVS S

Traducción de 2F2VL

1 MEAPAQLLFL LLLWLPDITG EIVLTQSPAT LSLPGERAT LSCRASQSVS
 51 SYEAWYQOKP GOAPRLLIYD ASNRATGIPA RFGSGSGTD FTLTSSLEP
 101 EDFAVYYCQQ RSNWETFGQ GTRLEIK

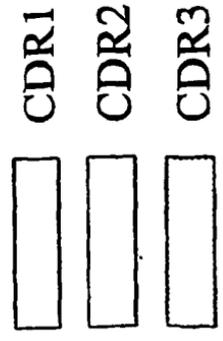


Fig. 53

2F2 VH

```

1  ATGGAG TTGGGA CTGAGC TGGATT TTCCTT TTGGCT ATTTA AAAGGT GTCCAG
55  TCTCAA GTGCAG CTGGTG GAGTCT GGGGGA GGCTTG GTACAG CCTGGC AGGTCC
109 CTGAGA CTCCTC TGTGCA GCCTCT GGATTC ACCTTT AATGAT TATGCC ATGCAC
163 TGGGTC CGGCAA GCTCCA GGAAG GGCCTG GAGTGG GTCTCA ACTATT AGTTGG
217 AATAGT GGTTC ATAGGC TATGGC GACTCT GTGAAG GGCCGA TTCACC ATCTCC
271 AGAGAC AACGCC AAGAAG TCCCTG TATCTG CAAATG AACAGT CTGAGA GCTGAG
325 GACACG GCCTTG TATTAC TGTGCA AAAGAT ATACAG TACGGC AACTAC TACTAC
379 GGTATG GACGTC TGGGGC CAAGGG ACCACG GTCACC GTCCTC TCAG

```

2F2VL

```

1  ATGGAA GCCCCA GCTCAG CTTCTC TTCCTC CTGCTA CTCGG CTCCCA GATACC
55  ACCGGA GAAATT GTGTTG ACACAG TCTCCA GCCACC CTGTCT TTGTCT CCAGGG
109 GAAAGA GCCACC CTCCTC TGCAGG GCCAGT CAGAGT GTAGC AGCTAC TTAGCC
163 TGGTAC CAACAG AAACCT GGCCAG GCTCCC AGGCTC CTCATC TATGAT GCATCC
217 AACAGG GCCACT GGCATC CCAGCC AGGTTT CGTGGC AGTGGG TCTGGG ACAGAC
271 TTCACT CTCACC ATCAGC AGCCTA GAGCCT GAAGAT TTTGCA GTTTAT TACTGT
325 CAGCAG CGTAGC AACTGG CCGATC ACCTTC GGCCAA GGGACA CGACTG GAGATT
379 AAAC

```

Fig. 54

Traducción de 7D8VH

1 MELGLSWIFL LAILKGOCE VOLVESGGGL VOPDRSLRLS CAASGFTFHD
 51 YAMHWVRQAP GKGLEWVSTI SWNSGTIGYA DSVKGRFTIS RDNAKNSLYL
 101 QMNSLRAEDT ALYYCAKDTQVGNYYGMDV WGOGTTVTVS S

Traducción de 7D8VL

1 MEAPAQLLFL LLLWLPTTG EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS
 51 SYLAWYQOKP GOAPRLLIYD ASNRAIGIPA RFSGSGSGTD FTLTSSLEP
 101 EDFAVYYCQQRSNWFITFGQ GTRLEIK

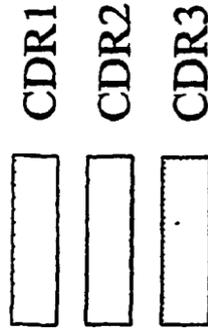


Fig. 55

7D8VH

```

1  ATGGAG TTGGGA CTGAGC TGGATT TTCCTT TTGGCT ATTTA AAAGGT GTCCAG
55  TGTGAA GTGCAG CTGGTG GAGTCT GGGGA GCCTG GTACAG CCTGAC AGGTCC
109 CTGAGA CTCGCC TGTGCA GCCTCT GGATTC ACCTTT CATGAT TATGCC ATGCAC
163 TGGGTC CGGCAA GCTCCA GGAAG GGCCTG GAGTGG GCTCA ACTATT AGTTGG
217 AATAGT GGTACC ATAGGC TATGGC GACTCT GTGAAG GGCCGA TTCACC ATCTCC
271 AGAGAC AACGCC AAGAAC TCCCTG TATCTG CAAATG AACAGT CTGAGA CCTGAG
325 GACACG GCCTTG TATTAC TGTGCA AAAGAT ATACAG TACGGC AACCTAC TACTAC
379 GGTATG GACGTC TGGGGC CAAGGG ACCACG GTCACC GTCTCC TCAG

