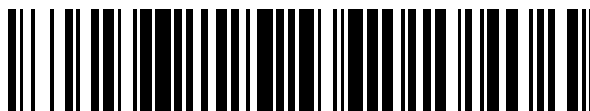


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 791 989**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

A61P 37/06 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.09.2016 PCT/EP2016/073412**

87 Fecha y número de publicación internacional: **06.04.2017 WO17055541**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.09.2016 E 16775243 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.03.2020 EP 3356408**

54 Título: **Anticuerpos humanizados anti-CD19 humano y procedimientos de uso**

30 Prioridad:

01.10.2015 EP 15187820

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

06.11.2020

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**GEORGES, GUY;
MOESSNER, EKKEHARD;
LARIVIERE, LAURENT;
HAAS, ALEXANDER;
KETTENBERGER, HUBERT;
FERRARA KOLLER, CLAUDIA;
SCHLOTHAUER, TILMAN y
MOLHOJ, MICHAEL**

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 791 989 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 humanizados anti-CD19 humano y procedimientos de uso

5 CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a anticuerpos humanizados contra el CD19 humano (anticuerpo anti-CD19 humano), procedimientos para su producción, composiciones farmacéuticas que contienen dichos anticuerpos y usos de los mismos.

10 ANTECEDENTES

El CD19 humano es una proteína transmembranaria de 95 kDa (correceptora de linfocitos B) expresada exclusivamente en linfocitos B y en células dendríticas foliculares. El CD19 se encuentra en asociación con CD21 y CD81. Se requieren CD19 y CD21 para la diferenciación normal de los linfocitos B (Carter, RH y cols., Immunol. Res. 26 [2002] 45-54). Los anticuerpos contra el CD19 se han usado en varios ensayos clínicos (véase, por ejemplo, Hekman, A. y cols., Cancer Immunol. Immunother. 32 (191) 364-372; Vlasfeld, L.T. y cols., Cancer Immunol. Immunother. 40 (1995) 37-47; Conry, R.M. y cols., J. Immunother. Emphasis Tumor Immunol. 18 (1995) 231-241; Manzke, O. y cols., Int. J. Cancer 91 (2001) 516-522).

Los anticuerpos contra el CD19 se mencionan, por ejemplo, en los documentos WO 2004/106381, WO 2005/012493, WO 2006/089133, WO 2007/002223, WO 2006/133450, WO 2006/121852, WO 2003/048209, US 7.109.304, US 2006/0233791, US 2006/0280738, US 2006/0263357, US 2006/0257398, EP 1648512, EP 1629012, US 2008/0138336, WO 2008/022152 y en Bruenke, J. y cols., Br. J. Hematol. 130 (2005) 218-228; Vallera, D.A. y cols., Cancer Biother. Radiopharm. 19 (2004) 11-23; Ghetie, M.A. y cols., Blood 104 (2004) 178-183; Lang, P. y cols., Blood 103 (2004) 3982-3985; Loeffler, A. y cols., Blood 95 (2000) 2098-2103; Le Gall, F. y cols., FEBS Lett. 453 (1999) 164-168; Li, Q. y cols., Cancer Immunol. Immunother. 47 (1998) 121-130; Eberl, G. y cols., Clin. Exp. Immunol. 114 (1998) 173-178; Pietersz, G.A. y cols., Cancer Immunol. Immunother. 41 (1995) 53-60; Myers, D.E. y cols., Leuk. Lymphoma. 18 (1995) 93-102; Bejcek, B.E. y cols., Cancer Res. 55 (1995) 2346-2351; Hagen, I.A. y cols., Blood 85 (1995) 3208-3212; Vlasfeld, L.T. y cols., Cancer Immunol. Immunother. 40 (1995) 37-47; Rhodes, E.G. y cols., Bone Marrow Transplant. 10 (1992) 485-489; Zola, H. y cols., Immunol. Cell Biol. 69 (1991) 411-422; Watanabe, M. y cols., Cancer Res. 50 (1990) 3245-3248; Uckun, F.M. y cols., Blood 71 (1988) 13-29; Pezzutto, A. y cols., J Immunol. 138 (1987) 2793-2799. El anticuerpo monoclonal SJ25-C1 está disponible comercialmente (producto n.º 4737, Sigma-Aldrich Co. USA, SEQ ID NO: 21 a 24). En el documento WO 2008/022152 se mencionan anticuerpos con mayor afinidad por el FcγRIIIA.

Los anticuerpos contra el CD19 pueden tener efectos inhibidores o estimulantes sobre la activación de los linfocitos B. La unión de anticuerpos anti-CD19 a linfocitos B estimulados por mitógenos inhibe la posterior elevación de Ca²⁺ y la activación y proliferación resultante de estos linfocitos, y la proliferación y diferenciación de los linfocitos B se pueden ver inhibidas o potenciadas por el anticuerpo anti-CD19 dependiendo del estímulo mitógeno usado y del grado de reticulación por el anticuerpo.

En el documento WO 2004/106381 se informa de composiciones farmacéuticas que comprenden construcciones biespecíficas de anticuerpos anti-CD3, anti-CD19 para el tratamiento de trastornos relacionados con los linfocitos B. En el documento WO 2005/012493 se informa de anticuerpos anti-CD19. En el documento WO 2006/089133 se informa de anticuerpos anti-CD19 y sus usos en oncología. En el documento WO 2007/002223 se informa de anticuerpos anti-CD19 y sus usos. En el documento WO 2006/133450 se informa del tratamiento con anticuerpos anti-CD19 para el trasplante.

En el documento WO 2011/147834 se informa de anticuerpos contra el CD19 y sus usos.

En el documento US 8.679.492 se divulgan anticuerpos humanizados o fragmentos de los mismos que se unen al CD19 humano. Chelius, D. y cols. (Anal. Chem. 77 [2005] 6004-6011) informan sobre la identificación y caracterización de sitios de desamidación en las regiones conservadas de anticuerpos de gammaglobulina humana.

SUMARIO

La invención se define por las reivindicaciones.

En el presente documento se proporcionan anticuerpos contra el CD19 (humano) que son útiles como agente terapéutico para el tratamiento de una enfermedad autoinmunitaria, artritis reumatoide, lupus, psoriasis o una enfermedad ósea o para el tratamiento de tumores.

La invención se basa, en parte, en el hallazgo de que para eliminar los puntos calientes de desamidación múltiple en un anticuerpo humanizado anti-CD19 humano, es suficiente una sola mutación.

Los anticuerpos de acuerdo con la invención tienen propiedades que causan un beneficio para un paciente que padece una enfermedad asociada con el incremento patológico de linfocitos B.

Un aspecto de acuerdo con la invención es un anticuerpo que se une específicamente al CD19 humano, en el que el anticuerpo comprende

- (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 03,
- (b) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11,
- (c) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 05,
- (d) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20 o 28,
- (e) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 07, y
- (f) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 08.

En un modo de realización, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.

En un modo de realización, el anticuerpo es un anticuerpo humano, humanizado o quimérico.

En un modo de realización, el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo que se une específicamente al CD19 humano.

En un modo de realización, el anticuerpo comprende

- (a) una secuencia de VH que tiene al menos un 95 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 09 y una secuencia de VL que tiene al menos un 95 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 19; o
- (b) una secuencia de VH que tiene al menos un 95 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 09 y una secuencia de VL que tiene al menos un 95 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 27; o
- (c) una secuencia de VH y una secuencia de VL como en (a) o (b).

En un modo de realización, el anticuerpo es un anticuerpo biespecífico que se une específicamente al CD19 humano y a un segundo antígeno diferente.

Un aspecto de acuerdo con la invención es una formulación farmacéutica que comprende el anticuerpo de acuerdo con la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Un aspecto de acuerdo con la invención es el anticuerpo de acuerdo con la invención para su uso como un medicamento.

En un modo de realización, el medicamento es para el tratamiento de un cáncer de linfocitos B, una enfermedad inflamatoria, una enfermedad autoinmunitaria, artritis reumatoide, lupus, psoriasis o una enfermedad ósea. En un modo de realización, el medicamento es para la disminución de linfocitos B.

Un aspecto de acuerdo con la invención es el anticuerpo de acuerdo con la invención para su uso en el tratamiento de un cáncer de linfocitos B, una enfermedad inflamatoria, una enfermedad autoinmunitaria, artritis reumatoide, lupus, psoriasis o una enfermedad ósea.

Un aspecto de acuerdo con la invención es el anticuerpo de acuerdo con la invención para su uso en la disminución de los linfocitos B para el tratamiento de la artritis reumatoide, lupus, psoriasis, LLC, LNH o LDLBG.

En el presente documento se divulga un ácido nucleico aislado que codifica el anticuerpo de acuerdo con la invención.

En el presente documento se divulga una célula huésped que comprende el ácido nucleico como se informa en el presente documento.

En el presente documento se divulga un procedimiento de producción de un anticuerpo que comprende cultivar la célula huésped que comprende el ácido nucleico que codifica el anticuerpo de modo que se produzca el anticuerpo, recuperar el anticuerpo de la célula o del medio de cultivo y purificar el anticuerpo.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE MODOS DE REALIZACIÓN DE LA INVENCION**I. DEFINICIONES**

Una "región estructural humana aceptora" para los propósitos en el presente documento es una región estructural que comprende la secuencia de aminoácidos de una región estructural del dominio variable de la cadena ligera (VL) o una región estructural del dominio variable de la cadena pesada (VH) derivada de una región estructural de inmunoglobulina humana o una región estructural consenso humana, como se define a continuación. Una región estructural humana aceptora "derivada de" una región estructural de inmunoglobulina humana o una región estructural consenso humana puede comprender la misma secuencia de aminoácidos de la misma, o puede contener cambios en la secuencia de aminoácidos. En algunos modos de realización, el número de cambios de aminoácidos es de 10 o menos, 9 o menos, 8 o menos, 7 o menos, 6 o menos, 5 o menos, 4 o menos, 3 o menos o 2 o menos. En algunos modos de realización, la región estructural humana aceptora de VL es idéntica en secuencia a la secuencia de la región estructural de inmunoglobulina humana de VL o la secuencia de la región estructural consenso humana.

"Afinidad" se refiere a la fuerza de la suma total de interacciones no covalentes entre un único sitio de unión de una molécula (por ejemplo, un anticuerpo) y su ligando de unión (por ejemplo, un antígeno). A menos que se indique de otro modo, como se usa en el presente documento, "afinidad de unión" se refiere a la afinidad de unión intrínseca que refleja una interacción 1:1 entre los miembros de un par de unión (por ejemplo, anticuerpo y antígeno). La afinidad de una molécula X por su compañero Y se puede representar, en general, por la constante de disociación (K_d). Se puede medir la afinidad por procedimientos comunes conocidos en la técnica, incluyendo los descritos en el presente documento.

Un anticuerpo con "maduración de la afinidad" se refiere a un anticuerpo con una o más alteraciones en una o más regiones hipervariables (HVR), en comparación con un anticuerpo original que no posee dichas alteraciones, dando como resultado dichas alteraciones una mejora en la afinidad del anticuerpo por el antígeno.

Los términos "anticuerpo anti-CD19 humano" y "un anticuerpo que se une específicamente al CD19 humano" se refieren a un anticuerpo que se puede unir al CD19 humano con una afinidad suficiente, de modo que el anticuerpo sea útil como agente diagnóstico y/o terapéutico al dirigirse al CD19 humano. En un modo de realización, el grado de unión de un anticuerpo anti-CD19 humano a una proteína distinta del CD19 humano no relacionada es de menos de aproximadamente un 10 % de la unión del anticuerpo al CD19 humano como se mide por resonancia de plasmón superficial. En determinados modos de realización, un anticuerpo que se une específicamente al CD19 humano tiene una constante de disociación (K_D) de 10^{-8} M o menos.

El término "anticuerpo" en el presente documento se usa en el sentido más amplio y engloba diversas estructuras de anticuerpos, incluyendo pero sin limitarse a anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos) y fragmentos de anticuerpo siempre que presenten la actividad de unión a antígeno deseada.

El término "citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (CCDA)" es una función mediada por la unión al receptor Fc y se refiere a la lisis de células diana por un anticuerpo como se informa en el presente documento en presencia de células efectoras. La CCDA se mide en un modo de realización mediante el tratamiento de una preparación de células eritroides que expresan CD19 (por ejemplo, células K562 que expresan CD19 humano recombinante) con un anticuerpo como se informa en el presente documento en presencia de células efectoras tales como CMSP (células mononucleares de sangre periférica) recién aisladas o células efectoras purificadas de capas leucoplaquetarias, como monocitos o linfocitos NK (citotóxicos naturales). Las células diana se marcan con ^{51}Cr y posteriormente se incuban con el anticuerpo. Las células marcadas se incuban con células efectoras y se analiza el ^{51}Cr liberado en el sobrenadante. Los controles incluyen la incubación de las células endoteliales diana con células efectoras pero sin el anticuerpo. La capacidad del anticuerpo para inducir las etapas iniciales que median la CCDA se investiga midiendo su unión a células que expresan los receptores Fc γ , tales como células que expresan de forma recombinante Fc γ RI y/o Fc γ RIIA o linfocitos NK (que expresan esencialmente Fc γ RIIA). En un modo de realización preferente, se mide la unión a Fc γ R en linfocitos NK.

Un "fragmento de anticuerpo" se refiere a una molécula distinta de un anticuerpo intacto que comprende una parte de un anticuerpo intacto que se une al antígeno al que se une el anticuerpo intacto. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen, pero no se limitan a, Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab') $_2$; diacuerpos; anticuerpos lineales; moléculas de anticuerpos monocatenarios (por ejemplo, scFv) y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos.

El término anticuerpo "quimérico" se refiere a un anticuerpo en el que una parte de la cadena pesada y/o ligera se deriva de una fuente o especie concreta, mientras que el resto de la cadena pesada y/o ligera se deriva de una fuente o especie diferente.

La "clase" de un anticuerpo se refiere al tipo de dominio constante o región constante que posee su cadena pesada. Existen cinco clases principales de anticuerpos: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y varias de estas se pueden dividir adicionalmente en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ e IgA₂. Los dominios constantes de la cadena pesada que se corresponden con las diferentes clases de inmunoglobulinas se llaman α , δ , ϵ , γ y μ , respectivamente.

El término "agente citotóxico", como se usa en el presente documento, se refiere a una sustancia que inhibe o evita una función celular y/o provoca la muerte o destrucción de las células. Los agentes citotóxicos incluyen, pero no se limitan a, isótopos radioactivos (por ejemplo, ²¹¹At, ¹³¹I, ¹²⁵I, ⁹⁰Y, ¹⁸⁶Re, ¹⁸⁸Re, ¹⁵³Sm, ²¹²Bi, ³²P, ²¹²Pb e isótopos radioactivos de Lu); agentes o fármacos quimioterápicos (por ejemplo, metotrexato, adriamicina, alcaloides de la vinca (vincristina, vinblastina, etopósido), doxorubicina, melfalán, mitomicina C, clorambucilo, daunorubicina u otros agentes intercalantes); agentes inhibidores del crecimiento; enzimas y fragmentos de las mismas, tales como enzimas nucleolíticas; antibióticos; toxinas, tales como toxinas de moléculas pequeñas o toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, incluyendo fragmentos y/o variantes de las mismas; y los diversos agentes antitumorales o antineoplásicos divulgados a continuación.

El término "citotoxicidad dependiente del complemento (CDC)" se refiere a la lisis de células inducida por el anticuerpo como se informa en el presente documento en presencia del complemento. La CDC se mide en un modo de realización mediante el tratamiento de células endoteliales humanas que expresan CD19 con un anticuerpo como se informa en el presente documento en presencia del complemento. En un modo de realización las células están marcadas con calceína. Se encuentra CDC si el anticuerpo induce la lisis del 20 % o más de las células diana a una concentración de 30 µg/ml. La unión al factor del complemento C1q se puede medir en un ELISA. En dicho ensayo, en principio, se recubre una placa de ELISA con intervalos de concentración del anticuerpo, al que se agrega C1q humano purificado o suero humano. La unión de C1q se detecta con un anticuerpo dirigido contra C1q seguido de un conjugado marcado con peroxidasa. La detección de la unión (unión máxima B_{max}) se mide como la densidad óptica a 405 nm (OD405) para el sustrato de peroxidasa ABTS® (2,2'-azino-di-[3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato (6)]).

Las "funciones efectoras" se refieren a las actividades biológicas atribuibles a la región Fc de un anticuerpo, que varían con la clase del anticuerpo. Los ejemplos de funciones efectoras de anticuerpos incluyen: unión a C1q y citotoxicidad dependiente del complemento (CDC); unión al receptor Fc; citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (CCDA); fagocitosis; regulación por disminución de receptores de la superficie celular (por ejemplo, receptor de linfocitos B) y activación de linfocitos B.

Las funciones efectoras dependientes de la unión al receptor Fc pueden estar mediadas por la interacción de la región Fc de un anticuerpo con receptores Fc (FcR), que son receptores especializados de la superficie celular en células hematopoyéticas. Los receptores Fc pertenecen a la superfamilia de las inmunoglobulinas, y se ha demostrado que median tanto la eliminación de patógenos recubiertos de anticuerpos por fagocitosis de complejos inmunitarios, como la lisis de eritrocitos y diversas otras dianas celulares (por ejemplo, células tumorales) recubiertas del anticuerpo correspondiente, por medio de citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpos (CCDA; véase, por ejemplo, Van de Winkel, J.G. y Anderson, C.L., *J. Leukoc. Biol.* 49 (1991) 511-524). Los FcR se definen por su especificidad por los isotipos de inmunoglobulinas: los receptores Fc para anticuerpos IgG se denominan FcγR. La unión al receptor Fc se describe, por ejemplo, en Ravetch, J.V. y Kinet, J.P., *Annu. Rev. Immunol.* 9 (1991) 457-492; Capel, P.J. y cols., *Immunomethods* 4 (1994) 25-34; de Haas, M. y cols., *J. Lab. Clin. Med.* 126 (1995) 330-341; y Gessner, J.E. y cols., *Ann. Hematol.* 76 (1998) 231-248.

La reticulación de los receptores para la región Fc de los anticuerpos IgG (FcγR) desencadena una amplia variedad de funciones efectoras, incluyendo la fagocitosis, la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos y la liberación de mediadores inflamatorios, así como la eliminación de inmunocomplejos y la regulación de la producción de anticuerpos. En seres humanos se han caracterizado tres clases de FcγR, que son:

- FcγRI (CD64) se une a la IgG monomérica con alta afinidad y se expresa en macrófagos, monocitos, neutrófilos y eosinófilos. La modificación de la región Fc de la IgG al menos en uno de los residuos de aminoácido E233-G236, P238, D265, N297, A327 y P329 (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat) reduce la unión al FcγRI. Los residuos de IgG2 en las posiciones 233-236, sustituidos en IgG1 e IgG4, redujeron la unión al FcγRI en 10³ veces y eliminaron la respuesta de monocitos humanos a los glóbulos rojos sensibilizados por anticuerpos (Armour, K.L. y cols., *Eur. J. Immunol* 29 [1999] 2613-2624).

- FcγRII (CD32) se une a la IgG en forma de complejo con una afinidad media a baja y se expresa ampliamente. Este receptor se puede dividir en dos subtipos, FcγRIIA y FcγRIIB. FcγRIIA se encuentra en muchas células involucradas en la destrucción (por ejemplo, macrófagos, monocitos, neutrófilos) y parece capaz de activar el proceso de destrucción. FcγRIIB parece desempeñar un papel en los procesos inhibidores y se encuentra en linfocitos B, macrófagos y en mastocitos y eosinófilos. En los linfocitos B su función parece ser evitar que se sigan produciendo inmunoglobulinas y el cambio de isotipo, por ejemplo, a la clase IgE. En los macrófagos, FcγRIIB actúa inhibiendo la fagocitosis mediada a través de FcγRIIA. En los eosinófilos y los mastocitos, la forma B puede ayudar a reducir la activación de estas células a través de la unión de la IgE a su propio receptor. Se encuentra una unión reducida a FcγRIIA, por ejemplo, para los anticuerpos que comprenden una región Fc de la IgG con mutaciones al

menos en uno de los residuos de aminoácido E233-G236, P238, D265, N297, A327, P329, D270, Q295, A327, R292 y K414 (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat).

- FcγRIII (CD 16) se une a la IgG con afinidad media a baja y existen dos tipos. FcγRIIIA se encuentra en linfocitos NK, macrófagos, eosinófilos y algunos monocitos y linfocitos T y media la CCDA. FcγRIIIB se expresa altamente en neutrófilos. Se encuentra una unión reducida a FcγRIIIA, por ejemplo, para los anticuerpos que comprenden una región Fc de la IgG con mutación al menos en uno de los residuos de aminoácido E233-G236, P238, D265, N297, A327, P329, D270, Q295, A327, S239, E269, E293, Y296, V303, A327, K338 y D376 (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat).

La cartografía de los sitios de unión en la IgG1 humana para los receptores Fc, los sitios de mutación mencionados anteriormente y los procedimientos para medir la unión a FcγRI y FcγRIIA se describen en Shields, R.F. y cols. J. Biol. Chem. 276 (2001) 6591-6604.

Una "cantidad eficaz" de un agente, por ejemplo, una formulación farmacéutica, se refiere a una cantidad eficaz, en las dosificaciones y durante los periodos de tiempo necesarios, para lograr el resultado terapéutico o profiláctico deseado.

El término "receptor Fc", como se usa en el presente documento, se refiere a receptores de activación caracterizados por la presencia de una secuencia citoplásmica IT AM asociada con el receptor (véase, por ejemplo, Ravetch, J.V. y Bolland, S., *Annu. Rev. Immunol.* 19 (2001) 275-290). Dichos receptores son FcγRI, FcγRIIA y FcγRIIIA. El término "sin unión de FcγR" indica que, a una concentración de anticuerpo de 10 µg/ml, la unión de un anticuerpo como se informa en el presente documento a los linfocitos NK es 10 % o menos de la unión hallada para el anticuerpo anti-OX40L LC.001 como se informa en el documento WO 2006/029879.

Mientras que la IgG4 muestra una unión reducida a FcR, los anticuerpos de otras subclases de IgG muestran una unión fuerte. Sin embargo, Pro238, Asp265, Asp270, Asn297 (pérdida de carbohidrato de Fc), Pro329 y 234, 235, 236 y 237, Ile253, Ser254, Lys288, Thr307, Gln311, Asn434 e His435 son residuos que, si se alteran, proporcionan también unión reducida al receptor FcR (Shields, R.L. y cols. J. Biol. Chem. 276 [2001] 6591-6604; Lund, J. y cols., *FASEB J.* 9 [1995] 115-119; Morgan, A. y cols., *Immunology* 86 [1995] 319-324; y EP 0 307 434). En un modo de realización, el anticuerpo como se informa en el presente documento es de la subclase IgG1 o IgG2 y comprende la mutación PVA236, GLPSS331 y/o L234A/L235A. En un modo de realización, el anticuerpo como se informa en el presente documento es de la subclase IgG4 y comprende la mutación L235E. En un modo de realización, el anticuerpo comprende además la mutación S228P.

El término "región Fc" en el presente documento se usa para definir una región C terminal de una cadena pesada de inmunoglobulina que contiene al menos una parte de la región constante. El término incluye regiones Fc de secuencia natural y regiones Fc variantes. En un modo de realización, una región Fc de la cadena pesada de IgG humana se extiende de Cys226, o de Pro230, al extremo carboxilo de la cadena pesada. Sin embargo, la lisina C terminal (Fys447) de la región Fc puede estar presente o no. A menos que se especifique de otro modo en el presente documento, la numeración de los residuos de aminoácido de la región Fc o región constante se realiza de acuerdo con el sistema de numeración EU, también denominado índice EU, como se describe en Kabat, E.A. y cols., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5.^a ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991), NIH Publication 91-3242.

Los anticuerpos como se informa en el presente documento comprenden como región Fc, en un modo de realización, un derivado Fc de origen humano. En un modo de realización, la región Fc comprende todas las partes de la región constante humana. La región Fc de un anticuerpo está directamente involucrada en la activación del complemento, la unión de C1q, la activación de C3 y la unión al receptor Fc. Aunque la influencia de un anticuerpo sobre el sistema del complemento es dependiente de determinadas condiciones, la unión a C1q está provocada por sitios de unión definidos en la región Fc. Dichos sitios de unión son conocidos en el estado de la técnica y se describen, por ejemplo, por Lukas, T.J. y cols., *J. Immunol.* 127 (1981) 2555-2560; Brunhouse, R., y Cebra, J. J., *Mol. Immunol.* 16 (1979) 907-917; Burton, D.R. y cols., *Nature* 288 (1980) 338-344; Thommesen, J.E. y cols., *Mol. Immunol.* 37 (2000) 995-1004; Idusogie, E.E. y cols., *J. Immunol.* 164 (2000) 4178-4184; Hezareh, M. y cols., *J. Virol.* 75 (2001) 12161-12168; Morgan, A. y cols., *Immunology* 86 (1995) 319-324; y EP 0 307 434. Dichos sitios de unión son, por ejemplo, L234, L235, D270, N297, E318, K320, K322, P331 y P329 (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat; a menos que se especifique de otro modo en el presente documento, la numeración de los residuos de aminoácido en la región Fc o región constante se realiza de acuerdo con el sistema de numeración EU, también llamado índice EU, como se describe en Kabat, E.A. y cols., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5.^a ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD [1991], NIH Publication 91-3242). Los anticuerpos de la subclase IgG1, IgG2 e IgG3 normalmente muestran activación del complemento, unión a C1q y activación de C3, mientras que IgG4 no activa el sistema del complemento, no se une a C1q y no activa C3. Una "región Fc de un anticuerpo" es un término bien conocido por el experto en la técnica y se define basándose en la escisión con papaína de los anticuerpos. En un modo de realización, la región Fc es una región Fc humana. En un modo de realización, la región Fc es de la subclase IgG4 humana que comprende las mutaciones S228P y/o L235E (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat). En un modo de realización, la región Fc es de la subclase IgG1

humana que comprende las mutaciones L234A y L235A (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat).

La "región estructural" o "FR" se refiere a los residuos del dominio variable distintos de los residuos de la región hipervariable (HVR). La FR de un dominio variable consiste, en general, en cuatro dominios de FR: FR1, FR2, FR3 y FR4. En consecuencia, las secuencias de HVR y FR aparecen, en general, en la siguiente secuencia en el VH (o VL): FR1-H1(L1)-FR2-H2(L2)-FR3-H3(L3)-FR4.

Los términos "anticuerpo de longitud completa", "anticuerpo intacto" y "anticuerpo completo" se usan en el presente documento de manera intercambiable para referirse a un anticuerpo que tiene una estructura sustancialmente similar a una estructura de anticuerpo natural o que tiene cadenas pesadas que contienen una región Fc como se define en el presente documento.

Los términos "célula huésped", "línea de células huésped" y "cultivo de células huésped" se usan de manera intercambiable y se refieren a células en las que se ha introducido ácido nucleico exógeno, incluyendo la descendencia de dichas células. Las células huésped incluyen "transformantes" y "células transformadas" que incluyen la célula transformada primaria y la descendencia derivada de la misma independientemente del número de pases. La descendencia puede no ser completamente idéntica en contenido de ácido nucleico a una célula original, sino que puede contener mutaciones. La descendencia mutante que tiene la misma función o actividad biológica que la cribada o seleccionada en la célula transformada originalmente se incluye en el presente documento.

Una "región estructural consenso humana" es una región estructural que representa los residuos de aminoácido que se producen con más frecuencia en una selección de secuencias de la región estructural de VL o VH de inmunoglobulina humana. En general, la selección de secuencias de VL o VH de inmunoglobulina humana es de un subgrupo de secuencias de dominio variable. En general, el subgrupo de secuencias es un subgrupo como en Kabat, E.A. y cols., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5.^a ed., Bethesda MD (1991), NIH Publication 91-3242, Vols. 1-3. En un modo de realización, para el VL, el subgrupo es el subgrupo kappa I como en Kabat y cols., *supra*. En un modo de realización, para el VH, el subgrupo es el subgrupo III como en Kabat y cols., *supra*.

Un anticuerpo "humanizado" se refiere a un anticuerpo quimérico que comprende residuos de aminoácido de HVR no humanas y residuos de aminoácido de FR humanas. En determinados modos de realización, un anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos de al menos uno, y típicamente dos, dominios variables, en los que todas o sustancialmente todas las HVR (por ejemplo, las CDR) se corresponden con las de un anticuerpo no humano, y todas o sustancialmente todas las FR se corresponden con las de un anticuerpo humano. Un anticuerpo humanizado puede comprender opcionalmente al menos una parte de una región constante de anticuerpo derivada de un anticuerpo humano. Una "forma humanizada" de un anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo no humano, se refiere a un anticuerpo que se ha sometido a humanización.

El término "región hipervariable" o "HVR", como se usa en el presente documento, se refiere a cada una de las regiones de un dominio variable de anticuerpo que comprenden los tramos de residuos de aminoácido que tienen una secuencia hipervariable ("regiones determinantes de la complementariedad" o "CDR") y/o forman bucles estructuralmente definidos ("bucles hipervariables") y/o contienen los residuos en contacto con el antígeno ("contactos con el antígeno"). En general, los anticuerpos comprenden seis HVR: tres en el VH (H1, H2, H3) y tres en el VL (L1, L2, L3).

Las HVR incluyen

(a) los bucles hipervariables que se producen en los residuos de aminoácido 26-32 (L1), 50-52 (L2), 91-96 (L3), 26-32 (H1), 53-55 (H2) y 96-101 (H3) (Chothia, C. y Lesk, A.M., *J. Mol. Biol.* 196 (1987) 901-917);

(b) las CDR que se producen en los residuos de aminoácido 24-34 (L1), 50-56 (L2), 89-97 (L3), 31-35b (H1), 50-65 (H2) y 95-102 (H3) (Kabat E.A. y cols., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5.^a ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991), NIH Publication 91-3242,);

(c) los contactos con antígeno que se producen en los residuos de aminoácido 27c-36 (L1), 46-55 (L2), 89-96 (L3), 30-35b (H1), 47-58 (H2) y 93-101 (H3) (MacCallum y cols., *J. Mol. Biol.* 262: 732-745 [1996]); y

(d) combinaciones de (a), (b) y/o (c), incluyendo los residuos de aminoácido 46-56 (L2), 47-56 (L2), 48-56 (L2), 49-56 (L2), 26-35 (H1), 26-35b (H1), 49-65 (H2), 93-102 (H3) y 94-102 (H3).

A menos que se indique de otro modo, los residuos de HVR y otros residuos del dominio variable (por ejemplo, los residuos de FR) se numeran en el presente documento de acuerdo con Kabat y cols., *supra*.

Un "inmunoconjugado" es un anticuerpo conjugado con una o más moléculas heterólogas, incluyendo pero sin limitarse a un agente citotóxico.

Un "individuo" o "sujeto" es un mamífero. Los mamíferos incluyen, pero no se limitan a, animales domésticos (por

ejemplo, vacas, ovejas, gatos, perros y caballos), primates (por ejemplo, seres humanos y primates no humanos, tales como monos), conejos y roedores (por ejemplo, ratones y ratas). En determinados modos de realización, el individuo o sujeto es un ser humano.

Un anticuerpo "aislado" es uno que se ha separado de un componente de su entorno natural. En algunos modos de realización, se purifica un anticuerpo a más de un 95 % o 99 % de pureza como se determina, por ejemplo, por electroforesis (por ejemplo, SDS-PAGE, isoelectroenfoque [IEF], electroforesis capilar) o cromatografía (por ejemplo, HPLC de intercambio iónico o de fase inversa). Para una revisión de los procedimientos para evaluar la pureza de los anticuerpos, véase, por ejemplo, Flatman, S. y cols., J. Chromatogr. B 848 (2007) 79-87.

Un ácido nucleico "aislado" se refiere a una molécula de ácido nucleico que se ha separado de un componente de su entorno natural. Un ácido nucleico aislado incluye una molécula de ácido nucleico contenida en células que contienen habitualmente la molécula de ácido nucleico, pero la molécula de ácido nucleico está presente de forma extracromosómica o en una localización cromosómica que es diferente de su localización cromosómica natural.

Un "ácido nucleico aislado que codifica un anticuerpo anti-CD19 humano" se refiere a una o más moléculas de ácido nucleico que codifican las cadenas pesada y ligera del anticuerpo (o fragmentos de las mismas), incluyéndose dicha(s) molécula(s) de ácido nucleico en un único vector o vectores separados, y estando dicha(s) molécula(s) de ácido nucleico presente(s) en una o más localizaciones en una célula huésped.

El término "anticuerpo monoclonal" como se usa en el presente documento se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos y/o se unen al mismo epítipo, excepto por posibles anticuerpos variantes, por ejemplo, que contienen mutaciones naturales o que surgen durante la producción de una preparación de anticuerpos monoclonales, estando presentes, en general, dichas variantes en cantidades menores. A diferencia de las preparaciones de anticuerpos policlonales, que típicamente incluyen anticuerpos diferentes dirigidos contra diferentes determinantes (epítopos), cada anticuerpo monoclonal de una preparación de anticuerpos monoclonales se dirige contra un único determinante en un antígeno. Por tanto, el modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo como que se ha obtenido de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, y no se ha de interpretar como que requiere la producción del anticuerpo por ningún procedimiento concreto. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales que se van a usar de acuerdo con la presente invención se pueden preparar por una variedad de técnicas, incluyendo, pero sin limitarse al procedimiento de hibridoma, procedimientos de ADN recombinante, procedimientos de presentación en fagos y procedimientos que usan animales transgénicos que contienen todos o parte de los locus de inmunoglobulina humana, describiéndose en el presente documento dichos procedimientos y otros procedimientos ejemplares para preparar anticuerpos monoclonales.

Un "anticuerpo no marcado" se refiere a un anticuerpo que no está conjugado a un resto heterólogo (por ejemplo, un resto citotóxico) o radiomarcador. El anticuerpo no marcado puede estar presente en una formulación farmacéutica.

Los "anticuerpos naturales" se refieren a moléculas naturales de inmunoglobulina con estructuras variables. Por ejemplo, los anticuerpos IgG naturales son glucoproteínas heterotetraméricas de aproximadamente 150.000 dalton, compuestas de dos cadenas ligeras idénticas y dos cadenas pesadas idénticas que se unen por puentes disulfuro. Desde el extremo N al extremo C, cada cadena pesada tiene una región variable (VH), también llamada dominio variable pesado o dominio variable de la cadena pesada, seguida de tres dominios constantes (CH1, CH2 y CH3), con lo que entre el primer y el segundo dominio constante está localizada una región bisagra. De forma similar, desde el extremo N al C, cada cadena ligera tiene una región variable (VL), también llamada dominio ligero variable o dominio variable de la cadena ligera, seguida de un dominio ligero constante (CL). La cadena ligera de un anticuerpo se puede asignar a uno de dos tipos, llamados kappa (κ) y lambda (λ), basándose en la secuencia de aminoácidos de su dominio constante.

El término "prospecto del envase" se usa para referirse a las instrucciones incluidas habitualmente en los envases comerciales de productos terapéuticos que contienen información sobre las indicaciones, uso, dosificación, administración, politerapia, contraindicaciones y/o advertencias en relación con el uso de dichos productos terapéuticos.

El "porcentaje (%) de identidad de secuencia de aminoácidos" con respecto a una secuencia de polipéptidos de referencia se define como el porcentaje de residuos de aminoácido de una secuencia candidata que son idénticos a los residuos de aminoácido de la secuencia de polipéptidos de referencia, después de alinear las secuencias e introducir huecos, si fuera necesario, para lograr el máximo porcentaje de identidad de secuencia, y sin tener en consideración ninguna sustitución conservadora como parte de la identidad de secuencia. Se puede lograr la alineación para los propósitos de determinar el porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos de diversos modos que están dentro de la habilidad en la técnica, por ejemplo, usando un programa informático disponible públicamente, tal como el programa informático BLAST, BLAST-2, ALIGN o Megalign (DNASTAR). Los expertos en la técnica pueden determinar los parámetros apropiados para alinear secuencias, incluyendo cualquier algoritmo necesario para lograr la alineación máxima sobre la longitud completa de las secuencias que se están comparando. Sin embargo, para los propósitos en el presente documento, se generan valores de % de identidad de secuencia de

aminoácidos usando el programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2. El programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2 se creó por Genentech, Inc., y el código fuente se ha presentado con la documentación de usuario en la Oficina de Derechos de Autor de EE. UU., Washington D.C., 20559, donde se ha registrado con el n.º de registro de derechos de autor de EE. UU. TXU510087. El programa ALIGN-2 está disponible públicamente de Genentech, Inc., South San Francisco, California, o se puede compilar a partir del código fuente. Se debe compilar el programa ALIGN-2 para su uso en un sistema operativo UNIX, incluyendo UNIX V4.0D digital. Se establecen todos los parámetros de comparación de secuencias por el programa ALIGN-2 y no varían.

En situaciones donde se emplea ALIGN-2 para las comparaciones de secuencias de aminoácidos, el % de identidad de secuencia de aminoácidos de una secuencia de aminoácidos A dada a, con o frente a una secuencia de aminoácidos B dada (que, de forma alternativa, se puede parafrasear como una secuencia de aminoácidos A dada que tiene o comprende un determinado % de identidad de secuencia de aminoácidos a, con o frente a una secuencia de aminoácidos B dada) se calcula como sigue:

100 por la fracción X/Y

donde X es el número de residuos de aminoácido puntuados como emparejamientos idénticos por el programa de alineación de secuencias ALIGN-2 en esa alineación del programa de A y B, y donde Y es el número total de residuos de aminoácido en B. Se apreciará que donde la longitud de la secuencia de aminoácidos A no es igual a la longitud de la secuencia de aminoácidos B, el % de identidad de secuencia de aminoácidos de A con B no igualará el % de identidad de secuencia de aminoácidos de B con A. A menos que se indique específicamente de otro modo, todos los valores de % de identidad de secuencia de aminoácidos usados en el presente documento se obtienen como se describe en el párrafo inmediatamente precedente usando el programa informático ALIGN-2.

El término "formulación farmacéutica" se refiere a una preparación que está en tal forma que permite que la actividad biológica de un ingrediente activo contenido en la misma sea eficaz, y que no contiene ningún componente adicional que sea inaceptablemente tóxico para un sujeto al que se administraría la formulación.

Un "vehículo farmacéuticamente aceptable" se refiere a un ingrediente de una formulación farmacéutica, distinto de un ingrediente activo, que no es tóxico para un sujeto. Un vehículo farmacéuticamente aceptable incluye, pero no se limita a, un tampón, excipiente, estabilizante o conservante.

El término "CD19", como se usa en el presente documento, se refiere al antígeno de linfocitos B humanos CD19 (los nombres alternativos son: antígeno de diferenciación CD19, antígeno de superficie de linfocitos B B4, antígeno de superficie de linfocitos T Leu-12; UniProtKB P15391-1 [isoforma 1; SEQ ID NO: 33] y P15391-2 [isoforma 2; SEQ ID NO: 34]). El término engloba el CD19 humano no procesado de "longitud completa", así como cualquier forma de CD19 humano que resulte del procesamiento en la célula siempre que el anticuerpo como se informa en el presente documento se una a él.

Como se usa en el presente documento, "tratamiento" (y variaciones gramaticales del mismo, tales como "tratar" o "que trata") se refiere a la intervención clínica en un intento de alterar la evolución natural del individuo que se está tratando, y que se puede realizar para la profilaxis o bien durante la evolución de una patología clínica. Los efectos deseables del tratamiento incluyen, pero no se limitan a, prevención de la aparición o recidiva de una enfermedad, alivio de los síntomas, disminución de cualquier consecuencia patológica directa o indirecta de la enfermedad, prevención de metástasis, disminución de la tasa de progresión de la enfermedad, mejora o atenuación del estado de la enfermedad y remisión o mejora del pronóstico. En algunos modos de realización, se usan anticuerpos como se informa en el presente documento para retrasar el desarrollo de una enfermedad o para retardar la progresión de una enfermedad.

El término "región variable" o "dominio variable" se refiere al dominio de una cadena pesada o ligera de anticuerpo que está implicado en la unión del anticuerpo al antígeno. Los dominios variables de la cadena pesada y de la cadena ligera (VH y VL, respectivamente) de un anticuerpo natural tienen, en general, estructuras similares, comprendiendo cada dominio cuatro regiones estructurales (FR) conservadas y tres regiones hipervariables (HVR). (Véase, por ejemplo, Kindt, T.J. y cols., Kuby Immunology, 6.ª ed., W.H. Freeman and Co., N.Y. [2007], página 91).

Un único dominio VH o VL puede ser suficiente para conferir especificidad de unión a antígeno. Además, los anticuerpos que se unen a un antígeno concreto se pueden aislar usando un dominio VH o VL de un anticuerpo que se une al antígeno para cribar una colección de dominios VL o VH complementarios, respectivamente. Véase, por ejemplo, Portolano, S. y cols., J. Immunol. 150 (1993) 880-887; Clackson, T. y cols., Nature 352 (1991) 624-628).

El término "vector", como se usa en el presente documento, se refiere a una molécula de ácido nucleico que puede propagar otro ácido nucleico al que está enlazada. El término incluye el vector como una estructura de ácido nucleico autorreplicante, así como el vector incorporado en el genoma de una célula huésped en la que se ha introducido. Determinados vectores pueden dirigir la expresión de los ácidos nucleicos a los que están enlazados funcionalmente. Dichos vectores se denominan en el presente documento "vectores de expresión".

II. Composiciones y procedimientos

En un aspecto, la invención se basa, en parte, en el hallazgo de que para eliminar múltiples puntos calientes de desamidación en un anticuerpo humanizado anti-CD19 humano, una sola mutación es suficiente. En determinados modos de realización se proporcionan anticuerpos que se unen al CD19 humano. Los anticuerpos de acuerdo con la invención son útiles, por ejemplo, para diagnóstico o tratamiento.

A. Anticuerpos anti-CD19 humano ejemplares

Se ha descubierto que el anticuerpo humanizado anti-CD19 humano natural tiene tres puntos calientes de desamidación en la HVR-L1: **NSNGNT** (SEQ ID NO: 36). Adicionalmente, se ha descubierto que en la HVR-H2 existe otro punto caliente de desamidación: **KFNG** (SEQ ID NO: 37).

En un aspecto de acuerdo con la invención, se proporciona un anticuerpo humanizado aislado que se une específicamente al CD19 humano y que tiene una estabilidad mejorada, especialmente estabilidad frente a la desamidación en las HVR de la cadena pesada y ligera HVR-H2 y HVR-L1, en comparación con otras variantes humanizadas. En este anticuerpo humanizado anti-CD19 humano mejorado, se conserva la reactividad cruzada contra humano/macaco cangrejero del anticuerpo murino original.

Para resolver el punto caliente de desamidación en la HVR-H2, se ha introducido una mutación puntual de N (Asn) a Q (Gln) en la posición 64 (numeración de acuerdo con Kabat). Por tanto, el anticuerpo de acuerdo con la invención tiene una HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos **TEKFQG** (SEQ ID NO: 38). El anticuerpo humanizado anti-CD19 humano de acuerdo con la invención comprende una HVR-H2 que tiene la secuencia de aminoácidos **YINPYNDGSK YTEKFQG** (SEQ ID NO: 11).