```

7D8VH

```

1  ATGGAA GCCCCA GCTCAG CTTCTC TTCCTC CTGCTA CTCTGG CTCCCA GATACC
55  ACCGGA GAAATT GTGTTG ACACAG TCTCCA GCCACC CTGTCT TTGTCT CCAGGG
109 GAAAGA GCCACC CTCGCC TGCAGG GCCAGT CAGAGT GTTAGC AGCTAC TTAGCC
163 TGGTAC CAACAG AACCT GGCCAG GTCGCC AGGCTC CTCATC TATGAT GCATCC
217 AACAGG GCCACT GGCATC CCAGCC AGGTTT AGTGGC AGTGGG TCTGGG ACAGAC
271 TTCACT CTCACC ATCAGC AGCCTA GAGCCT GAAGAT TTTGCA GTTTAT TACTGT
325 CAGCAG CGTAGC AACTGG CCGATC ACCTTC GGCCAA GGGACA CGACTG GAGATT
379 AAAC

```

Fig. 56

Traducción de VHCD2011B8

1 MELGLSWVEL VAILKGVQCE VOLVQSGGGL VHPGSLRLS CTGSGFTFSY
 51 HAMHWVRQAP GKGLEWVSLI GTGGVTYYAD SVKGRFTISR DNVKNSLYLQ
 101 MNSLRAEDMA VYICARDYVG AGSFYDGLYG MDYWGQGTIV TVSS

Traducción de VLCD2011B8

1 MEAPAOQLLEL LLLWLPDITG EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS
 51 SYLAWYQOKP GOAPRLIYD ASNRAIGIPA RFSGSGSGTD FTLTSSLEP
 101 EDFAVYYCQQ RSDWPLTFGG GTKVEIK

CDR1
 CDR2
 CDR3

Fig. 57

VHCD2011B8

```

1  ATGGAG TTGGGG CTGAGC TGGGTT TTCCTT GTTGCT ATATTA AAAGGT GTCCAG
55  TGTGAG GTTCAG CTGGTG CAGTCT GGGGGA GGCTTG GTACAT CCTGGG GGTCC
109 CTGAGA CTCTCC TGTACA GGCTCT GGATTC ACCTTC AGTTAC CATGCT ATGCAT
163 TGGGTT CGCCAG GCTCCA GAAAA GGTCTG GAATGG GTATCA ATTATT GGGACT
217 GGTGGT GTCACA TACTAT GCAGAC TCCGIG AAGGGC CGATTC ACCATC TCCAGA
271 GACAAAT GTCAAG AACTCC TTGTAT CTTCAA ATGRAAC AGCCIG AGAGCC GAGGAC
325 ATGGCT GTGTAT TACTGT GCAAGA GATTAC TATGGT GCGGGG AGTTT TATGAC
379 GGCCTC TACGGT ATGGAC GTCTGG GGCCAA GGGACC ACGGTC ACCGTC TCCTCA
433 G

```

VLCD2011B8

```

1  ATGGAA GCCCCA GCACAG CTCTC TTCCTC CTGCTA CTCITGG CTCCCA GATACC
55  ACCGGA GAAATT GTGTG ACACAG TCICCA GCCACC CTGTCT TTGTCT CCAGGG
109 GAAAGA GCCACC CTCCTC TGCAGG GCCAGT CAGAGT GTTAGC AGCTAC TTAGCC
163 TGGTAC CAACAG AAACCT GGCCAG GCTCCC AGGCTC CTCATC TATGAT GCATCC
217 AACAGG GCCACT GGCATC CCAGCC AGGTTG AGTGGG TCTGGG ACAGAC
271 TTCACT CTCACC ATCAGC AGCCTA GAGCCT GAAGAT TTTGCA GTTTAT TACTGT
325 CAGCAG CGTAGC GACTGG CCGCTC ACTTTC GCGGGA GGGACC AAGGTG GAGATC
379 AAAC

```

Fig. 58