Para resolver los puntos calientes de desamidación en la cadena ligera y obtener un anticuerpo humanizado anti-CD19 humano con estabilidad frente a la desamidación mejorada, se introdujeron mutaciones individuales en las posiciones 27d, 27e, 28 y 29 de Kabat y una doble mutación en las posiciones 27e y 28 (numeración de acuerdo con Kabat). En total, se han generado 9 variantes (var.1 a var.9; SEQ ID NO: 60 a 68 y 70) del anticuerpo humanizado natural (var.0; SEQ ID NO: 59 y 69).

Posición de Kabat LC:	2222 7789 de	Posición de Kabat HC:	6 4
var.0:wt	Q S LENSNGNTYL		TEKFNGKATL
var.1:N27dH	Q S LE H SNGNTYL		TEKF Q GRVTM
var.2:N27dQ	Q S LE Q SNGNTYL		TEKF Q GRVTM
var.3:S27eA	Q S LE A NGNTYL		TEKF Q GRVTM
var.4:S27eV	Q S LE V NGNTYL		TEKF Q GRVTM
var.5:S27eP	Q S LE P NGNTYL		TEKF Q GRVTM
var.6:N2 8Q	Q S LENS Q GNTYL		TEKF Q GRVTM
var.7:G2 9A	Q S LENS A NTYL		TEKF Q GRVTM
var.8:G2 9V	Q S LENS V NTYL		TEKF Q GRVTM
var.9:S27eP/N28S	Q S LE NPS GNTYL		TEKF Q GRVTM

variante → parámetro	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
K _D (BIAcore) [nM]	5	250	136	2	1	6	54	4	16	45
t _{1/2} [min]	-	0,1	1,1	105,2	191,5	43,6	4,4	51,5	17,6	4
unión a CD19 humano después de incubación a pH 7,4 [%]	46	0	75	84	85	95	91	72	83	83
unión a CD19 humano después de incubación a pH 6,0 [%]	90	0	95	95	97	99	97	86	91	87
pico principal por SEC después de la incubación [%]	>95	>95	>95	>95	>95	>95	>95	>95	>95	-

Se ha descubierto que con una sola mutación en la posición 27e de acuerdo con Kabat de S (serina) a P (prolina) se

pueden resolver todos los puntos calientes de desamidación de la HVR-L1. Esta es una mutación no del residuo de N (asparagina) propenso a la desamidación, sino de un residuo cercano.

Por tanto, el anticuerpo de acuerdo con la invención tiene una HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos LENPNGNT (SEQ ID NO: 39). El anticuerpo humanizado anti-CD19 humano de acuerdo con la invención comprende una HVR-L1 que tiene la secuencia de aminoácidos RSSQSLENPN GNTYLN (SEQ ID NO: 20).

Adicionalmente, estos anticuerpos mantienen la reactividad cruzada contra el CD19 de macaco cangrejero como se muestra en la tabla siguiente.

CE50 [µg/ml]	var.0	var.5	var.9
DEC huCD19	0,087	0,084	0,089
DEC cyCD19	0,313	0,255	0,435

Por tanto, en un modo de realización, el anticuerpo anti-CD19 humano se une específicamente al CD19 humano y al CD19 del macaco cangrejero.

El anticuerpo humanizado anti-CD19 humano natural (var.0) muestra después de la purificación aprox. un 7,5 % de desamidación. Después de almacenarlo durante dos semanas a pH 7,4, la cantidad de anticuerpo desamidado se incrementa aprox. al 18,5 %. El anticuerpo variante con una mutación S27eP (var.5) muestra aprox. un 2 % de desamidación y un 2 % de formación de succinimida después de la purificación. Durante el almacenamiento a pH 7,4 durante dos semanas solo está presente aprox. el 7,5 % de anticuerpo desamidado.

El anticuerpo humanizado aislado de acuerdo con la invención que se une específicamente al CD19 humano y al CD19 del macaco cangrejero comprende una HVR-H2 de SEQ ID NO: 11 y una HVR-L1 de SEQ ID NO: 20 o 28.

De acuerdo con la invención se proporciona un anticuerpo que comprende (a) HVR-H1, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 03; (b) HVR-H2, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11; (c) HVR-H3, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 05; (d) HVR-L1, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20; (e) HVR-L2, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 07; y (f) HVR-L3, que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 08.

De acuerdo con la invención se proporciona un anticuerpo que comprende (a) HVR-H1, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 03; (b) HVR-H2, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11; (c) HVR-H3, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 05; (d) HVR-L1, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 28; (e) HVR-L2, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 07; y (f) HVR-L3, que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 08.

El anticuerpo anti-CD19 humano de acuerdo con la invención es un anticuerpo humanizado. En un modo de realización, el anticuerpo humanizado anti-CD19 humano comprende HVR como anteriormente, y comprende además una región estructural aceptora humana, por ejemplo, una región estructural de inmunoglobulina humana (línea germinal) o una región estructural consenso humana.

En otro aspecto, el anticuerpo anti-CD19 humano de acuerdo con la invención comprende una secuencia del dominio variable de la cadena pesada (VH) que tiene al menos un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 09. En determinados modos de realización, una secuencia de VH que tiene al menos un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad contiene sustituciones (por ejemplo, sustituciones conservadoras), inserciones o deleciones con respecto a la secuencia de referencia, pero un anticuerpo anti-CD19 humano que comprende esa secuencia conserva la capacidad de unirse al CD19 humano. En determinados modos de realización, se han sustituido, insertado y/o eliminado un total de 1 a 10 aminoácidos en SEQ ID NO: 09. En determinados modos de realización, las sustituciones, inserciones o deleciones se producen en regiones fuera de las HVR (es decir, en las FR). Opcionalmente, el anticuerpo anti-CD19 humano comprende la secuencia de VH de SEQ ID NO: 09, incluyendo modificaciones postraduccionales de esa secuencia. El VH comprende (a) HVR-H1, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 03, (b) HVR-H2, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11, y (c) HVR-H3, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 05.

En otro aspecto, el anticuerpo anti-CD19 humano de acuerdo con la invención comprende un dominio variable de la cadena ligera (VL) que tiene al menos un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 19 o SEQ ID NO: 27 (SEQ ID NO: 19 y SEQ ID NO: 27 difieren en una sola posición de aminoácido). En determinados modos de realización, una secuencia de VL que tiene al menos un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad contiene sustituciones (por ejemplo, sustituciones conservadoras), inserciones o deleciones con respecto a la secuencia de referencia, pero un anticuerpo anti-CD19 humano que comprende esa secuencia conserva la capacidad de unirse al CD19 humano. En determinados modos de realización, se han sustituido, insertado y/o eliminado un total de 1 a 10

aminoácidos en SEQ ID NO: 19 o SEQ ID NO: 27. En determinados modos de realización, las sustituciones, inserciones o deleciones se producen en regiones fuera de las HVR (es decir, en las FR). Opcionalmente, el anticuerpo anti-CD19 humano comprende la secuencia de VL de SEQ ID NO: 19, incluyendo modificaciones postraduccionales de esa secuencia. Opcionalmente, el anticuerpo anti-CD19 humano comprende la secuencia de VL de SEQ ID NO: 27, incluyendo modificaciones postraduccionales de esa secuencia. El VL comprende (a) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20, (b) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 07, y (c) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 08 o (a) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 28, (b) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 07, y (c) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 08.

En otro aspecto, se proporciona un anticuerpo anti-CD19 humano, en el que el anticuerpo comprende una VH como en cualquiera de los modos de realización proporcionados anteriormente, y una VL como en cualquiera de los modos de realización proporcionados anteriormente. En un modo de realización, el anticuerpo comprende las secuencias de VH y VL de SEQ ID NO: 09 y SEQ ID NO: 19 o 27, respectivamente, incluyendo las modificaciones postraduccionales de esas secuencias.

En un modo de realización, un anticuerpo anti-CD19 humano de acuerdo con cualquiera de los modos de realización anteriores es un anticuerpo monoclonal. En un modo de realización, un anticuerpo anti-CD19 humano es un fragmento de anticuerpo, por ejemplo, un fragmento Fv, Fab, Fab', scFv, diacuerpo o F(ab')₂. En otro modo de realización, el anticuerpo es un anticuerpo de longitud completa, por ejemplo, un anticuerpo IgG1 o IgG4 intacto u otra clase o isotipo de anticuerpo como se define en el presente documento.

En un modo de realización de todos los aspectos, el anticuerpo comprende (todas las posiciones de acuerdo con el índice EU de Kabat)

i) una región Fc homodimérica de la subclase IgG1 humana opcionalmente con las mutaciones P329G, F234A y F235A, o

ii) una región Fc homodimérica de la subclase IgG4 humana opcionalmente con las mutaciones P329G, S228P y F235E, o

iii) una región Fc homodimérica de la subclase IgG1 humana con las mutaciones (P329G, F234A, F235A) I253A, H310A y H435A, o con las mutaciones (P329G, F234A, F235A) H310A, H433A e Y436A, o

iv) una región Fc heterodimérica de la cual

a) un polipéptido de la región Fc comprende la mutación T366W, y el otro polipéptido de la región Fc comprende las mutaciones T366S, F368A e Y407V, o

b) un polipéptido de la región Fc comprende las mutaciones T366W e Y349C y el otro polipéptido de la región Fc comprende las mutaciones T366S, F368A, Y407V y S354C, o

c) un polipéptido de la región Fc comprende las mutaciones T366W y S354C, y el otro polipéptido de la región Fc comprende las mutaciones T366S, F368A, Y407V e Y349C,

o

v) una región Fc heterodimérica de la subclase IgG1 humana de la cual ambos polipéptidos de la región Fc comprenden las mutaciones P329G, F234A y F235A y

a) un polipéptido de la región Fc comprende la mutación T366W, y el otro polipéptido de la región Fc comprende las mutaciones T366S, F368A e Y407V, o

b) un polipéptido de la región Fc comprende las mutaciones T366W e Y349C y el otro polipéptido de la región Fc comprende las mutaciones T366S, L368A, Y407V y S354C, o

c) un polipéptido de la región Fc comprende las mutaciones T366W y S354C, y el otro polipéptido de la región Fc comprende las mutaciones T366S, L368A, Y407V e Y349C,

o

vi) una región Fc heterodimérica de la subclase IgG4 humana de la cual ambos polipéptidos de la región Fc comprenden las mutaciones P329G, S228P y L235E y

a) un polipéptido de la región Fc comprende la mutación T366W, y el otro polipéptido de la región Fc comprende las mutaciones T366S, L368A e Y407V, o

b) un polipéptido de la región Fc comprende las mutaciones T366W e Y349C y el otro polipéptido de la región Fc comprende las mutaciones T366S, L368A, Y407V y S354C, o

5 c) un polipéptido de la región Fc comprende las mutaciones T366W y S354C, y el otro polipéptido de la región Fc comprende las mutaciones T366S, L368A, Y407V e Y349C,

o

10 vii) una combinación de uno de iii) con uno de vi), v) y vi).

Un aspecto de acuerdo con la invención es un anticuerpo bivalente biespecífico que comprende

15 a) una primera cadena ligera y una primera cadena pesada de un anticuerpo que se unen específicamente a un primer antígeno, y

b) una segunda cadena ligera y una segunda cadena pesada de un anticuerpo que se unen específicamente a un segundo antígeno, en el que los dominios variables VL y VH de la segunda cadena ligera y la segunda cadena pesada se reemplazan entre sí,

20 en el que el primer antígeno o el segundo antígeno es CD19 humano y en el que el anticuerpo comprende

(a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 03,

25 (b) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11,

(c) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 05,

30 (d) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20 o 28,

(e) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 07, y

(f) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 08.

35 El anticuerpo en a) no contiene una modificación como se informa en b) y la cadena pesada y la cadena ligera en a) son cadenas aisladas.

En el anticuerpo en b)

40 dentro de la cadena ligera

el dominio variable de la cadena ligera VL se reemplaza por el dominio variable de la cadena pesada VH de dicho anticuerpo,

45 y

dentro de la cadena pesada

50 el dominio variable de la cadena pesada VH se reemplaza por el dominio variable de la cadena ligera VL de dicho anticuerpo.

En un modo de realización

55 i) en el dominio constante CL de la primera cadena ligera en a) el aminoácido en la posición 124 (numeración de acuerdo con Kabat) se sustituye por un aminoácido cargado positivamente, y en el que en el dominio constante CH1 de la primera cadena pesada en a) el aminoácido en la posición 147 o el aminoácido en la posición 213 (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat) se sustituyen por un aminoácido cargado negativamente,

o

60 ii) en el dominio constante CL de la segunda cadena ligera en b) el aminoácido en la posición 124 (numeración de acuerdo con Kabat) se sustituye por un aminoácido cargado positivamente, y en el que en el dominio constante CH1 de la segunda cadena pesada en b) el aminoácido en la posición 147 o el aminoácido en la posición 213 (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat) se sustituyen por un aminoácido cargado negativamente.

65 En un modo de realización preferente

i) en el dominio constante CL de la primera cadena ligera en a) el aminoácido en la posición 124 se sustituye independientemente por lisina (K), arginina (R) o histidina (H) (numeración de acuerdo con Kabat) (en un modo de realización preferente independientemente por lisina [K] o arginina [R]), y en el que en el dominio constante CH1 de la primera cadena pesada en a) el aminoácido en la posición 147 o el aminoácido en la posición 213 se sustituyen independientemente por ácido glutámico (E) o ácido aspártico (D) (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat),

o

ii) en el dominio constante CL de la segunda cadena ligera en b) el aminoácido en la posición 124 se sustituye independientemente por lisina (R), arginina (R) o histidina (H) (numeración de acuerdo con Kabat) (en un modo de realización preferente independientemente por lisina [R] o arginina [R]), y en el que en el dominio constante CH1 de la segunda cadena pesada en b) el aminoácido en la posición 147 o el aminoácido en la posición 213 se sustituye independientemente por ácido glutámico (E) o ácido aspártico (D) (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat).

En un modo de realización en el dominio constante CL de la segunda cadena pesada, los aminoácidos en la posición 124 y 123 se sustituyen por R (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat).

En un modo de realización en el dominio constante CH1 de la segunda cadena ligera, los aminoácidos en la posición 147 y 213 se sustituyen por E (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat).

En un modo de realización preferente en el dominio constante CL de la primera cadena ligera, los aminoácidos en la posición 124 y 123 se sustituyen por R y R, respectivamente, y en el dominio constante CH1 de la primera cadena pesada los aminoácidos en la posición 147 y 213 se sustituyen por E (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat).

En un modo de realización en el dominio constante CL de la segunda cadena pesada, los aminoácidos en la posición 124 y 123 se sustituyen por R, y en el que en el dominio constante CH1 de la segunda cadena ligera los aminoácidos en la posición 147 y 213 se sustituyen por E, y en el dominio variable VL de la primera cadena ligera, el aminoácido en la posición 38 se sustituye por K, en el dominio variable VH de la primera cadena pesada, el aminoácido en la posición 39 se sustituye por E, en el dominio variable VL de la segunda cadena pesada, el aminoácido en la posición 38 se sustituye por K, y en el dominio variable VH de la segunda cadena ligera, el aminoácido en la posición 39 se sustituye por E (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat).

Un aspecto de acuerdo con la invención es un anticuerpo bivalente biespecífico que comprende

a) una primera cadena ligera y una primera cadena pesada de un anticuerpo que se unen específicamente a un primer antígeno, y

b) una segunda cadena ligera y una segunda cadena pesada de un anticuerpo que se unen específicamente a un segundo antígeno, en el que los dominios variables VL y VH de la segunda cadena ligera y la segunda cadena pesada se reemplazan entre sí, y en el que los dominios constantes CL y CH1 de la segunda cadena ligera y la segunda cadena pesada se reemplazan entre sí,

en el que el primer antígeno o el segundo antígeno es CD19 humano y en el que el anticuerpo comprende

(a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 03,

(b) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11,

(c) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 05,

(d) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20 o 28,

(e) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 07, y

(f) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 08.

El anticuerpo en a) no contiene una modificación como se informa en b) y la cadena pesada y la cadena ligera en a) son cadenas aisladas.

En el anticuerpo en b)

dentro de la cadena ligera

el dominio variable de la cadena ligera VL se reemplaza por el dominio variable de la cadena pesada VH de dicho anticuerpo, y el dominio constante de la cadena ligera CL se reemplaza por el dominio constante de la cadena pesada CH1 de dicho anticuerpo;

y

dentro de la cadena pesada

el dominio variable de la cadena pesada VH se reemplaza por el dominio variable de la cadena ligera VL de dicho anticuerpo, y el dominio constante de la cadena pesada CH1 se reemplaza por el dominio constante de la cadena ligera CL de dicho anticuerpo.

Un aspecto de acuerdo con la invención es un anticuerpo bivalente biespecífico que comprende

a) una primera cadena ligera y una primera cadena pesada de un anticuerpo que se unen específicamente a un primer antígeno, y

b) una segunda cadena ligera y una segunda cadena pesada de un anticuerpo que se unen específicamente a un segundo antígeno, en el que los dominios constante CL y CH1 de la segunda cadena ligera y la segunda cadena pesada se reemplazan entre sí,

en el que el primer antígeno o el segundo antígeno es CD19 humano y en el que el anticuerpo comprende

(a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 03,

(b) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11,

(c) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 05,

(d) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20 o 28,

(e) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 07, y

(f) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 08.

El anticuerpo en a) no contiene una modificación como se informa en b) y la cadena pesada y la cadena ligera en a) son cadenas aisladas.

En el anticuerpo en b)

dentro de la cadena ligera

el dominio constante de la cadena ligera CL se reemplaza por el dominio constante de la cadena pesada CH1 de dicho anticuerpo;

y dentro de la cadena pesada

el dominio constante de la cadena pesada CH1 se reemplaza por el dominio constante de la cadena ligera CL de dicho anticuerpo.

Un aspecto de acuerdo con la invención es un anticuerpo multiespecífico que comprende

a) un anticuerpo de longitud completa que se une específicamente a un primer antígeno y que consiste en dos cadenas pesadas del anticuerpo y dos cadenas ligeras del anticuerpo, y

b) uno, dos, tres o cuatro fragmentos Fab monocatenarios que se unen específicamente a otros, de uno a cuatro, antígenos (es decir, un segundo y/o tercer y/o cuarto y/o quinto antígeno, preferentemente que se unen específicamente a otro antígeno, es decir, un segundo antígeno),

en el que dichos fragmentos Fab monocatenarios en b) se fusionan con dicho anticuerpo de longitud completa en a) por medio de un conector peptídico en el extremo C o N de la cadena pesada o ligera de dicho anticuerpo de longitud completa,

en el que el primer antígeno o uno de los otros antígenos es CD19 humano y en el que el anticuerpo comprende

- (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 03,
- (b) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11,
- 5 (c) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 05,
- (d) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20 o 28,
- (e) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 07, y
- 10 (f) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 08.

En un modo de realización, uno o dos fragmentos Fab monocatenarios idénticos que se unen a un segundo antígeno se fusionan al anticuerpo de longitud completa por medio de un conector peptídico en el extremo C de las cadenas pesadas o ligeras de dicho anticuerpo de longitud completa.

En un modo de realización, uno o dos fragmentos Fab monocatenarios idénticos que se unen a un segundo antígeno se fusionan al anticuerpo de longitud completa por medio de un conector peptídico en el extremo C de las cadenas pesadas de dicho anticuerpo de longitud completa.

En un modo de realización, uno o dos fragmentos Fab monocatenarios idénticos que se unen a un segundo antígeno se fusionan al anticuerpo de longitud completa por medio de un conector peptídico en el extremo C de las cadenas ligeras de dicho anticuerpo de longitud completa.

En un modo de realización, dos fragmentos Fab monocatenarios idénticos que se unen a un segundo antígeno se fusionan al anticuerpo de longitud completa por medio de un conector peptídico en el extremo C de cada cadena pesada o ligera de dicho anticuerpo de longitud completa.

En un modo de realización, dos fragmentos Fab monocatenarios idénticos que se unen a un segundo antígeno se fusionan al anticuerpo de longitud completa por medio de un conector peptídico en el extremo C de cada cadena pesada de dicho anticuerpo de longitud completa.

En un modo de realización, dos fragmentos Fab monocatenarios idénticos que se unen a un segundo antígeno se fusionan al anticuerpo de longitud completa por medio de un conector peptídico en el extremo C de cada cadena ligera de dicho anticuerpo de longitud completa.

Un aspecto de acuerdo con la invención es un anticuerpo trivalente biespecífico que comprende

a) un anticuerpo de longitud completa que se une específicamente a un primer antígeno y que consiste en dos cadenas pesadas del anticuerpo y dos cadenas ligeras del anticuerpo,

b) un primer polipéptido que consiste en

ba) un dominio variable de la cadena pesada (VH) del anticuerpo,

o

bb) un dominio variable de la cadena pesada (VH) del anticuerpo y un dominio constante 1 (CH1) del anticuerpo,

en el que dicho primer polipéptido se fusiona con el extremo N de su dominio VH por medio de un conector peptídico al extremo C de una de las dos cadenas pesadas de dicho anticuerpo de longitud completa,

c) un segundo polipéptido que consiste en

ca) un dominio variable de la cadena ligera (VL) del anticuerpo,

o

cb) un dominio variable de la cadena ligera (VL) del anticuerpo y un dominio constante de la cadena ligera (CL) del anticuerpo,

en el que dicho segundo polipéptido se fusiona con el extremo N del dominio VL por medio de un conector peptídico al extremo C de la otra de las dos cadenas pesadas de dicho anticuerpo de longitud completa,

y

en el que el dominio variable de la cadena pesada (VH) del anticuerpo del primer polipéptido y el dominio variable de la cadena ligera (VL) del anticuerpo del segundo polipéptido juntos forman un sitio de unión a antígeno que se une específicamente a un segundo antígeno,

5 y

en el que el primer antígeno o el segundo antígeno es CD19 humano y en el que el anticuerpo comprende

10 (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 03,

(b) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11,

(c) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 05,

15 (d) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20 o 28,

(e) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 07, y

20 (f) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 08.

En un modo de realización, el dominio variable de la cadena pesada (VH) del anticuerpo del polipéptido en b) y el dominio variable de la cadena ligera (VL) del anticuerpo del polipéptido en c) están unidos y estabilizados por medio de un puente disulfuro intercatenario mediante la introducción de un enlace disulfuro entre las siguientes posiciones:

25 i) posición 44 del dominio variable de la cadena pesada a posición 100 del dominio variable de la cadena ligera, o

ii) posición 105 del dominio variable de la cadena pesada a posición 43 del dominio variable de la cadena ligera, o

30 iii) posición 101 del dominio variable de la cadena pesada a posición 100 del dominio variable de la cadena ligera (numeración siempre de acuerdo con el índice EU de Kabat).

Las técnicas para introducir puentes disulfuro no naturales para la estabilización se describen, por ejemplo, en el documento WO 94/029350, Rajagopal, V. y cols., Prot. Eng. (1997) 1453-59; Kobayashi, H. y cols., Nuclear Medicine & Biology, Vol. 25, (1998) 387-393; o Schmidt, M. y cols., Oncogene (1999) 18 1711-1721. En un modo de realización, el enlace disulfuro opcional entre los dominios variables de los polipéptidos en b) y c) está entre la posición 44 del dominio variable de la cadena pesada y la posición 100 del dominio variable de la cadena ligera. En un modo de realización, el enlace disulfuro opcional entre los dominios variables de los polipéptidos en b) y c) está entre la posición 105 del dominio variable de la cadena pesada y la posición 43 del dominio variable de la cadena ligera (numeración siempre de acuerdo con Kabat). En un modo de realización, se prefiere un anticuerpo biespecífico trivalente sin dicha estabilización disulfuro opcional entre los dominios variables VH y VL de los fragmentos Fab monocatenarios.

Un aspecto de acuerdo con la invención es un anticuerpo triespecífico o tetraespecífico, que comprende

45 a) una primera cadena ligera y una primera cadena pesada de un anticuerpo de longitud completa que se une específicamente a un primer antígeno, y

50 b) una segunda cadena ligera (modificada) y una segunda cadena pesada (modificada) de un anticuerpo de longitud completa que se une específicamente a un segundo antígeno, en el que los dominios variables VL y VH se reemplazan entre sí, y/o en el que los dominios constantes CL y CH1 se reemplazan entre sí, y

c) en el que uno a cuatro péptidos de unión a antígeno que se unen específicamente a otro u otros dos antígenos (es decir, a un tercer y/o cuarto antígeno) se fusionan por medio de un conector peptídico al extremo C o N de las cadenas ligeras o cadenas pesadas de a) y/o b),

55 en el que el primer antígeno o el segundo antígeno o uno de los otros antígenos es CD19 humano y en el que el anticuerpo comprende

60 (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 03,

(b) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11,

(c) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 05,

65 (d) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20 o 28,

(e) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 07, y

(f) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 08.

5 El anticuerpo en a) no contiene una modificación como se informa en b) y la cadena pesada y la cadena ligera en a) son cadenas aisladas.

En un modo de realización, el anticuerpo trispecífico o tetraespecífico comprende en c) uno o dos péptidos de unión a antígeno que se unen específicamente a otro u otros dos antígenos.

10 En un modo de realización, los péptidos de unión a antígeno se seleccionan del grupo de un fragmento scFv y un fragmento scFab.

En un modo de realización, los péptidos de unión a antígeno son fragmentos scFv.

15 En un modo de realización, los péptidos de unión a antígeno son fragmentos scFab.

En un modo de realización, los péptidos de unión a antígeno se fusionan al extremo C de las cadenas pesadas de a) y/o b).

20 En un modo de realización, el anticuerpo trispecífico o tetraespecífico comprende en c) uno o dos péptidos de unión a antígeno que se unen específicamente a otro antígeno.

25 En un modo de realización, el anticuerpo trispecífico o tetraespecífico comprende en c) dos péptidos de unión a antígeno idénticos que se unen específicamente a un tercer antígeno. En un modo de realización preferente, dichos dos péptidos de unión a antígeno idénticos se fusionan ambos por medio del mismo conector peptídico al extremo C de las cadenas pesadas de a) y b). En un modo de realización preferente, los dos péptidos de unión a antígeno idénticos son un fragmento scFv o un fragmento scFab.

30 En un modo de realización, el anticuerpo trispecífico o tetraespecífico comprende en c) dos péptidos de unión a antígeno que se unen específicamente a un tercer y un cuarto antígeno. En un modo de realización, dichos dos péptidos de unión a antígeno se fusionan por medio del mismo conector peptídico al extremo C de las cadenas pesadas de a) y b). En un modo de realización preferente, dichos dos péptidos de unión a antígeno son un fragmento scFv o un fragmento scFab.

35 Un aspecto de acuerdo con la invención es un anticuerpo tetravalente biespecífico que comprende

a) dos cadenas ligeras y dos cadenas pesadas de un anticuerpo, que se unen específicamente a un primer antígeno (y comprenden dos fragmentos Fab),

40 b) dos fragmentos Fab adicionales de un anticuerpo, que se unen específicamente a un segundo antígeno, en el que dichos fragmentos Fab adicionales se fusionan ambos por medio de un conector peptídico a los extremos C o N de las cadenas pesadas de a),

45 y

en el que en los fragmentos Fab se realizaron las siguientes modificaciones

50 i) en ambos fragmentos Fab de a), o en ambos fragmentos Fab de b), los dominios variables VL y VH se reemplazan entre sí, y/o los dominios constantes CL y CH1 se reemplazan entre sí,

o

55 ii) en ambos fragmentos Fab de a) los dominios variables VL y VH se reemplazan entre sí, y los dominios constantes CL y CH1 se reemplazan entre sí,

y

60 en ambos fragmentos Fab de b) los dominios variables VL y VH se reemplazan entre sí, o los dominios constantes CL y CH1 se reemplazan entre sí,

o

65 iii) en ambos fragmentos Fab de a) los dominios variables VL y VH se reemplazan entre sí, o los dominios constantes CL y CH1 se reemplazan entre sí,

y

en ambos fragmentos Fab de b) los dominios variables VL y VH se reemplazan entre sí, y los dominios constantes CL y CH1 se reemplazan entre sí,

o

iv) en ambos fragmentos Fab de a) los dominios variables VL y VH se reemplazan entre sí, y en ambos fragmentos Fab de b) los dominios constantes CL y CH1 se reemplazan entre sí,

o

v) en ambos fragmentos Fab de a) los dominios constantes CL y CH1 se reemplazan entre sí, y en ambos fragmentos Fab de b) los dominios variables VL y VH se reemplazan entre sí,

en el que el primer antígeno o el segundo antígeno es CD19 humano y en el que el anticuerpo comprende

(a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 03,

(b) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11,

(c) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 05,

(d) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20 o 28,

(e) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 07, y

(f) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 08.

En un modo de realización, dichos fragmentos Fab adicionales se fusionan ambos por medio de un conector peptídico bien a los extremos C de las cadenas pesadas de a), o bien a los extremos N de las cadenas pesadas de a).

En un modo de realización, dichos fragmentos Fab adicionales se fusionan ambos por medio de un conector peptídico a los extremos C de las cadenas pesadas de a).

En un modo de realización, dichos fragmentos Fab adicionales se fusionan ambos por medio de un conector peptídico a los extremos N de las cadenas pesadas de a).

En un modo de realización, en los fragmentos Fab se realizan las siguientes modificaciones:

i) en ambos fragmentos Fab de a), o en ambos fragmentos Fab de b), los dominios variables VL y VH se reemplazan entre sí, y/o

los dominios constantes CL y CH1 se reemplazan entre sí.

En un modo de realización, en los fragmentos Fab se realizan las siguientes modificaciones:

i) en ambos fragmentos Fab de a) los dominios variables VL y VH se reemplazan entre sí,

y/o

los dominios constantes CL y CH1 se reemplazan entre sí.

En un modo de realización, en los fragmentos Fab se realizan las siguientes modificaciones:

i) en ambos fragmentos Fab de a) los dominios constantes CL y CH1 se reemplazan entre sí.

En un modo de realización, en los fragmentos Fab se realizan las siguientes modificaciones:

i) en ambos fragmentos Fab de b) los dominios variables VL y VH se reemplazan entre sí,

y/o

los dominios constantes CL y CH1 se reemplazan entre sí.

En un modo de realización, en los fragmentos Fab se realizan las siguientes modificaciones:

i) en ambos fragmentos Fab de b) los dominios constantes CL y CH1 se reemplazan entre sí.

Un aspecto de acuerdo con la invención es un anticuerpo tetravalente biespecífico que comprende:

a) una cadena pesada (modificada) de un primer anticuerpo, que se une específicamente a un primer antígeno y comprende un primer par de dominios VH-CH1, en el que al extremo C de dicha cadena pesada se fusiona por medio de un conector peptídico el extremo N de un segundo par de dominios VH-CH1 de dicho primer anticuerpo,

b) dos cadenas ligeras de dicho primer anticuerpo de a),

c) una cadena pesada (modificada) de un segundo anticuerpo, que se une específicamente a un segundo antígeno y comprende un primer par de dominios VH- CL, en el que al extremo C de dicha cadena pesada se fusiona por medio de un conector peptídico el extremo N de un segundo par de dominios VH-CL de dicho segundo anticuerpo, y

d) dos cadenas ligeras (modificadas) de dicho segundo anticuerpo de c), cada una de las cuales comprende un par de dominios CL-CH1,

en el que el primer antígeno o el segundo antígeno es CD19 humano y en el que

el anticuerpo comprende

(a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 03,

(b) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11,

(c) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 05,

(d) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20 o 28,

(e) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 07, y

(f) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 08.

Un aspecto de acuerdo con la invención es un anticuerpo biespecífico que comprende

a) la cadena pesada y la cadena ligera de un primer anticuerpo de longitud completa que se une específicamente a un primer antígeno, y

b) la cadena pesada y la cadena ligera de un segundo anticuerpo de longitud completa que se une específicamente a un segundo antígeno, en el que el extremo N de la cadena pesada está conectado al extremo C de la cadena ligera por medio de un conector peptídico,

en el que el primer antígeno o el segundo antígeno es CD19 humano y en el que el anticuerpo comprende

(a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 03,

(b) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11,

(c) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 05,

(d) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20 o 28,

(e) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 07, y

(f) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 08.

El anticuerpo en a) no contiene una modificación como se informa en b) y la cadena pesada y la cadena ligera son cadenas aisladas.

Un aspecto de acuerdo con la invención es un anticuerpo biespecífico que comprende

a) un anticuerpo de longitud completa que se une específicamente a un primer antígeno y que consiste en dos cadenas pesadas del anticuerpo y dos cadenas ligeras del anticuerpo, y

b) un fragmento Fv que se une específicamente a un segundo antígeno que comprende un dominio VH² y un dominio VL², en el que ambos dominios están conectados entre sí por medio de un puente disulfuro,

5 en el que solo el dominio VH² o el dominio VL² se fusiona por medio de un conector peptídico a la cadena pesada o ligera del anticuerpo de longitud completa que se une específicamente a un primer antígeno,

en el que el primer antígeno o el segundo antígeno es CD19 humano y en el que el anticuerpo comprende

10 (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 03,

(b) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11,

15 (c) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 05,

(d) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20 o 28,

(e) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 07, y

20 (f) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 08.

En el biespecífico, las cadenas pesadas y las cadenas ligeras en a) son cadenas aisladas.

25 En un modo de realización, el otro del dominio VH² o el dominio VL² no está fusionado por medio de un conector peptídico a la cadena pesada o ligera del anticuerpo de longitud completa que se une específicamente a un primer antígeno.

30 En todos los aspectos como se informa en el presente documento, la primera cadena ligera comprende un dominio VL y un dominio CL y la primera cadena pesada comprende un dominio VH, un dominio CH1, una región bisagra, un dominio CH2 y un dominio CH3.

Un aspecto de acuerdo con la invención es un anticuerpo trivalente biespecífico que comprende

35 a) dos fragmentos Fab que se unen específicamente a un primer antígeno,

b) un fragmento CrossFab que se une específicamente a un segundo antígeno en el que el dominio CH1 y el CL se intercambian entre sí,

40 c) una región Fc que comprende una primera cadena pesada de la región Fc y una segunda cadena pesada de la región Fc,

en el que el extremo C de los dominios CH1 de los dos fragmentos Fab está conectado al extremo N de los polipéptidos de la región Fc de las cadenas pesadas, y

45 en el que el extremo C del dominio CL del fragmento CrossFab está conectado al extremo N del dominio VH de uno de los fragmentos Fab, y

en el que el primer antígeno o el segundo antígeno es CD19 humano y en el que el anticuerpo comprende

50 (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 03,

(b) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11,

55 (c) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 05,

(d) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20 o 28,

(e) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 07, y

60 (f) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 08.

Un aspecto de acuerdo con la invención es un anticuerpo trivalente biespecífico que comprende

65 a) un primer y un segundo fragmento Fab que cada uno se une específicamente a un primer antígeno,

b) un fragmento CrossFab que se une específicamente a un segundo antígeno en el que el dominio CH1 y el CL se

intercambian entre sí,

c) una región Fc que comprende una primera cadena pesada de la región Fc y una segunda cadena pesada de la región Fc,

en el que el extremo C del dominio CH1 del primer fragmento Fab está conectado al extremo N de uno de los polipéptidos de la región Fc de las cadenas pesadas y el extremo C del dominio CL del fragmento CrossFab está conectado al extremo N del otro polipéptido de la región Fc de las cadenas pesadas, y

en el que el extremo C del dominio CH1 del segundo fragmento Fab está conectado al extremo N del dominio VH del primer fragmento Fab o al extremo N del dominio VH del fragmento CrossFab, y

en el que el primer antígeno o el segundo antígeno es CD19 humano y en el que el anticuerpo comprende

(a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 03,

(b) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11,

(c) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 05,

(d) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20 o 28,

(e) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 07, y

(f) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 08.

Un aspecto de acuerdo con la invención es un anticuerpo trivalente biespecífico que comprende

a) un primer y un segundo fragmento Fab que cada uno se une específicamente a un primer antígeno,

b) un fragmento CrossFab que se une específicamente a un segundo antígeno en el que el dominio VH y el VL se intercambian entre sí,

c) una región Fc que comprende una primera cadena pesada de la región Fc y una segunda cadena pesada de la región Fc,

en el que el extremo C del dominio CH1 del primer fragmento Fab está conectado al extremo N de uno de los polipéptidos de la región Fc de las cadenas pesadas y el extremo C del dominio CH1 del fragmento CrossFab está conectado al extremo N del otro polipéptido de la región Fc de las cadenas pesadas, y

en el que el extremo C del dominio CH1 del segundo fragmento Fab está conectado al extremo N del dominio VH del primer fragmento Fab o al extremo N del dominio VF del fragmento CrossFab, y

en el que el primer antígeno o el segundo antígeno es CD19 humano y en el que el anticuerpo comprende

(a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 03,

(b) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11,

(c) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 05,

(d) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20 o 28,

(e) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 07, y

(f) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 08.

Un aspecto de acuerdo con la invención es un anticuerpo biespecífico que comprende

a) un anticuerpo de longitud completa que se une específicamente a un primer antígeno y que consiste en dos cadenas pesadas del anticuerpo y dos cadenas ligeras del anticuerpo, y

b) un fragmento Fab que se une específicamente a un segundo antígeno que comprende un dominio VH² y un dominio VL² que comprende un fragmento de la cadena pesada y un fragmento de la cadena ligera, en el que

dentro del fragmento de la cadena ligera

el dominio variable de la cadena ligera VL² se reemplaza por el dominio variable de la cadena pesada VH² de dicho anticuerpo,

5 y

dentro del fragmento de la cadena pesada

10 el dominio variable de la cadena pesada VH² se reemplaza por el dominio variable de la cadena ligera VL² de dicho anticuerpo

15 en el que el fragmento Fab de la cadena pesada se inserta entre el dominio CH1 de una de las cadenas pesadas del anticuerpo de longitud completa y la región Fc respectiva del anticuerpo de longitud completa, y el extremo N del fragmento Fab de la cadena ligera se conjuga con el extremo C de la cadena ligera del anticuerpo de longitud completa que se empareja con la cadena pesada del anticuerpo de longitud completa en el que se ha insertado el fragmento Fab de la cadena pesada, y

en el que el primer antígeno o el segundo antígeno es CD19 humano y en el que el anticuerpo comprende

20 (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 03,

(b) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11,

25 (c) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 05,

(d) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20 o 28,

(e) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 07, y

30 (f) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 08.

Un aspecto de acuerdo con la invención es un anticuerpo biespecífico que comprende

35 a) un anticuerpo de longitud completa que se une específicamente a un primer antígeno y que consiste en dos cadenas pesadas del anticuerpo y dos cadenas ligeras del anticuerpo, y

b) un fragmento Fab que se une específicamente a un segundo antígeno que comprende un dominio VH² y un dominio VL² que comprende un fragmento de la cadena pesada y un fragmento de la cadena ligera, en el que

40 dentro del fragmento de la cadena ligera

el dominio variable de la cadena ligera VL² se reemplaza por el dominio variable de la cadena pesada VH² de dicho anticuerpo,

45 y

dentro del fragmento de la cadena pesada

50 el dominio variable de la cadena pesada VH² se reemplaza por el dominio variable de la cadena ligera VL² de dicho anticuerpo

55 en el que el extremo C del fragmento de la cadena pesada del fragmento Fab se conjuga con el extremo N de una de las cadenas pesadas del anticuerpo de longitud completa y el extremo C del fragmento de la cadena ligera del fragmento Fab se conjuga con el extremo N de la cadena ligera del anticuerpo de longitud completa que se empareja con la cadena pesada del anticuerpo de longitud completa con el que se conjuga el fragmento de la cadena pesada del fragmento Fab, y

en el que el primer antígeno o el segundo antígeno es CD19 humano y en el que el anticuerpo comprende

60 (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 03,

(b) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11,

65 (c) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 05,

(d) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20 o 28,

(e) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 07, y

(f) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 08.

En un modo de realización de todos los aspectos, el anticuerpo de acuerdo con la invención es un anticuerpo multiespecífico, que requiere heterodimerización de al menos dos polipéptidos de la cadena pesada, y en el que el anticuerpo se une específicamente al receptor de la transferrina humano y a un segundo antígeno receptor de la transferrina no humano.

Se han descrito varios enfoques para modificaciones de CH3 para soportar la heterodimerización, por ejemplo, en los documentos WO 96/27011, WO 98/050431, EP 1870459, WO 2007/110205, WO 2007/147901, WO 2009/089004, WO 2010/129304, WO 2011/90754, WO 2011/143545, WO 2012/058768, WO 2013/157954, WO 2013/096291. Típicamente, en los enfoques conocidos en la técnica, el dominio CH3 de la primera cadena pesada y el dominio CH3 de la segunda cadena pesada están genomanipulados de manera complementaria de modo que la cadena pesada que comprende un dominio CH3 genomanipulado ya no se pueda homodimerizar con otra cadena pesada de la misma estructura (por ejemplo, una primera cadena pesada con CH3 genomanipulado ya no se puede homodimerizar con otra primera cadena pesada con CH3 genomanipulado; y una segunda cadena pesada con CH3 genomanipulado ya no se puede homodimerizar con otra segunda cadena pesada con CH3 genomanipulado). De este modo, la cadena pesada que comprende un dominio CH3 genomanipulado se ve forzada a heterodimerizarse con otra cadena pesada que comprende el dominio CH3, que está genomanipulado de manera complementaria. Para este modo de realización, el dominio CH3 de la primera cadena pesada y el dominio CH3 de la segunda cadena pesada están genomanipulados de manera complementaria por sustituciones aminoacídicas, de modo que la primera cadena pesada y la segunda cadena pesada se ven forzadas a heterodimerizarse, mientras que la primera cadena pesada y la segunda cadena pesada ya no se pueden homodimerizar (por ejemplo, por razones estéricas).

Los diferentes enfoques para soportar la heterodimerización de las cadenas pesadas conocidos en la técnica, que se citaron e incluyeron anteriormente, se contemplan como diferentes alternativas usadas para proporcionar un anticuerpo multiespecífico de acuerdo con la invención, que comprende una "región Fab no cruzada" derivada de un primer anticuerpo, que se une específicamente a un primer antígeno, y una "región Fab cruzada" derivada de un segundo anticuerpo, que se une específicamente a un segundo antígeno, en combinación con las sustituciones de aminoácidos concretos descritas anteriormente.

Los dominios CH3 del anticuerpo multiespecífico de acuerdo con la invención se pueden alterar mediante la tecnología de "botón en ojal" que se describe en detalle con varios ejemplos, por ejemplo, en el documento WO 96/027011, Ridgway J.B. y cols., Protein Eng. 9 (1996) 617-621; y Merchant, A.M. y cols., Nat. Biotechnol. 16 (1998) 677-681. En este procedimiento, las superficies de interacción de los dos dominios CH3 se alteran para incrementar la heterodimerización de ambas cadenas pesadas que contienen estos dos dominios CH3. Cada uno de los dos dominios CH3 (de las dos cadenas pesadas) puede ser el "botón", mientras que el otro es el "ojal". La introducción de un puente disulfuro estabiliza adicionalmente los heterodímeros (Merchant, A.M y cols., Nature Biotech. 16 [1998] 677-681, Atwell, S. y cols. J. Mol. Biol. 270 [1997] 26-35) e incrementa el rendimiento.

En un modo de realización preferente, el anticuerpo multiespecífico de acuerdo con la invención comprende una mutación T366W en el dominio CH3 de la "cadena de botones" y mutaciones T366S, L368A, Y407V en el dominio CH3 de la "cadena de ojal" (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat). También se puede usar un puente disulfuro intercatenario adicional entre los dominios CH3 (Merchant, A.M. y cols., Nature Biotech. 16 [1998] 677-681), por ejemplo, introduciendo una mutación Y349C en el dominio CH3 de la "cadena de botones" y una mutación E356C o una mutación S354C en el dominio CH3 de la "cadena de ojal". Por tanto, en otro modo de realización preferente, el anticuerpo multiespecífico de acuerdo con la invención comprende las mutaciones Y349C y T366W en uno de los dos dominios CH3 y las mutaciones E356C, T366S, L368A e Y407V en el otro de los dos dominios CH3 o el anticuerpo multiespecífico de acuerdo con la invención comprende las mutaciones Y349C y T366W en uno de los dos dominios CH3 y las mutaciones S354C, T366S, L368A e Y407V en el otro de los dos dominios CH3 (la mutación adicional Y349C en un dominio CH3 y la mutación adicional E356C o S354C en el otro dominio CH3 formando un puente disulfuro intercatenario; numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat).

Pero también se pueden usar de forma alternativa o adicionalmente otras tecnologías de botón en ojal, como se describe por el documento EP 1 870 459A1. En un modo de realización, el anticuerpo multiespecífico de acuerdo con la invención comprende las mutaciones R409D y K370E en el dominio CH3 de la "cadena de botones" y las mutaciones D399K y E357K en el dominio CH3 de la "cadena de ojal" (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat).

En un modo de realización, el anticuerpo multiespecífico de acuerdo con la invención comprende una mutación T366W en el dominio CH3 de la "cadena de botones" y las mutaciones T366S, L368A e Y407V en el dominio CH3 de la "cadena de ojal" y adicionalmente las mutaciones R409D y K370E en el dominio CH3 de la "cadena de botones" y las mutaciones D399K y E357K en el dominio CH3 de la "cadena de ojal" (numeración de acuerdo con el

índice EU de Kabat).

En un modo de realización, el anticuerpo multiespecífico de acuerdo con la invención comprende las mutaciones Y349C y T366W en uno de los dos dominios CH3 y las mutaciones S354C, T366S, L368A e Y407V en el otro de los dos dominios CH3, o el anticuerpo multiespecífico de acuerdo con la invención comprende las mutaciones Y349C y T366W en uno de los dos dominios CH3 y las mutaciones S354C, T366S, L368A e Y407V en el otro de los dos dominios CH3 y, adicionalmente, las mutaciones R409D y K370E en el dominio CH3 de la "cadena de botones" y las mutaciones D399K y E357K en el dominio CH3 de la "cadena de ojal" (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat).

Además de la "tecnología de botón en ojal", se conocen en la técnica otras técnicas para modificar los dominios CH3 de las cadenas pesadas de un anticuerpo multiespecífico para forzar la heterodimerización. Estas tecnologías, en especial las descritas en los documentos WO 96/27011, WO 98/050431, EP 1870459, WO 2007/110205, WO 2007/147901, WO 2009/089004, WO 2010/129304, WO 2011/90754, WO 2011/143545, WO 2012/058768, WO 2013/157954 y WO 2013/096291, se contemplan en el presente documento como alternativas a la "tecnología de botón en ojal" en combinación con un anticuerpo multiespecífico de acuerdo con la invención.

En un modo de realización de un anticuerpo multiespecífico de acuerdo con la invención se usa el enfoque descrito en el documento EP 1870459 para soportar la heterodimerización de la primera cadena pesada y la segunda cadena pesada del anticuerpo multiespecífico. Este enfoque se basa en la introducción de aminoácidos cargados con cargas opuestas en posiciones aminoacídicas específicas en la interfase entre los dominios CH3/CH3 entre la primera y la segunda cadena pesada.

En consecuencia, el presente modo de realización se refiere a un anticuerpo multiespecífico de acuerdo con la invención, en el que en la estructura terciaria del anticuerpo, el dominio CH3 de la primera cadena pesada y el dominio CH3 de la segunda cadena pesada forman una interfase que está localizada entre los respectivos dominios CH3 del anticuerpo, en el que las respectivas secuencias de aminoácidos del dominio CH3 de la primera cadena pesada y el dominio CH3 de la segunda cadena pesada comprenden cada una un conjunto de aminoácidos que está localizado dentro de dicha interfase en la estructura terciaria del anticuerpo, en el que del conjunto de aminoácidos que está localizado en la interfase del dominio CH3 de una cadena pesada, un primer aminoácido se sustituye por un aminoácido cargado positivamente y del conjunto de aminoácidos que está localizado en la interfase del dominio CH3 de la otra cadena pesada, un segundo aminoácido se sustituye por un aminoácido cargado negativamente. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con el presente modo de realización también se denomina en el presente documento "anticuerpo multiespecífico con CH3 genomanipulado (+/-)" (en el que la abreviatura representa los aminoácidos con carga opuesta que se introdujeron en los respectivos dominios CH3).

En un modo de realización de dicho anticuerpo multiespecífico con CH3 genomanipulado (+/-) de acuerdo con la invención, el aminoácido cargado positivamente se selecciona de K, R y H, y el aminoácido cargado negativamente se selecciona de E o D.

En un modo de realización de dicho anticuerpo multiespecífico con CH3 genomanipulado (+/-) de acuerdo con la invención, el aminoácido cargado positivamente se selecciona de K y R, y el aminoácido cargado negativamente se selecciona de E o D.

En un modo de realización de dicho anticuerpo multiespecífico con CH3 genomanipulado (+/-) de acuerdo con la invención, el aminoácido cargado positivamente es K, y el aminoácido cargado negativamente es E.

En un modo de realización de dicho anticuerpo multiespecífico con CH3 genomanipulado (+/-) de acuerdo con la invención, en el dominio CH3 de una cadena pesada, el aminoácido R en la posición 409 se sustituye por D y el aminoácido K en la posición se sustituye por E, y en el dominio CH3 de la otra cadena pesada, el aminoácido D en la posición 399 se sustituye por K y el aminoácido E en la posición 357 se sustituye por K (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat).

En un modo de realización de un anticuerpo multiespecífico de acuerdo con la invención, el enfoque descrito en el documento WO 2013/157953 se usa para soportar la heterodimerización de la primera cadena pesada y la segunda cadena pesada del anticuerpo multiespecífico. En un modo de realización de dicho anticuerpo multiespecífico de acuerdo con la invención, en el dominio CH3 de una cadena pesada el aminoácido T en la posición 366 se sustituye por K, y en el dominio CH3 de la otra cadena pesada el aminoácido L en la posición 351 se sustituye por D (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat). En otro modo de realización de dicho anticuerpo multiespecífico de acuerdo con la invención, en el dominio CH3 de una cadena pesada, el aminoácido T en la posición 366 se sustituye por R y el aminoácido L en la posición 351 se sustituye por R, y en el dominio CH3 de la otra cadena pesada, el aminoácido L en la posición 351 se sustituye por D (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat).

En otro modo de realización de dicho anticuerpo multiespecífico de acuerdo con la invención, en el dominio CH3 de una cadena pesada, el aminoácido T en la posición 366 se sustituye por R y el aminoácido L en la posición 351 se sustituye por R, y en el dominio CH3 de la otra cadena pesada, el aminoácido L en la posición 351 se sustituye por

D (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat). Adicionalmente, al menos una de las siguientes sustituciones está comprendida en el dominio CH3 de la otra cadena pesada: el aminoácido Y en la posición 349 se sustituye por E, el aminoácido Y en la posición 349 se sustituye por D y el aminoácido L en la posición 368 se sustituye por E (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat). En un modo de realización, el aminoácido L en la posición 368 se sustituye por E (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat).

En un modo de realización de un anticuerpo multiespecífico de acuerdo con la invención, el enfoque descrito en el documento WO 2012/058768 se usa para soportar la heterodimerización de la primera cadena pesada y la segunda cadena pesada del anticuerpo multiespecífico. En un modo de realización de dicho anticuerpo multiespecífico de acuerdo con la invención, en el dominio CH3 de una cadena pesada, el aminoácido L en la posición 351 se sustituye por Y y el aminoácido Y en la posición 407 se sustituye por A, y en el dominio CH3 de la otra cadena pesada, el aminoácido T en la posición 366 se sustituye por A y el aminoácido K en la posición 409 se sustituye por F (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat). En otro modo de realización, además de las sustituciones mencionadas anteriormente, en el dominio CH3 de la otra cadena pesada se sustituye al menos uno de los aminoácidos en las posiciones 411 (originalmente T), 399 (originalmente D), 400 (originalmente S), 405 (originalmente F), 390 (originalmente N) y 392 (originalmente K; numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat). Las sustituciones preferentes son:

- sustitución del aminoácido T en la posición 411 por un aminoácido seleccionado de N, R, Q, K, D, E y W (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat),

- sustitución del aminoácido D en la posición 399 por un aminoácido seleccionado de R, W, Y y K (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat),

- sustitución del aminoácido S en la posición 400 por un aminoácido seleccionado de E, D, R y K (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat),

- sustitución del aminoácido F en la posición 405 por un aminoácido seleccionado de I, M, T, S, V y W (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat),

- sustitución del aminoácido N en la posición 390 por un aminoácido seleccionado de R, K y D (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat), y

- sustitución del aminoácido K en la posición 392 por un aminoácido seleccionado de V, M, R, L, F y E (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat).

En otro modo de realización de dicho anticuerpo multiespecífico de acuerdo con la invención (genomanipulado de acuerdo con el documento WO 2012/058768), en el dominio CH3 de una cadena pesada, el aminoácido L en la posición 351 se sustituye por Y y el aminoácido Y en la posición 407 se sustituye por A, y en el dominio CH3 de la otra cadena pesada, el aminoácido T en la posición 366 se sustituye por V y el aminoácido K en la posición 409 se sustituye por F (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat). En otro modo de realización de dicho anticuerpo multiespecífico de acuerdo con la invención, en el dominio CH3 de una cadena pesada, el aminoácido Y en la posición 407 se sustituye por A, y en el dominio CH3 de la otra cadena pesada, el aminoácido T en la posición 366 se sustituye por A y el aminoácido K en la posición 409 se sustituye por F (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat). En dicho último modo de realización mencionado anteriormente, en el dominio CH3 de dicha otra cadena pesada, el aminoácido K en la posición 392 se sustituye por E, el aminoácido T en la posición 411 se sustituye por E, el aminoácido D en la posición 399 se sustituye por R y el aminoácido S en la posición 400 se sustituye por R (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat).

En un modo de realización de un anticuerpo multiespecífico de acuerdo con la invención, el enfoque descrito en el documento WO 2011/143545 se usa para soportar la heterodimerización de la primera cadena pesada y la segunda cadena pesada del anticuerpo multiespecífico. En un modo de realización de dicho anticuerpo multiespecífico de acuerdo con la invención se introducen modificaciones de aminoácidos en los dominios CH3 de ambas cadenas pesadas en las posiciones 368 y/o 409 (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat).

En un modo de realización de un anticuerpo multiespecífico de acuerdo con la invención, el enfoque descrito en el documento WO 2011/090762 se usa para soportar la heterodimerización de la primera cadena pesada y la segunda cadena pesada del anticuerpo multiespecífico. El documento WO 2011/090762 se refiere a modificaciones de aminoácidos de acuerdo con la tecnología de "botón en ojal". En un modo de realización de dicho anticuerpo multiespecífico con CH3(KiH) genomanipulado de acuerdo con la invención, en el dominio CH3 de una cadena pesada el aminoácido T en la posición 366 se sustituye por W, y en el dominio CH3 de la otra cadena pesada el aminoácido Y en la posición 407 se sustituye por A (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat). En otro modo de realización de dicho anticuerpo multiespecífico con CH3(KiH) genomanipulado de acuerdo con la invención, en el dominio CH3 de una cadena pesada, el aminoácido T en la posición 366 se sustituye por Y, y en el dominio CH3 de la otra cadena pesada, el aminoácido Y en la posición 407 se sustituye por T (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat).

En un modo de realización de un anticuerpo multiespecífico de acuerdo con la invención, que es del isotipo IgG2, se usa el enfoque descrito en el documento WO 2011/090762 para soportar la heterodimerización de la primera cadena pesada y la segunda cadena pesada del anticuerpo multiespecífico.

En un modo de realización de un anticuerpo multiespecífico de acuerdo con la invención se usa el enfoque descrito en el documento WO 2009/089004 para soportar la heterodimerización de la primera cadena pesada y la segunda cadena pesada del anticuerpo multiespecífico. En un modo de realización de dicho anticuerpo multiespecífico de acuerdo con la invención, en el dominio CH3 de una cadena pesada, el aminoácido K o N en la posición 392 se sustituye por un aminoácido cargado negativamente (en un modo de realización preferente por E o D, en un modo de realización preferente por D), y en el dominio CH3 de la otra cadena pesada, el aminoácido D en la posición 399, el aminoácido E o D en la posición 356 o el aminoácido E en la posición 357 se sustituye por un aminoácido cargado positivamente (en un modo de realización preferente K o R, en un modo de realización preferente por K, en un modo de realización preferente los aminoácidos en las posiciones 399 o 356 se sustituyen por K) (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat). En otro modo de realización, además de las sustituciones mencionadas anteriormente, en el dominio CH3 de una cadena pesada, el aminoácido K o R en la posición 409 se sustituye por un aminoácido cargado negativamente (en un modo de realización preferente por E o D, en un modo de realización preferente por D) (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat). Aún en otro modo de realización, además de o de forma alternativa a las sustituciones mencionadas anteriormente, en el dominio CH3 de una cadena pesada, el aminoácido K en la posición 439 y/o el aminoácido K en la posición 370 se sustituyen, independientemente el uno del otro, por un aminoácido cargado negativamente (en un modo de realización preferente por E o D, en un modo de realización preferente por D) (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat).

En un modo de realización de un anticuerpo multiespecífico de acuerdo con la invención se usa el enfoque descrito en el documento WO 2007/147901 para soportar la heterodimerización de la primera cadena pesada y la segunda cadena pesada del anticuerpo multiespecífico. En un modo de realización de dicho anticuerpo multiespecífico de acuerdo con la invención, en el dominio CH3 de una cadena pesada, el aminoácido K en la posición 253 se sustituye por E, el aminoácido D en la posición 282 se sustituye por K y el aminoácido K en la posición 322 se sustituye por D, y en el dominio CH3 de la otra cadena pesada, el aminoácido D en la posición 239 se sustituye por K, el aminoácido E en la posición 240 se sustituye por K y el aminoácido K en la posición 292 se sustituye por D (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat).

En un modo de realización de un anticuerpo multiespecífico de acuerdo con la invención, se usa el enfoque descrito en el documento WO 2007/110205 para soportar la heterodimerización de la primera cadena pesada y la segunda cadena pesada del anticuerpo multiespecífico.

En un modo de realización de todos los aspectos y modos de realización de acuerdo con la invención, el anticuerpo multiespecífico es un anticuerpo biespecífico o un anticuerpo triespecífico. En un modo de realización preferente, el anticuerpo multiespecífico es un anticuerpo biespecífico.

En un modo de realización de todos los aspectos de acuerdo con la invención, el anticuerpo es un anticuerpo bivalente o trivalente. En un modo de realización, el anticuerpo es un anticuerpo bivalente.

En un modo de realización de todos los aspectos de acuerdo con la invención, el anticuerpo multiespecífico tiene una estructura de dominio constante de un anticuerpo de tipo IgG. En otro modo de realización de todos los aspectos de acuerdo con la invención, el anticuerpo multiespecífico se caracteriza por que dicho anticuerpo multiespecífico es de la subclase IgG1 humana, o de la subclase IgG1 humana con las mutaciones L234A y L235A. En otro modo de realización de todos los aspectos de acuerdo con la invención, el anticuerpo multiespecífico se caracteriza por que dicho anticuerpo multiespecífico es de la subclase IgG2 humana. En otro modo de realización de todos los aspectos de acuerdo con la invención, el anticuerpo multiespecífico se caracteriza por que dicho anticuerpo multiespecífico es de la subclase IgG3 humana. En otro modo de realización de todos los aspectos de acuerdo con la invención, el anticuerpo multiespecífico se caracteriza por que dicho anticuerpo multiespecífico es de la subclase IgG4 humana o de la subclase IgG4 humana con la mutación adicional S228P. En otro modo de realización de todos los aspectos de acuerdo con la invención, el anticuerpo multiespecífico se caracteriza por que dicho anticuerpo multiespecífico es de la subclase IgG1 humana o la subclase IgG4 humana. En otro modo de realización de todos los aspectos de acuerdo con la invención, el anticuerpo multiespecífico se caracteriza por que dicho anticuerpo multiespecífico es de la subclase IgG1 humana con las mutaciones L234A y L235A (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat). En otro modo de realización de todos los aspectos de acuerdo con la invención, el anticuerpo multiespecífico se caracteriza por que dicho anticuerpo multiespecífico es de la subclase IgG1 humana con las mutaciones L234A, L235A y P329G (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat). En otro modo de realización de todos los aspectos de acuerdo con la invención, el anticuerpo multiespecífico se caracteriza por que dicho anticuerpo multiespecífico es de la subclase IgG4 humana con las mutaciones S228P y L235E (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat). En otro modo de realización de todos los aspectos de acuerdo con la invención, el anticuerpo multiespecífico se caracteriza por que dicho anticuerpo multiespecífico es de la subclase IgG4 humana con las mutaciones S228P, L235E y P329G (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat).

En un modo de realización de todos los aspectos de acuerdo con la invención, un anticuerpo que comprende una cadena pesada que incluye un dominio CH3 como se especifica en el presente documento, comprende un dipéptido glicina-lisina C terminal adicional (G446 y K447, numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat). En un modo de realización de todos los aspectos de acuerdo con la invención, un anticuerpo que comprende una cadena pesada que incluye un dominio CH3, como se especifica en el presente documento, comprende un residuo adicional de glicina C terminal (G446, numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat).

El anticuerpo de acuerdo con la invención se caracteriza en un modo de realización por ser de la subclase IgG1 humana con mutaciones PVA236, L234A/L235A y/o GLPSS331 (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat), o de la subclase IgG4. En otro modo de realización, el anticuerpo se caracteriza por ser de cualquier clase de IgG, siendo en un modo de realización IgG1 o IgG4, que contiene al menos una mutación en E233, L234, L235, G236, D270, N297, E318, K320, K322, A327, A330, P331 y/o P329 (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat). En otro modo de realización, el anticuerpo de la subclase IgG4 contiene la mutación S228P, o las mutaciones S228P y L235E (Angal, S. y cols., Mol. Immunol. 30 [1993] 105-108) (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat).

El extremo C de la cadena pesada del anticuerpo de acuerdo con la invención puede ser un extremo C completo que termina con los residuos de aminoácido PGK. El extremo C de la cadena pesada puede ser un extremo C acortado en el que se han eliminado uno o dos de los residuos de aminoácido C terminales. En un modo de realización preferente, el extremo C de la cadena pesada es un extremo C acortado que termina en PG.

En determinados modos de realización, un anticuerpo de acuerdo con la invención se puede modificar adicionalmente para contener uno o más módulos lanzadera a través de la barrera hematoencefálica que son conocidos en la técnica y fácilmente disponibles.

El módulo lanzadera a través de la barrera hematoencefálica se caracteriza por que tiene una especificidad de unión por un receptor de la barrera hematoencefálica. Esta especificidad de unión se puede obtener fusionando un módulo lanzadera a través de la barrera hematoencefálica al anticuerpo anti-CD19 humano de acuerdo con la invención o se puede obtener introduciendo la especificidad de unión al receptor de la barrera hematoencefálica como una de las especificidades de unión de un anticuerpo multiespecífico que se une específicamente al CD19 humano y, por tanto, comprende la especificidad de unión del anticuerpo anti-CD19 humano de acuerdo con la invención y la especificidad de unión al receptor de la barrera hematoencefálica.

Uno o más módulos lanzadera a través de la barrera hematoencefálica se pueden fusionar a cualquier extremo de la cadena ligera o pesada del anticuerpo anti-CD19 humano de acuerdo con la invención. En un modo de realización preferente, el módulo lanzadera a través de la barrera hematoencefálica se fusiona al extremo C de la cadena pesada.

El uno o más módulos lanzadera a través de la barrera hematoencefálica se pueden fusionar a la cadena respectiva del anticuerpo directamente o por medio de un péptido conector. En un modo de realización preferente, el péptido conector tiene la secuencia de aminoácidos GGS GGSGSGSGSGSGSGGS (SEQ ID NO: 41).

El módulo lanzadera a través de la barrera hematoencefálica puede ser un fragmento de anticuerpo scFv. En un modo de realización, el módulo lanzadera a través de la barrera hematoencefálica es un scFv que comprende en orden N a C terminal un dominio variable de la cadena ligera-un dominio constante de la cadena ligera-un péptido conector-un dominio variable de la cadena pesada-el dominio constante 1 de la cadena pesada.

En un modo de realización preferente, el módulo lanzadera a través de la barrera hematoencefálica es el fragmento scFv del anticuerpo anti-receptor de la transferrina 8D3 con un péptido conector (G4S)₆ o una variante humanizada del mismo.

El término variante humanizada del mismo indica una molécula que se ha obtenido injertando las CDR del anticuerpo murino 8D3 en una región estructural humana con la introducción opcional de una a tres mutaciones independientemente las unas de las otras en cada una de las regiones estructurales (FR) y/o las regiones hipervariables (HVR).

En un aspecto de acuerdo con la invención, se proporciona un polipéptido de fusión del anticuerpo anti-CD19 humano que comprende un anticuerpo anti-CD19 humano, dos conectores peptídicos y dos entidades de unión monovalentes que se unen a un receptor de la barrera hematoencefálica, en el que el conector acopla el anticuerpo anti-CD19 humano a las entidades de unión monovalentes que se unen al receptor de la barrera hematoencefálica.

En un aspecto de acuerdo con la invención, se proporciona un polipéptido de fusión del anticuerpo anti-CD19 humano que comprende un anticuerpo anti-CD19 humano, un conector peptídico y una entidad de unión monovalente que se une a un receptor de la barrera hematoencefálica, en el que el conector acopla el anticuerpo anti-CD19 humano a la entidad de unión monovalente que se une al receptor de la barrera hematoencefálica.

En un modo de realización, la entidad de unión monovalente que se une al receptor de la barrera hematoencefálica

se selecciona del grupo que consiste en proteínas, polipéptidos y péptidos.

En un modo de realización, la entidad de unión monovalente que se une al receptor de la barrera hematoencefálica comprende una molécula seleccionada del grupo que consiste en un ligando del receptor de la barrera hematoencefálica, un scFv, un Fv, un scFab, un VHH, en una realización preferente un scFv o un scFab.

En un modo de realización, el receptor de la barrera hematoencefálica se selecciona del grupo que consiste en receptor de la transferrina, receptor de la insulina, receptor del factor de crecimiento insulínico, proteína relacionada con el receptor de lipoproteínas de baja densidad 8, proteína relacionada con el receptor de lipoproteínas de baja densidad 1 y factor de crecimiento similar al factor de crecimiento epidérmico de unión a la heparina. En un modo de realización preferente, el receptor de la barrera hematoencefálica es el receptor de la transferrina.

En un modo de realización, la entidad de unión monovalente que se une al receptor de la barrera hematoencefálica comprende un scFab o un scFv dirigido al receptor de la transferrina, más particular un scFab o scFv que reconoce un epítipo en el receptor de la transferrina comprendido dentro de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 42, 43 y 44.

En un modo de realización, la entidad de unión monovalente que se une al receptor de la barrera hematoencefálica está acoplada al extremo C terminal de la cadena pesada del anticuerpo anti-CD19 humano por el conector.

En un modo de realización, el conector peptídico es una secuencia de aminoácidos con una longitud de al menos 15 aminoácidos, más preferentemente con una longitud de 18 a 25 aminoácidos.

En un modo de realización, el anticuerpo anti-CD19 humano es un anticuerpo de longitud completa, en un modo de realización preferente, una IgG de longitud completa. El término "anticuerpo de longitud completa" indica un anticuerpo que consiste en dos polipéptidos de cadena ligera del anticuerpo y dos polipéptidos de cadena pesada del anticuerpo, en el que en los dos polipéptidos de cadena pesada del anticuerpo el residuo de lisina (K) C terminal puede estar presente o no.

En un modo de realización preferente, el polipéptido de fusión del anticuerpo anti-CD19 humano comprende un anticuerpo IgG anti-CD19 humano de longitud completa como entidad efectora cerebral, un conector con la secuencia GSGGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 41) y un scFab como entidad de unión monovalente que se une al receptor de la transferrina humano como receptor hematoencefálico, en el que el scFab está acoplado por el conector al extremo C terminal (de la parte de Fc) de una de las cadenas pesadas del anticuerpo anti-CD19 humano de longitud completa, y en el que el scFab reconoce un epítipo en el receptor de la transferrina humano comprendido dentro de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 52, 53 y 54.

En un modo de realización preferente, el polipéptido de fusión del anticuerpo anti-CD19 humano comprende un anticuerpo IgG anti-CD19 humano de longitud completa como entidad efectora cerebral, un conector con la secuencia GSGGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 41) y un scFv como entidad de unión monovalente que se une al receptor de la transferrina humano como receptor hematoencefálico, en el que el scFab está acoplado por el conector al extremo C terminal (de la parte de Fc) de una de las cadenas pesadas del anticuerpo anti-CD19 humano de longitud completa, y en el que el scFab reconoce un epítipo en el receptor de la transferrina humano comprendido dentro de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 42, 43 y 44.

En un modo de realización, la primera cadena pesada del anticuerpo anti-CD19 humano comprende un primer módulo de dimerización y la segunda cadena pesada del anticuerpo comprende un segundo módulo de dimerización que permite la heterodimerización de las dos cadenas pesadas.

En un modo de realización, el primer módulo de dimerización de la primera cadena pesada del anticuerpo anti-CD19 humano es una cadena pesada de botón y el módulo de dimerización de la segunda cadena pesada del anticuerpo anti-CD19 humano es una cadena pesada de ojal (de acuerdo con estrategia de botones en ojales).

El polipéptido de fusión del anticuerpo anti-CD19 humano de acuerdo con la invención se puede usar para transportar el anticuerpo anti-CD19 humano a través de la barrera hematoencefálica.

En un modo de realización, la cadena pesada del anticuerpo anti-CD19 humano que está acoplada en su extremo C terminal de la región Fc al scFab como entidad de unión monovalente que se une al receptor de la transferrina humano tiene la siguiente estructura en dirección N a C terminal:

- cadena pesada de IgG,

- conector peptídico que acopla el extremo C terminal de la región Fc de la cadena pesada de IgG al extremo N terminal del dominio VL del scFab, en un modo de realización preferente, el conector peptídico tiene la secuencia de aminoácidos GSGGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 41),

• dominio variable de la cadena ligera (VL) y dominio C-kappa de la cadena ligera del scFab,

• conector peptídico que acopla el extremo C terminal del dominio C-kappa de la cadena ligera del scFab al extremo N terminal del dominio VH del scFab, en un modo de realización preferente, el conector peptídico tiene la secuencia de aminoácidos (G₄S)₆GG (SEQ ID NO: 45),

• dominio variable de la cadena pesada (VH) del anticuerpo scFab y dominio CH1 de la cadena pesada de IgG.

En un modo de realización, la cadena pesada del anticuerpo anti-CD19 humano que está acoplada en su extremo C terminal de la región Fc al scFv como entidad de unión monovalente que se une al receptor de la transferrina humano tiene la siguiente estructura en dirección N a C terminal:

• cadena pesada de IgG,

• conector peptídico que acopla el extremo C terminal de la parte Fc de la cadena pesada de IgG al extremo N terminal del dominio VL del fragmento de anticuerpo scFv, en un modo de realización preferente, el conector peptídico es un péptido con la secuencia de aminoácidos GSGGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 41),

• dominio variable de la cadena ligera (VL),

• conector peptídico que acopla el extremo C terminal del dominio variable de la cadena ligera al extremo N terminal del dominio VH del scFv, en un modo de realización preferente, el conector peptídico es un péptido con la secuencia de aminoácidos (G₄S)₆GG (SEQ ID NO: 45),

• dominio variable de la cadena pesada (VH) del fragmento de anticuerpo scFv.

En un modo de realización, el módulo lanzadera a través de la barrera hematoencefálica/el scFab o scFv dirigido a un receptor de la barrera hematoencefálica se deriva de un anticuerpo 8D3 humanizado anti-receptor de la transferrina (véase, por ejemplo, Boado, R.J. y cols., Biotechnol. Bioeng. 102 [2009] 1251-1258). El dominio variable de la cadena pesada murina tiene la secuencia de aminoácidos de

```
EVQLVESGGG LVQPGNSLTL SCVASGFTFS NYGMHWIRQA PKKGLEWIAM
IYYDSSKMNY ADTVKGRFTI SRDNSKNTLY LEMNSLRSED TAMYICAVPT
SHYVVDVWGQ GVSVTVSS
```

(SEQ ID NO: 46).

El dominio variable de la cadena ligera murina (variante 1) tiene la secuencia de aminoácidos de

```
DIQMTQSPAS LSASLEEIVT ITCQASQDIG NWLAWYQQKP GKSPQLLIYG
ATSLADGVPS RFSGSRSGTQ FSLKISRVQV EDIGIYYCLQ AYNTPTWTFGG
GTKLELTK
```

(SEQ ID NO: 47), y

el dominio variable de la cadena ligera murina (variante 2) tiene la secuencia de aminoácidos de

```
DIQMTQSPAS LSASLEEIVT ITCQASQDIG NWLAWYQQKP GKSPQLLIYG
ATSLADGVPS RFSGSRSGTQ FSLKISRVQV EDIGIYYCLQ AYNTPTWTFGG
GTKVEIK
```

(SEQ ID NO: 48).

En un modo de realización, el anticuerpo anti-receptor de la transferrina o la especificidad de unión al receptor de la transferrina comprende (a) una HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 51; (b) una HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 52; (c) una HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 53, 54 o 55; (d) una HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 56; (e) una HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 57; y (f) una HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 58.

En un modo de realización, el anticuerpo anti-receptor de la transferrina comprende al menos un par del dominio

variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 49 y el dominio variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 50 que forman un sitio de unión para el receptor de la transferrina.

Un módulo lanzadera a través de la barrera hematoencefálica

En un aspecto de acuerdo con la invención, el anticuerpo anti-CD19 humano o el polipéptido de fusión del anticuerpo anti-CD19 humano comprende exactamente una especificidad de unión a la barrera hematoencefálica o módulo lanzadera a través de la barrera hematoencefálica, por tanto es al menos biespecífico, en el que la especificidad de unión a la barrera hematoencefálica o módulo lanzadera a través de la barrera hematoencefálica comprende los dominios variables humanizados del anticuerpo anti-receptor de la transferrina humano 8D3 o el par del dominio variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 49 y el dominio variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 50, con lo que la especificidad de unión a la barrera hematoencefálica o módulo lanzadera a través de la barrera hematoencefálica transporta el anticuerpo anti-CD19 humano a través de la barrera hematoencefálica.

Uno o dos módulos lanzadera a través de la barrera hematoencefálica

En un aspecto de acuerdo con la invención, el anticuerpo anti-CD19 humano o el polipéptido de fusión del anticuerpo anti-CD19 humano comprende una o dos especificidades de unión a la barrera hematoencefálica o módulo(s) lanzadera a través de la barrera hematoencefálica, por tanto es al menos biespecífico, en el que el sitio de unión a la barrera hematoencefálica o módulo lanzadera a través de la barrera hematoencefálica se deriva(n) de un anticuerpo que se une con baja afinidad a un receptor de la barrera hematoencefálica (R-BHE, especificidad de unión al R-BHE), con lo que la especificidad de unión a la barrera hematoencefálica o módulo lanzadera a través de la barrera hematoencefálica derivado de un anticuerpo que se une con baja afinidad a un receptor de la barrera hematoencefálica transporta el anticuerpo anti-CD19 humano a través de la barrera hematoencefálica.

En un modo de realización, el R-BHE se selecciona del grupo que consiste en receptor de la transferrina (RTF), receptor de la insulina, receptor del factor de crecimiento insulínico (receptor del IGF), proteína relacionada con el receptor de lipoproteínas de baja densidad 8 (LRP8), proteína relacionada con el receptor de lipoproteínas de baja densidad 1 (LRP1) y factor de crecimiento similar al factor de crecimiento epidérmico de unión a la heparina (HB-EGF). En otro de dichos aspectos, el R-BHE es un R-BHE humano. En uno de dichos aspectos, el R-BHE es RTF. En otro aspecto de este tipo, el R-BHE es RTF y el anticuerpo no inhibe la actividad del RTF. En otro aspecto de este tipo, el R-BHE es RTF y el anticuerpo no inhibe la unión del RTF a la transferrina.

En un modo de realización, el anticuerpo no perjudica la unión del R-BHE a uno o más de sus ligandos naturales. En uno de dichos modos de realización, el anticuerpo se une específicamente al receptor de la transferrina humano (RTFh) de tal manera que no inhibe la unión del RTFh a la transferrina humana.

En un modo de realización, la especificidad de unión del R-BHE tiene una CI_{50} para el R-BHE de aproximadamente 1 nM a aproximadamente 100 μ M. En un modo de realización, la CI_{50} es de aproximadamente 5 nM a aproximadamente 100 μ M. En un modo de realización, la CI_{50} es de aproximadamente 50 nM a aproximadamente 100 μ M. En un modo de realización, la CI_{50} es de aproximadamente 100 nM a aproximadamente 100 μ M. En un modo de realización, la especificidad de unión del R-BHE tiene una afinidad por el R-BHE de aproximadamente 5 nM a aproximadamente 10 μ M. En un modo de realización, la especificidad de unión del R-BHE, cuando está conjugado o comprendido en el anticuerpo anti-CD19 humano, tiene una afinidad por el R-BHE de aproximadamente 30 nM a aproximadamente 1 μ M. En un modo de realización, la especificidad de unión del R-BHE, cuando está conjugado o comprendido en el anticuerpo anti-CD19 humano, tiene una afinidad por el R-BHE de aproximadamente 50 nM a aproximadamente 1 μ M. En un modo de realización, la afinidad de la especificidad de unión del R-BHE o del polipéptido de fusión del anticuerpo anti-CD19 humano por el R-BHE se mide usando análisis de Scatchard. En un modo de realización, la afinidad de la especificidad de unión del R-BHE o del polipéptido de fusión del anticuerpo anti-CD19 humano por el R-BHE se mide usando análisis de BIACORE. En un modo de realización, la afinidad de la especificidad de unión del R-BHE o del polipéptido de fusión del anticuerpo anti-CD19 humano por el R-BHE se mide usando un ELISA competitivo.

Uso de la lanzadera a través de la barrera hematoencefálica que contiene polipéptidos de fusión de anticuerpos

En el presente documento se divulga un procedimiento para incrementar la exposición del SNC a un anticuerpo anti-CD19 humano, en el que el anticuerpo anti-CD19 humano se acopla a un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se une con baja afinidad a un R-BHE, incrementando de este modo la exposición del SNC al anticuerpo anti-CD19 humano. El término "acoplado" incluye casos en los que la especificidad de unión del anticuerpo anti-R-BHE se introduce como segunda especificidad de unión en un anticuerpo anti-CD19 humano/R-BHE al menos biespecífico. El incremento de la exposición del SNC al anticuerpo anti-CD19 humano se mide con respecto a la exposición del SNC a un anticuerpo anti-CD19 humano acoplado con un anticuerpo típico que no tiene una afinidad reducida por el R-BHE. El incremento de la exposición del SNC al anticuerpo anti-CD19 humano se mide como una proporción de la cantidad del anticuerpo anti-CD19 humano hallada en el SNC con respecto a la cantidad hallada en el suero después de la administración. El incremento de la exposición del SNC da como resultado una proporción superior al 0,1 %. El incremento de la exposición del SNC al anticuerpo anti-CD19 humano se mide con respecto a la

exposición del SNC al anticuerpo anti-CD19 humano en ausencia de un anticuerpo anti-R-BHE acoplado. El incremento de la exposición del SNC al anticuerpo anti-CD19 humano se mide mediante formación de imágenes. El incremento de la exposición del SNC al anticuerpo anti-CD19 humano se mide mediante una lectura indirecta, tal como una modificación de uno o más síntomas fisiológicos.

En el presente documento se divulga un procedimiento para incrementar la retención en el SNC de un anticuerpo anti-CD19 humano administrado a un sujeto, en el que el anticuerpo anti-CD19 humano se acopla a un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se une con baja afinidad a un R-BHE, de modo que la retención del anticuerpo anti-CD19 humano en el SNC se incrementa.

En otro modo de realización de acuerdo con la invención se proporciona un procedimiento para optimizar la farmacocinética y/o la farmacodinámica de un anticuerpo anti-CD19 humano para que sea eficaz en el SNC de un sujeto, en el que el anticuerpo anti-CD19 humano se acopla a un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se une con baja afinidad a un R-BHE, con lo que el anticuerpo o fragmento de anticuerpo se selecciona de modo que su afinidad por el R-BHE después del acoplamiento al anticuerpo anti-CD19 humano da como resultado una cantidad de transporte del anticuerpo o fragmento de anticuerpo conjugado con el anticuerpo anti-CD19 humano a través de la BHE que optimiza la farmacocinética y/o la farmacodinámica del anticuerpo anti-CD19 humano en el SNC.

Divulgado en el presente documento se proporciona un procedimiento para tratar un trastorno neurológico en un mamífero, que comprende tratar al mamífero con un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se une a un R-BHE y que está acoplado a un anticuerpo anti-CD19 humano, en el que el anticuerpo se ha seleccionado para que tenga baja afinidad por el R-BHE y mejore de este modo la captación en el SNC del anticuerpo y del anticuerpo anti-CD19 humano acoplado. El tratamiento da como resultado la disminución o eliminación de los síntomas del trastorno. El tratamiento da como resultado la mejora del trastorno neurológico.

En un modo de realización de todos los aspectos previos, el anticuerpo anti-R-BHE tiene una CI_{50} para el R-BHE de aproximadamente 1 nM a aproximadamente 100 μ M. En otro modo de realización de este tipo, la CI_{50} es de aproximadamente 5 nM a aproximadamente 100 μ M. En otro modo de realización de este tipo, la CI_{50} es de aproximadamente 50 nM a aproximadamente 100 μ M. En otro modo de realización de este tipo, la CI_{50} es de aproximadamente 100 nM a aproximadamente 100 μ M. En otro modo de realización, el anticuerpo tiene una afinidad por el R-BHE de aproximadamente 5 nM a aproximadamente 10 μ M. En otro modo de realización, el anticuerpo, cuando se acopla al anticuerpo anti-CD19 humano, tiene una afinidad por el R-BHE de aproximadamente 30 nM a aproximadamente 1 μ M. En otro modo de realización, el anticuerpo, cuando se acopla al anticuerpo anti-CD19 humano, tiene una afinidad por el R-BHE de aproximadamente 50 nM a aproximadamente 1 μ M. En un modo de realización, la afinidad del anticuerpo anti-R-BHE o del polipéptido de fusión del anticuerpo anti-CD19 humano por el R-BHE se mide usando análisis de Scatchard. En otro modo de realización, la afinidad del anticuerpo anti-R-BHE o del polipéptido de fusión del anticuerpo anti-CD19 humano por el R-BHE se mide usando análisis con BIACORE. En otro modo de realización, la afinidad del anticuerpo anti-R-BHE o del polipéptido de fusión del anticuerpo anti-CD19 humano por el R-BHE se mide usando un ELISA competitivo.

En otro modo de realización, el polipéptido de fusión del anticuerpo anti-CD19 humano está marcado. En otro modo de realización, el anticuerpo o fragmento anti-R-BHE no perjudica la unión del R-BHE a uno o más de sus ligandos naturales. En otro modo de realización, el anticuerpo anti-R-BHE se une específicamente al RTFh de tal manera que no inhibe la unión del RTFh a la transferrina humana. En otro modo de realización, el polipéptido de fusión del anticuerpo anti-CD19 humano se administra a un mamífero. En otro modo de realización, el mamífero es un ser humano. En otro modo de realización, el mamífero tiene un trastorno neurológico. En otro modo de realización, el trastorno neurológico se selecciona del grupo que consiste en enfermedad de Alzheimer (EA), apoplejía, demencia, distrofia muscular (DM), esclerosis múltiple (EM), esclerosis lateral amiotrófica (ELA), fibrosis quística, síndrome de Angelman, síndrome de Liddle, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Pick, enfermedad de Paget, cáncer y lesión cerebral traumática.

Complejos no covalentes como lanzaderas a través de la barrera hematoencefálica

Una parte del complejo no covalente es un módulo lanzadera a través de la barrera hematoencefálica (módulo lanzadera a través de la BHE) que es un anticuerpo biespecífico con una primera especificidad de unión para un hapteno y una segunda especificidad de unión para un receptor de la barrera hematoencefálica (R-BHE). Dicho módulo lanzadera a través de la BHE reconoce una diana en la superficie celular capaz de transcitosis en la barrera hematoencefálica (tal como el RTF, las LRP u otras dianas, el R-BHE) y se une simultáneamente a un anticuerpo anti-CD19 humano haptenilado.

Con más detalle, el anticuerpo que se une específicamente al CD19 humano se conjuga con un hapteno y se compleja con el sitio de unión al hapteno de la lanzadera a través de la barrera hematoencefálica. Este complejo está definido y es estable y transporta específicamente el anticuerpo haptenilado que se une específicamente al CD19 humano a través de la barrera hematoencefálica. Dado que la lanzadera a través de la barrera hematoencefálica compleja de manera no covalente el anticuerpo haptenilado que se une específicamente al CD19 humano, el anticuerpo haptenilado que se une específicamente al CD19 humano está por una parte unido a su vehículo de

transporte (= lanzadera a través de la barrera hematoencefálica = anticuerpo biespecífico) durante el tiempo que está en la circulación, pero también por otra parte se puede liberar eficazmente después de la transcitosis. La conjugación con el hapteno se puede efectuar sin interferir con la actividad del anticuerpo que se une específicamente al CD19 humano. La lanzadera a través de la barrera hematoencefálica no contiene una adición covalente inusual y, por lo tanto, obvia cualquier riesgo de inmunogenicidad. Los complejos del anticuerpo haptenilado que se une específicamente al CD19 humano, en los que el anticuerpo biespecífico contiene los sitios de unión específicos del hapteno, confieren un comportamiento biofísico benigno al anticuerpo que se une específicamente al CD19 humano. Además, dichos complejos son capaces de dirigir la carga a las células o tejidos que presentan el antígeno reconocido por la segunda especificidad de unión del anticuerpo biespecífico.

El anticuerpo que se une específicamente al CD19 humano conserva su funcionalidad a pesar de estar haptenilado, así como mientras está complejoado por la lanzadera a través de la barrera hematoencefálica (= anticuerpo biespecífico). Además, el sitio de unión del receptor de la barrera hematoencefálica del anticuerpo biespecífico conserva su especificidad y afinidad de unión en presencia del anticuerpo haptenilado complejoado que se une específicamente al CD19 humano. Los complejos del anticuerpo haptenilado que se une específicamente al CD19 humano con el anticuerpo biespecífico de acuerdo con la invención se pueden usar para dirigirse al anticuerpo que se une específicamente al CD19 humano, específicamente a las células que expresan el receptor de la barrera hematoencefálica. Dado que el anticuerpo haptenilado que se une específicamente al CD19 humano está acoplado de manera no covalente al anticuerpo biespecífico, el anticuerpo que se une específicamente al CD19 humano se puede liberar después de su internalización o transcitosis.

En otro aspecto, un anticuerpo anti-CD19 humano de acuerdo con la invención puede incorporar cualquiera de los rasgos característicos, individualmente o en combinación, como se describe en las secciones 1-5 a continuación:

1. Afinidad de anticuerpos

Por ejemplo, la K_D se puede medir usando un ensayo de resonancia de plasmón superficial BIACORE®. Un ensayo usando un BIACORE®-2000 o un BIACORE®-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ) se realiza a 25 °C con matrices CM5 con antígeno inmovilizado a ~10 unidades de respuesta (UR). Las matrices del biosensor de dextrano carboximetilado (CM5, BIACORE, Inc) se activan con clorhidrato de *N*-etil-*N'*-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) y *N*-hidroxisuccinimida (NHS) de acuerdo con las instrucciones del proveedor. El antígeno se diluye con acetato de sodio 10 mM, pH 4,8, a 5 µg/ml (~0,2 µM) antes de su inyección a un caudal de 5 µl/minuto para lograr aproximadamente 10 unidades de respuesta (UR) de proteína acoplada. Después de la inyección del antígeno, se inyecta etanolamina 1 M para bloquear los grupos sin reaccionar. Para las mediciones cinéticas, se inyectan diluciones sucesivas a la mitad de Fab (de 0,78 nM a 500 nM) en PBS con el tensioactivo polisorbato 20 (TWEEN-20™; PBST) al 0,05 % a 25 °C a un caudal de aproximadamente 25 µl/min. Se calculan las tasas de asociación (k_{as}) y las tasas de disociación (k_{dis}) usando un simple modelo de unión uno a uno de Langmuir (programa informático de evaluación BIACORE®, versión 3,2) ajustando simultáneamente los sensogramas de asociación y disociación. La constante de disociación en equilibrio (K_D) se calcula como la proporción k_{dis}/k_{as} (véase, por ejemplo, Chen, Y. y cols., J. Mol. Biol. 293 [1999] 865-881).

2. Fragmentos de anticuerpo

En determinados modos de realización, un anticuerpo de acuerdo con la invención es un fragmento de anticuerpo. Los fragmentos de anticuerpo incluyen, pero no se limitan a, los fragmentos Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂, Fv y scFv, y otros fragmentos descritos a continuación. Para una revisión de determinados fragmentos de anticuerpo, véase Hudson, P.J. y cols., Nat. Med. 9 (2003) 129-134. Para una revisión de los fragmentos scFv, véase, por ejemplo, Plueckthun, A., en: The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg y Moore (eds.), Springer-Verlag, Nueva York (1994), págs. 269-315; véanse también los documentos WO 93/16185; US 5.571.894 y US 5.587.458. Para un análisis de los fragmentos Fab y F(ab')₂ que comprenden residuos de epítomos de unión al receptor de rescate y que tienen una semivida *in vivo* incrementada véase el documento US 5.869.046.

Los diacuerpos son fragmentos de anticuerpo con dos sitios de unión a antígeno que pueden ser bivalentes o biespecíficos. Véanse, por ejemplo, los documentos EP 0 404 097; WO 1993/01161; Hudson, P.J. y cols., Nat. Med. 9 (2003) 129-134; y Holliger, P. y cols., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 (1993) 6444-6448. También se describen triacuerpos y tetracuerpos en Hudson, P.J. y cols., Nat. Med. 9 (2003) 129-134.

Los anticuerpos de dominio único son fragmentos de anticuerpo que comprenden todo o una parte del dominio variable de la cadena pesada o todo o una parte del dominio variable de la cadena ligera de un anticuerpo. En determinados modos de realización, un anticuerpo de dominio único es un anticuerpo humano de dominio único (Domantis, Inc., Waltham, MA; véase, por ejemplo, el documento US 6.248.516).

Se pueden elaborar fragmentos de anticuerpo por diversas técnicas, incluyendo pero sin limitarse a, digestión proteolítica de un anticuerpo intacto, así como la producción por células huésped recombinantes (por ejemplo, *E. coli* o fago), como se describe en el presente documento.

3. Anticuerpos quiméricos y humanizados

Un anticuerpo de acuerdo con la invención es un anticuerpo quimérico. Se describen determinados anticuerpos quiméricos, por ejemplo, en el documento US 4.816.567; y en Morrison, S.L. y cols., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81 (1984) 6851-6855.

Un anticuerpo humanizado es un anticuerpo quimérico. Típicamente, se humaniza un anticuerpo no humano para reducir la inmunogenicidad para los seres humanos, conservando la especificidad y afinidad del anticuerpo no humano original. En general, un anticuerpo humanizado comprende uno o más dominios variables en los que las HVR, por ejemplo, las CDR (o partes de las mismas), se derivan de un anticuerpo no humano y las FR (o partes de las mismas) se derivan de secuencias de anticuerpos humanos. Un anticuerpo humanizado también comprenderá opcionalmente al menos una parte de una región constante humana. En algunos modos de realización se sustituyen algunos residuos de FR de un anticuerpo humanizado por los residuos correspondientes de un anticuerpo no humano (por ejemplo, el anticuerpo del que se derivan los residuos de HVR), por ejemplo, para restablecer o mejorar la especificidad o afinidad del anticuerpo.

Los anticuerpos humanizados y los procedimientos de elaboración de los mismos se revisan, por ejemplo, en Almagro, J.C. y Fransson, J., Front. Biosci. 13 (2008) 1619-1633, y se describen adicionalmente, por ejemplo, en Riechmann, I. y cols., Nature 332 (1988) 323-329; Queen, C. y cols., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86 (1989) 10029-10033; en los documentos US 5.821.337, US 7.527.791, US 6.982.321 y US 7.087.409; Kashmiri, S.V. y cols., Methods 36 (2005) 25-34 (que describen el injerto en la región determinante de la especificidad [SDR]); Padlan, E.A., Mol. Immunol. 28 (1991) 489-498 (que describe el "rebornizado"); Dall'Acqua, W.F. y cols., Methods 36 (2005) 43-60 (que describen el "reordenamiento de FR"); y Osbourn, J. y cols., Methods 36 (2005) 61-68 y Klimka, A. y cols., Br. J. Cancer 83 (2000) 252260 (que describen el enfoque de "selección guiada" para el reordenamiento de FR).

Las regiones estructurales humanas que se pueden usar para la humanización incluyen, pero no se limitan a: regiones estructurales seleccionadas usando el procedimiento de "mejor ajuste" (véase, por ejemplo, Sims, M.J. y cols., J. Immunol. 151 [1993] 2296-2308); regiones estructurales derivadas de la secuencia consenso de anticuerpos humanos de un subgrupo determinado de regiones variables de la cadena ligera o pesada (véase, por ejemplo, Carter, P. y cols., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89 [1992] 4285-4289; y Presta, L.G. y cols., J. Immunol. 151 [1993] 2623-2632); regiones estructurales maduras (con mutaciones somáticas) humanas o regiones estructurales de la línea germinal humana (véase, por ejemplo, Almagro, J.C. y Fransson, J., Front. Biosci. 13 [2008] 1619-1633); y regiones estructurales derivadas del cribado de colecciones de FR (véase, por ejemplo, Baca, M. y cols., J. Biol. Chem. 272 [1997] 10678-10684 y Rosok, M.J. y cols., J. Biol. Chem. 271 [1996] 22611-22618).

4. Anticuerpos multiespecíficos

En determinados modos de realización, un anticuerpo de acuerdo con la invención es un anticuerpo multiespecífico, por ejemplo, un anticuerpo biespecífico. Los anticuerpos multiespecíficos son anticuerpos monoclonales que tienen especificidades de unión por al menos dos sitios diferentes. En determinados modos de realización, una de las especificidades de unión es por el CD19 humano y la otra es por cualquier otro antígeno. En determinados modos de realización, los anticuerpos biespecíficos se pueden unir a dos epítopos diferentes del CD19 humano. También se pueden usar anticuerpos biespecíficos para localizar agentes citotóxicos para las células que expresan el CD19 humano. Se pueden preparar anticuerpos biespecíficos como anticuerpos de longitud completa o fragmentos de anticuerpo.

Las técnicas para elaborar anticuerpos multiespecíficos incluyen, pero no se limitan a, la coexpresión recombinante de dos pares de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina que tienen diferentes especificidades (véase Milstein, C. y Cuello, A.C., Nature 305 [1983] 537-540, el documento WO 93/08829 y Traunecker, A. y cols., EMBO J. 10 [1991] 3655-3659), y la genomanipulación "botón en ojal" (véase, por ejemplo, el documento US 5.731.168). También se pueden elaborar anticuerpos multiespecíficos modificando los efectos de conducción electrostática para elaborar moléculas heterodiméricas de Fc del anticuerpo (documento WO 2009/089004); reticulando dos o más anticuerpos o fragmentos (véanse, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 4.676.980, y Brennan, M. y cols., Science 229 [1985] 81-83); usando cremalleras de leucinas para producir anticuerpos biespecíficos (véase, por ejemplo, Kostelny, S.A. y cols., J. Immunol. 148 [1992] 1547-1553); usando la tecnología de "diacuerpos" para elaborar fragmentos de anticuerpo biespecífico (véase, por ejemplo, Holliger, P. y cols., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 [1993] 6444-6448); y usando dímeros de Fv monocatenarios (scFv) (véase, por ejemplo, Gruber, M. y cols., J. Immunol. 152 [1994] 5368-5374); y preparando anticuerpos trispecíficos como se describe, por ejemplo, en Tutt, A. y cols., J. Immunol. 147 (1991) 60-69.

También se incluyen en el presente documento anticuerpos genomanipulados con tres o más sitios de unión a antígeno funcionales, incluyendo los "anticuerpos pulpo" (véase, por ejemplo, el documento US 2006/0025576).

El anticuerpo o fragmento en el presente documento también incluye un "Fab de doble acción" o "DAF" que comprende un sitio de unión a antígeno que se une al CD19 humano, así como otro antígeno diferente (véase, el

documento US 2008/0069820, por ejemplo).

El anticuerpo o fragmento en el presente documento también incluye anticuerpos multiespecíficos descritos en los documentos

WO 2009/080251, WO 2009/080252, WO 2009/080253, WO 2009/080254, WO 2010/112193, WO 2010/115589, WO 2010/136172, WO 2010/145792 y WO 2010/145793.

5. Variantes de anticuerpos

En determinados modos de realización se contemplan variantes de la secuencia de aminoácidos del anticuerpo de acuerdo con la invención. Por ejemplo, puede ser deseable mejorar la afinidad de unión y/u otras propiedades biológicas del anticuerpo. Se pueden preparar variantes de la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo introduciendo modificaciones apropiadas en la secuencia de nucleótidos que codifica el anticuerpo o por síntesis de péptidos. Dichas modificaciones incluyen, por ejemplo, deleciones de y/o inserciones en y/o sustituciones de residuos dentro de las secuencias de aminoácidos del anticuerpo. Se puede realizar cualquier combinación de deleción, inserción y sustitución para llegar a la construcción final, siempre que la construcción final posea las características deseadas, por ejemplo, unión a antígeno.

a) Variantes de sustitución, inserción y deleción

En determinados modos de realización se proporcionan variantes de anticuerpo que tienen una o más sustituciones aminoacídicas. Los sitios de interés para la mutagénesis de sustitución incluyen las HVR y las FR. En la tabla a continuación se muestran sustituciones conservadoras bajo el encabezamiento de "sustituciones preferentes". En la tabla 1 se proporcionan cambios más sustanciales bajo el encabezamiento "sustituciones ejemplares" y como se describe además a continuación en referencia a las clases de cadenas laterales de aminoácidos. Se pueden introducir sustituciones aminoacídicas en un anticuerpo de interés y cribar los productos para determinar una actividad deseada, por ejemplo, unión a antígeno conservada/mejorada, inmunogenicidad disminuida, o CCDA o CDC mejorada.

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

Los aminoácidos se pueden agrupar de acuerdo con propiedades comunes de las cadenas laterales:

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

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

(3) ácidos: Asp, Glu;

(4) básicos: His, Lys, Arg;

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

(6) aromáticos: Trp, Tyr, Phe.

Las sustituciones no conservadoras supondrán intercambiar un miembro de una de estas clases por otra clase.

10 Un tipo de variante de sustitución implica sustituir uno o más residuos de la región hipervariable de un anticuerpo original (por ejemplo, un anticuerpo humanizado o humano). En general, la(s) variante(s) resultante(s) seleccionada(s) para su estudio adicional tendrá(n) modificaciones (por ejemplo, mejoras) en determinadas propiedades biológicas (por ejemplo, afinidad incrementada, inmunogenicidad reducida) con respecto al anticuerpo original y/o habrá(n) retenido sustancialmente determinadas propiedades biológicas del anticuerpo original.

15 Una variante de sustitución ejemplar es un anticuerpo con maduración de la afinidad, que se puede generar convenientemente, por ejemplo, usando técnicas de maduración de la afinidad basadas en presentación en fagos, tales como las descritas en el presente documento. En resumen, se mutan uno o más residuos de HVR y los anticuerpos variantes se presentan en fagos y se criban para determinar una actividad biológica concreta (por ejemplo, la afinidad de unión).

Se pueden hacer alteraciones (por ejemplo, sustituciones) en las HVR, por ejemplo, para mejorar la afinidad de anticuerpos. Dichas alteraciones se pueden realizar en "puntos calientes" de la HVR, es decir, residuos codificados por codones que se someten a una mutación con alta frecuencia durante el proceso de maduración somática

25 (véase, por ejemplo, Chowdhury, P.S., *Methods Mol. Biol.* 207 [2008] 179-196), y/o residuos que entran en contacto con el antígeno, sometándose a prueba el VH o VL variante resultante para determinar la afinidad de unión. Se ha descrito la maduración de afinidad mediante la construcción y reelección de colecciones secundarias, por ejemplo, en Hoogenboom, H.R. y cols., en *Methods in Molecular Biology* 178 (2002) 1-37. En algunos modos de realización de la maduración de la afinidad se introduce diversidad en los genes variables elegidos para la maduración mediante cualquiera de una variedad de procedimientos (por ejemplo, PCR propensa a error, reordenamiento de cadenas o mutagénesis dirigida por oligonucleótidos). A continuación, se crea una segunda colección. A continuación, se criba la colección para identificar cualquier variante de anticuerpo con la afinidad deseada. Otro procedimiento para introducir diversidad implica enfoques dirigidos a HVR, en los que se aleatorizan varios residuos de HVR (por ejemplo, 4-6 residuos cada vez). Se pueden identificar específicamente los residuos de HVR implicados en la unión

30 a antígeno, por ejemplo, usando mutagénesis por barrido de alanina o modelado. A menudo se seleccionan como diana en particular CDR-H3 y CDR-L3.

En determinados modos de realización se pueden producir sustituciones, inserciones o deleciones dentro de una o más HVR, siempre que dichas alteraciones no reduzcan sustancialmente la capacidad del anticuerpo de unirse al antígeno. Por ejemplo, se pueden realizar alteraciones conservadoras en las HVR (por ejemplo, sustituciones conservadoras como se proporciona en el presente documento) que no reduzcan sustancialmente la afinidad de unión. Dichas alteraciones pueden estar, por ejemplo, fuera de los residuos en contacto con el antígeno en las HVR. En determinados modos de realización de las secuencias de VH y VL variantes proporcionadas anteriormente, cada HVR está inalterada o bien no contiene más de una, dos o tres sustituciones aminoacídicas.

Un procedimiento útil para la identificación de residuos o regiones de un anticuerpo que se puede seleccionar para la mutagénesis se llama "mutagénesis por barrido de alanina" como se describe en Cunningham, B.C. y Wells, J.A., *Science* 244 (1989) 1081-1085. En este procedimiento se identifican un residuo o grupo de residuos diana (por ejemplo, residuos cargados, tales como arg, asp, his, lys y glu) y se remplazan por un aminoácido neutro o cargado negativamente (por ejemplo, alanina o polialanina) para determinar si la interacción del anticuerpo con el antígeno se ve afectada. Se pueden introducir otras sustituciones en las localizaciones de aminoácidos que demuestren sensibilidad funcional a las sustituciones iniciales. De forma alternativa, o adicionalmente, una estructura cristalina de un complejo antígeno-anticuerpo para identificar los puntos de contacto entre el anticuerpo y el antígeno. Dichos residuos de contacto y residuos adyacentes se pueden seleccionar como diana o eliminar como candidatos para la sustitución. Se pueden cribar las variantes para determinar si contienen las propiedades deseadas.

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

65 **b) Variantes de glucosilación**

En determinados modos de realización se altera un anticuerpo de acuerdo con la invención para incrementar o

disminuir el grado en el que el anticuerpo se glucosila. La adición o delección de sitios de glucosilación en un anticuerpo se puede conseguir convenientemente alterando la secuencia de aminoácidos de modo que se cree o elimine uno o más sitios de glucosilación.

Donde el anticuerpo comprende una región Fc, se puede alterar el carbohidrato unido a la misma. Los anticuerpos naturales producidos por células de mamífero típicamente comprenden un oligosacárido biantenarico ramificado que se une, en general, por un enlace N a Asn297 del dominio CH2 de la región Fc. Véase, por ejemplo, Wright, A. y Morrison, S.L., TIBTECH 15 (1997) 26-32. El oligosacárido puede incluir diversos carbohidratos, por ejemplo, manosa, N-acetilglucosamina (GlcNAc), galactosa y ácido siálico, así como una fucosa unida a una GlcNAc en el "tallo" de la estructura del oligosacárido biantenarico. En algunos modos de realización, se pueden realizar modificaciones del oligosacárido en un anticuerpo de acuerdo con la invención para crear variantes de anticuerpo con determinadas propiedades mejoradas.

En un modo de realización, se proporcionan variantes de anticuerpo que tienen una estructura glucídica que carece de fucosa unida (directa o indirectamente) a una región Fc. Por ejemplo, la cantidad de fucosa en dicho anticuerpo puede ser de un 1 % a un 80 %, de un 1 % a un 65 %, de un 5 % a un 65 % o de un 20 % a un 40 %. La cantidad de fucosa se determina calculando la cantidad promedio de fucosa dentro de la cadena glucídica en Asn297, con respecto a la suma de todas las glucoestructuras unidas a Asn297 (por ejemplo, estructuras complejas, híbridas y de alto contenido en manosa) como se mide por espectrometría de masas MALDI-TOF, como se describe, por ejemplo, en el documento WO 2008/077546. Asn297 se refiere al residuo de asparagina localizado en aproximadamente la posición 297 en la región Fc (numeración EU de los residuos de la región Fc de acuerdo con Kabat); sin embargo, la Asn297 también se puede localizar aproximadamente ± 3 aminoácidos en dirección 5' o en dirección 3' de la posición 297, es decir, entre las posiciones 294 y 300, debido a pequeñas variaciones de secuencia en los anticuerpos. Dichas variantes de fucosilación pueden tener una función de CCDA mejorada. Véanse, por ejemplo, los documentos US 2003/0157108 y US 2004/0093621. Los ejemplos de publicaciones relacionadas con variantes de anticuerpos "desfucosilados" o "carentes de fucosa" incluyen: los documentos US 2003/0157108; WO 2000/61739; WO 2001/29246; US 2003/0115614; US 2002/0164328; US 2004/0093621; US 2004/0132140; US 2004/0110704; US 2004/0110282; US 2004/0109865; WO 2003/085119; WO 2003/084570; WO 2005/035586; WO 2005/035778; WO 2005/053742; WO 2002/031140; Okazaki, A. y cols., J. Mol. Biol. 336 (2004) 1239-1249; Yamane-Ohnuki, N. y cols., Biotech. Bioeng. 87 (2004) 614-622. Los ejemplos de líneas celulares que pueden producir anticuerpos desfucosilados incluyen células CHO Lec13 carentes de fucosilación de proteínas (Ripka, J. y cols., Arch. Biochem. Biophys. 249 [1986] 533-545; el documento US 2003/0157108; y el documento WO 2004/056312, especialmente en el ejemplo 11) y líneas celulares con desactivación génica, tales como el gen de la alfa-1,6-fucosiltransferasa, *FUT8*, células CHO con desactivación génica (véase, por ejemplo, Yamane-Ohnuki, N. y cols., Biotech. Bioeng., 87 [2004] 614-622; Kanda, Y. y cols., Biotechnol. Bioeng. 94 [2006] 680-688; y el documento WO 2003/085107).

Las variantes de anticuerpos están provistas además de oligosacáridos bisegmentados, por ejemplo, en las que un oligosacárido biantenarico unido a la región Fc del anticuerpo está bisegmentado por GlcNAc. Dichas variantes de anticuerpo pueden tener una fucosilación reducida y/o función CCDA mejorada. Se describen ejemplos de dichas variantes de anticuerpos, por ejemplo, en los documentos WO 2003/011878; US 6.602.684; y US 2005/0123546. También se proporcionan variantes de anticuerpos con al menos un residuo de galactosa en el oligosacárido unido a la región Fc. Dichas variantes de anticuerpos pueden tener una función CDC mejorada. Dichas variantes de anticuerpos se describen, por ejemplo, en los documentos WO 1997/30087; WO 1998/58964; y WO 1999/22764.

c) Variantes de la región Fc

En determinados modos de realización se pueden introducir una o más modificaciones de aminoácidos en la región Fc de un anticuerpo de acuerdo con la invención, generando de este modo una variante de la región Fc. La variante de la región Fc puede comprender una secuencia de la región Fc humana (por ejemplo, una región Fc de la IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 humana) que comprende una modificación de aminoácidos (por ejemplo, una sustitución) en una o más posiciones de aminoácido.

En determinados modos de realización, de acuerdo con la invención se proporciona una variante de anticuerpo que posee algunas, pero no todas, las funciones efectoras, que lo convierten en un candidato deseable para aplicaciones en las que la semivida del anticuerpo *in vivo* sea importante, aunque determinadas funciones efectoras (tales como el complemento y la CCDA) sean innecesarias o perjudiciales. Se pueden llevar a cabo ensayos de citotoxicidad *in vitro* y/o *in vivo* para confirmar la reducción/disminución de las actividades CDC y/o CCDA. Por ejemplo, se pueden llevar a cabo ensayos de unión al receptor Fc (FcR) para garantizar que el anticuerpo carezca de unión a FcγR (por consiguiente que probablemente carezca de actividad CCDA), pero conserve su capacidad de unión a FcRn. Las principales células mediadoras de la CCDA, los linfocitos NK, expresan solamente FcR1, mientras que los monocitos expresan FcγRI, FcγRII y FcγRIII. La expresión del FcR en células hematopoyéticas se resume en la tabla 3 en la página 464 de Ravetch, J.V. y Kinet, J.P., Annu. Rev. Immunol. 9 (1991) 457-492. Los ejemplos no limitantes de ensayos *in vitro* para evaluar la actividad de CCDA de una molécula de interés se describen en el documento US 5.500.362 (véase, por ejemplo, Hellstrom, I. y cols., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83 [1986] 7059-7063; y Hellstrom, I. y cols., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82 [1985] 1499-1502); el documento US 5.821.337 (véase Bruggemann, M. y cols., J. Exp. Med. 166 [1987] 1351-1361). De forma alternativa, se pueden emplear

procedimientos de ensayo no radioactivo (véase, por ejemplo, el ensayo de citotoxicidad no radioactivo ACTI™ para citometría de flujo [CellTechnology, Inc. Mountain View, CA]; y el ensayo de citotoxicidad no radioactivo CytoTox 96® [Promega, Madison, WI]). Las células efectoras útiles para dichos ensayos incluyen células mononucleares de sangre periférica (CMSP) y linfocitos citolíticos naturales (NK). De forma alternativa, o adicional, se puede evaluar *in vivo* la actividad CCDA de la molécula de interés, por ejemplo, en un modelo animal tal como el divulgado en Clynes, R. y cols. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95 (1998) 652-656. También se pueden llevar a cabo ensayos de unión a C1q para confirmar que el anticuerpo no se puede unir a C1q y, por consiguiente que carezca de actividad CDC. Véase, por ejemplo, ELISA de unión a C1q y C3c en los documentos WO 2006/029879 y WO 2005/100402. Para evaluar la activación del complemento, se puede realizar un ensayo de CDC (véanse, por ejemplo, Gazzano-Santoro, H. y cols., J. Immunol. Methods 202 [1996] 163-171; Cragg, M.S. y cols., Blood 101 [2003] 1045-1052; y Cragg, M.S. y M.J. Glennie, Blood 103 [2004] 2738-2743). También se pueden realizar la unión al FcRn y las determinaciones de la eliminación/semivida *in vivo* usando procedimientos conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Petkova, S.B. Y cols., Int. Immunol. 18 [2006] 1759-1769).

Los anticuerpos con una función efectora reducida incluyen aquellos con una sustitución de uno o más de los residuos de la región Fc 238, 265, 269, 270, 297, 327 y 329 (documento US 6.737.056). Dichos mutantes de Fc incluyen mutantes de Fc con sustituciones en dos o más de las posiciones aminoacídicas 265, 269, 270, 297 y 327, incluyendo el llamado mutante de Fc "DANA" con la sustitución de los residuos 265 y 297 por alanina (documento US 7.332.581).

Se describen determinadas variantes de anticuerpo con unión mejorada o reducida a los FcR. (Véanse, por ejemplo, los documentos US 6.737.056, WO 2004/056312, y Shields, R.L. y cols., J. Biol. Chem. 276 [2001] 6591-6604).

En determinados modos de realización, una variante de anticuerpo comprende una región Fc con una o más sustituciones aminoacídicas que mejoran la CCDA, por ejemplo, sustituciones en las posiciones 298, 333 y/o 334 de la región Fc (numeración EU de residuos).

En algunos modos de realización, se hacen alteraciones en la región Fc, que dan como resultado una unión a C1q y/o una citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) alteradas (es decir, mejoradas o disminuidas), por ejemplo, como se describe en los documentos US 6.194.551, WO 99/51642 e Idusogie, E.E. y cols., J. Immunol. 164 (2000) 4178-4184.

En el documento US 2005/0014934 se describen anticuerpos con semividas incrementadas y unión mejorada al receptor Fc neonatal (FcRn), que es responsable de la transferencia de las IgG maternas al feto (Guyer, R.L. y cols., J. Immunol. 117 [1976] 587-593, y Kim, J.K. y cols., J. Immunol. 24 [1994] 2429-2434). Esos anticuerpos comprenden una región Fc con una o más sustituciones en la misma que mejoran la unión de la región Fc al FcRn. Dichas variantes de Fc incluyen aquellas con sustituciones en uno o más de los residuos de la región Fc: 238, 256, 265, 272, 286, 303, 305, 307, 311, 312, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 382, 413, 424 o 434, por ejemplo, sustitución del residuo 434 de la región Fc (documento US 7.371.826).

Véase también Duncan, A.R. y Winter, G., Nature 322 (1988) 738-740; documentos US 5.648.260; US 5.624.821; y el documento WO 94/29351 con respecto a otros ejemplos de variantes de la región Fc.

d) Variantes de anticuerpos genomanipulados con cisteína

En determinados modos de realización puede ser deseable crear anticuerpos genomanipulados con cisteína, por ejemplo, "thioMAb", en los que uno o más residuos de un anticuerpo se sustituyen por residuos de cisteína. En determinados modos de realización, los residuos sustituidos se producen en sitios accesibles del anticuerpo. Sustituyendo esos residuos con cisteína, los grupos tiol reactivos se sitúan de este modo en sitios accesibles del anticuerpo y se pueden usar para conjugar el anticuerpo a otros restos, tales como restos de fármacos o restos de conector-fármaco, para crear un inmunoconjugado, como se describe adicionalmente en el presente documento. En determinados modos de realización se puede sustituir uno cualquiera o más de los siguientes residuos por cisteína: V205 (numeración de Kabat) de la cadena ligera; A118 (numeración EU) de la cadena pesada; y S400 (numeración EU) de la región Fc de la cadena pesada. Se pueden generar anticuerpos genomanipulados con cisteína como se describe, por ejemplo, en el documento US 7.521.541.

e) Derivados de anticuerpos

En determinados modos de realización, un anticuerpo de acuerdo con la invención se puede modificar adicionalmente para que contenga restos no proteínicos adicionales que se conocen en la técnica y están fácilmente disponibles. Los restos adecuados para la derivatización del anticuerpo incluyen, pero no se limitan a, polímeros hidrosolubles. Los ejemplos no limitantes de polímeros hidrosolubles incluyen, pero no se limitan a, polietilenglicol (PEG), copolímeros de etilenglicol/propilenglicol, carboximetilcelulosa, dextrano, poli(alcohol vinílico), polivinilpirrolidona, poli-1,3-dioxolano, poli-3,6-trioxano, copolímero de etileno/anhídrido maleico, poliaminoácidos (homopolímeros o bien copolímeros aleatorios) y dextrano o poli(n-vinilpirrolidona)polietilenglicol, homopolímeros de propilenglicol, copolímeros de óxido de polipropileno/óxido de etileno, polioles polioxiethylados (por ejemplo,

glicerol), poli(alcohol vínflico) y mezclas de los mismos. El polietilenglicol-propionaldehído puede tener ventajas en la fabricación debido a su estabilidad en agua. El polímero puede ser de cualquier peso molecular y puede estar ramificado o no ramificado. El número de polímeros unidos al anticuerpo puede variar y, si se une más de un polímero, pueden ser moléculas iguales o diferentes. En general, se pueden determinar el número y/o el tipo de polímeros usados para la derivatización basándose en consideraciones que incluyen, pero no se limitan a, las propiedades o funciones concretas del anticuerpo que se va a mejorar, si el derivado del anticuerpo se usará en un tratamiento en condiciones definidas, etc.

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

B. Procedimientos y composiciones recombinantes

Los anticuerpos de acuerdo con la invención se pueden producir usando procedimientos y composiciones recombinantes, por ejemplo, como se describe en el documento US 4.816.567. Un ácido nucleico aislado que codifica un anticuerpo anti-CD19 humano de acuerdo con la invención puede codificar una secuencia de aminoácidos que comprende el VL y/o una secuencia de aminoácidos que comprende el VH del anticuerpo (por ejemplo, las cadenas ligera y/o pesada del anticuerpo). Se pueden proporcionar uno o más vectores (por ejemplo, vectores de expresión) que comprenden dicho ácido nucleico. Se puede proporcionar una célula huésped que comprende dicho ácido nucleico. Una célula huésped comprende (por ejemplo, se ha transformado con): (1) un vector que comprende un ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos que comprende el VL del anticuerpo y una secuencia de aminoácidos que comprende el VH del anticuerpo, o (2) un primer vector que comprende un ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos que comprende el VL del anticuerpo y un segundo vector que comprende un ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos que comprende el VH del anticuerpo. La célula huésped es eucariota, por ejemplo, una célula de ovario de hámster chino (CHO) o una célula linfática (por ejemplo, célula YO, NSO, Sp20). Se divulga un procedimiento de elaboración de un anticuerpo anti-CD19 humano, en el que el procedimiento comprende cultivar una célula huésped que comprende un ácido nucleico que codifica el anticuerpo, como se proporciona anteriormente, en condiciones adecuadas para la expresión del anticuerpo y, opcionalmente, recuperar el anticuerpo de la célula huésped (o del medio de cultivo de células huésped).

Para la producción recombinante de un anticuerpo anti-CD19 humano, el ácido nucleico que codifica un anticuerpo, por ejemplo, como se describe anteriormente, se aísla e inserta en uno o más vectores para su clonación y/o expresión posterior en una célula huésped. Dicho ácido nucleico se puede aislar y secuenciar fácilmente usando procedimientos convencionales (por ejemplo, usando sondas de oligonucleótidos que se pueden unir específicamente a genes que codifican las cadenas pesada y ligera del anticuerpo).

Las células huésped adecuadas para la clonación o la expresión de vectores que codifican el anticuerpo incluyen las células procariotas o eucariotas descritas en el presente documento. Por ejemplo, se pueden producir anticuerpos en bacterias, en particular, cuando no se necesitan glucosilación ni la función efectora por Fc. Para la expresión de los fragmentos de anticuerpo y polipéptidos en bacterias, véanse, por ejemplo, los documentos US 5.648.237, US 5.789.199 y US 5.840.523. (Véase también Charlton, K.A., en: Methods in Molecular Biology, Vol. 248, Lo, B.K.C. [ed.], Humana Press, Totowa, NJ [2003], pp. 245-254, que describe la expresión de fragmentos de anticuerpo en *E. coli*). Después de su expresión, se puede aislar el anticuerpo de la pasta de células bacterianas en una fracción soluble y se puede purificar adicionalmente.

Además de los procariotas, los microbios eucariotas, tales como los hongos filamentosos y levaduras, son huéspedes de clonación o expresión adecuados para vectores que codifican anticuerpos, incluyendo cepas de hongos y levaduras cuyas vías de glucosilación se han "humanizado", lo que da como resultado la producción de un anticuerpo con un patrón de glucosilación parcial o completamente humano. Véanse Gerngross, T.U., Nat. Biotech. 22 (2004) 1409-1414; y Li, H. y cols., Nat. Biotech. 24 (2006) 210-215.

Las células huésped adecuadas para la expresión de anticuerpos glucosilados también se derivan de organismos pluricelulares (invertebrados y vertebrados). Ejemplos de células de invertebrado incluyen células vegetales y de insecto. Se han identificado numerosas cepas de baculovirus, que se pueden usar conjuntamente con células de insecto, en particular para la transfección de células de *Spodoptera frugiperda*.

También se pueden usar cultivos de células vegetales como huéspedes. Véanse, por ejemplo, los documentos US 5.959.177, US 6.040.498, US 6.420.548, US 7.125.978 y US 6.417.429 (que describen la tecnología PLANTIBODIES™ para producir anticuerpos en plantas transgénicas).

También se pueden usar células de vertebrados como huéspedes. Por ejemplo, pueden ser útiles líneas de células

de mamífero que se adapten a su cultivo en suspensión. Otros ejemplos de líneas celulares huésped de mamífero útiles son línea CV1 de riñón de mono transformada por SV40 (COS-7); línea de riñón embrionario humano (células HEK 293 o 293 como se describe, por ejemplo, en Graham, F.L. y cols., J. Gen Virol. 36 [1977] 59-74); células de riñón de cría de hámster (BHK); células de Sertoli de ratón (células TM4 como se describe, por ejemplo, en Mather, J.P., Biol. Reprod. 23 [1980] 243-252); células de riñón de mono (CV1); células de riñón de mono verde africano (VERO-76); células de carcinoma de cuello uterino humano (HELA); células de riñón canino (MDCK); células de hígado de rata búfalo (BRL 3A); células de pulmón humano (W138); células de hígado humano (Hep G2); células de tumor mamario de ratón (MMT 060562); células TRI, como se describe, por ejemplo, en Mather, J.P. y cols., Annals N.Y. Acad. Sci. 383 (1982) 44-68; células MRC 5; y células FS4. Otras líneas de células huésped de mamífero útiles incluyen células de ovario de hámster chino (CHO), incluyendo células CHO DHFR⁻ (Urlaub, G. y cols., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77 [1980] 4216-4220); y líneas celulares de mieloma, tales como Y0, NS0 y Sp2/0. Para una revisión de determinadas líneas de células huésped de mamífero adecuadas para la producción de anticuerpos, véase, por ejemplo, Yazaki, P. y Wu, A.M., Methods in Molecular Biology, Vol. 248, Lo, B.K.C. (ed.), Humana Press, Totowa, NJ (2004), págs. 255-268.

C. Ensayos

Los anticuerpos anti-CD19 humano se pueden identificar, cribar para determinar o caracterizar para determinar sus propiedades físicas/químicas y/o actividades biológicas por diversos ensayos conocidos en la técnica.

1. Ensayos de unión y otros ensayos

Un anticuerpo de acuerdo con la invención se somete a prueba para determinar su actividad de unión a antígeno, por ejemplo, mediante procedimientos conocidos, tales como ELISA, inmunoelectrotransferencia, etc.

2. Ensayos de actividad

Se divulgan ensayos para identificar anticuerpos anti-CD19 humano de los mismos que tienen actividad biológica. La actividad biológica puede incluir, por ejemplo, inhibición de la proliferación de linfocitos B o destrucción de linfocitos B. También se proporcionan anticuerpos que tienen dicha actividad biológica *in vivo* y/o *in vitro*.

Un anticuerpo de acuerdo con la invención se somete a prueba para determinar dicha actividad biológica.

D. Inmunoconjugados

En el presente documento también se proporcionan inmunoconjugados que comprenden un anticuerpo anti-CD19 humano de acuerdo con la invención conjugado a uno o más agentes citotóxicos, tales como agentes o fármacos quimioterápicos, agentes inhibidores del crecimiento, toxinas (por ejemplo, toxinas proteicas, toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal o fragmentos de las mismas) o isótopos radioactivos.

En un modo de realización, un inmunoconjugado es un conjugado anticuerpo-fármaco (ADC) en el que un anticuerpo está conjugado a uno o más fármacos, incluyendo, pero sin limitarse a, un maitansinoide (véanse los documentos US 5.208.020, US 5.416.064 y EP 0 425 235 B1); una auristatina tal como restos del fármaco monometil auristatina DE y DF (MMAE y MMAF; véanse los documentos US 5.635.483, US 5.780.588 y US 7.498.298); una dolastatina; una caliqueamicina o un derivado de la misma (véanse los documentos US 5.712.374, US 5.714.586, US 5.739.116, US 5.767.285, US 5.770.701, US 5.770.710, US 5.773.001 y US 5.877.296; Hinman, L.M. y cols., Cancer Res. 53 [1993] 3336-3342; y Lode, H.N. y cols., Cancer Res. 58 [1998] 2925-2928); una antraciclina tal como daunomicina o doxorubicina (véase Kratz, F. y cols., Curr. Med. Chem. 13 [2006] 477-523; Jeffrey, S.C. y cols., Bioorg. Med. Chem. Lett. 16 [2006] 358-362; Torgov, M.Y. y cols., Bioconjug. Chem. 16 [2005] 717-721; Nagy, A. y cols., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97 [2000] 829-834; Dubowchik, G.M. y cols., Bioorg. & Med. Chem. Letters 12 [2002] 1529-1532; King, H.D. y cols., J. Med. Chem. 45 [2002] 4336-4343; y el documento US 6.630.579); metotrexato; vindesina; un taxano tal como docetaxel, paclitaxel, larotaxel, tesetaxel y ortataxel; un tricoteceno; y CC1065.

En otro modo de realización, un inmunoconjugado comprende un anticuerpo de acuerdo con la invención conjugado a una toxina enzimáticamente activa o fragmento de la misma, que incluye, pero sin limitarse a, la cadena A de difteria, fragmentos activos que no se unen de la toxina diftérica, la cadena A de exotoxina (de *Pseudomonas aeruginosa*), la cadena A de ricina, la cadena A de abrina, la cadena A de modeccina, alfa-sarcina, proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas de diantina, proteínas de *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII y PAP-S), inhibidor de *Momordica charantia*, curcina, crotina, inhibidor de *Saponaria officinalis*, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina y los tricotecenos.

En otro modo de realización, un inmunoconjugado comprende un anticuerpo de acuerdo con la invención conjugado con un átomo radioactivo para formar un radioconjugado. Una variedad de isótopos radioactivos está disponible para la producción de radioconjugados. Los ejemplos incluyen ²¹¹At, ¹³¹I, ¹²⁵I, ⁹⁰Y, ¹⁸⁶Re, ¹⁸⁸Re, ¹⁵³Sm, ²¹²Bi, ³²P, ²¹²Pb e

isótopos radioactivos de Lu. Cuando se usa el radioconjugado para la detección, puede comprender un átomo radioactivo para estudios gammagráficos, por ejemplo, ^{99m}Tc o ^{123}I , o un marcador de espín para resonancia magnética nuclear (RMN) (también conocida como resonancia magnética, RM), tal como yodo-123 de nuevo, yodo-131, indio-111, flúor-19, carbono-13, nitrógeno-15, oxígeno-17, gadolinio, manganeso o hierro.

Se pueden preparar conjugados de un anticuerpo y un agente citotóxico usando una variedad de agentes de acoplamiento de proteínas bifuncionales, tales como 3-(2-piridilditio)propionato de N-succinimidilo (SPDP), 4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato de succinimidilo (SMCC), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como adipimidato de dimetilo HCl), ésteres activos (tales como suberato de disuccinimidilo), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos bis-azídicos (tales como bis(p-azidobenzoyl)hexanodiamina), derivados bis-diazónicos (tales como bis-(p-diazoniobenzoyl)-etilendiamina), diisocianatos (tales como 2,6-diisocianato de tolueno) y compuestos de flúor bis-activos (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzoceno). Por ejemplo, se puede preparar una inmunotoxina de ricina como se describe en Vitetta, E.S. y cols., Science 238 (1987) 1098-1104. El ácido 1-isotiocianatobencil-3-metildietilentríaminopentaacético (MX-DTPA) marcado con carbono 14 es un agente quelante ejemplar para la conjugación del radionúclido al anticuerpo. Véase el documento WO 94/11026. El conector puede ser un "conector escindible" que facilite la liberación de un fármaco citotóxico en la célula. Por ejemplo, se puede usar un conector lábil en ácido, un conector sensible a peptidasa, un conector fotolábil, un conector de dimetilo o un conector que contiene disulfuro (Chari, R.V. y cols., Cancer Res. 52 [1992] 127-131; documento US 5.208.020).

Los inmunoconjugados o ADC de acuerdo con la invención contemplan expresamente, pero no se limitan a, dichos conjugados preparados con reactivos de reticulación, incluyendo, pero sin limitarse a, BMPs, EMCS, GMBS, HBVS, LC-SMCC, MBS, MPBH, SBAP, SIA, SIAB, SMCC, SMPB, SMPH, sulfo-EMCS, sulfo-GMBS, sulfo-KMUS, sulfo-MBS, sulfo-SIAB, sulfo-SMCC y sulfo-SMPB, y SVSB ((4-vinilsulfona)benzoato de succinimidilo), que están disponibles comercialmente (por ejemplo, de Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL., EE. UU.).

E. Procedimientos y composiciones para diagnóstico y detección

En determinados modos de realización, cualquiera de los anticuerpos anti-CD19 humano de acuerdo con la invención es útil para detectar la presencia de células presentadoras de CD19 humano en una muestra biológica. El término "detectar" como se usa en el presente documento engloba la detección cuantitativa o cualitativa. En determinados modos de realización, una muestra biológica comprende una célula o tejido, tal como, por ejemplo, sangre, suero sanguíneo o plasma sanguíneo.

En un modo de realización se proporciona un anticuerpo anti-CD19 humano para su uso en un procedimiento de diagnóstico o detección. En otro aspecto, se proporciona un procedimiento de detección de la presencia de células presentadoras de CD19 humano en una muestra biológica. En determinados modos de realización, el procedimiento comprende poner en contacto la muestra biológica con un anticuerpo anti-CD19 humano de acuerdo con la invención en condiciones que permitan la unión del anticuerpo anti-CD19 humano al CD19 humano, y detectar si se forma un complejo entre el anticuerpo anti-CD19 humano y el CD19 humano. Dicho procedimiento puede ser un procedimiento *in vitro* o *in vivo*. En un modo de realización se usa un anticuerpo anti-CD19 humano para seleccionar sujetos elegibles para su tratamiento con un anticuerpo anti-CD19 humano, por ejemplo, cuando el CD19 humano es un biomarcador para la selección de pacientes.

Los trastornos ejemplares que se pueden diagnosticar usando un anticuerpo de acuerdo con la invención incluyen cánceres de linfocitos B, tales como linfoma de linfocitos B y leucemias de linfocitos B, excepto el mieloma múltiple, por ejemplo, linfoma no Hodgki y leucemia linfocítica aguda.

En determinados modos de realización se proporcionan anticuerpos anti-CD19 humano marcados. Los marcadores incluyen, pero no se limitan a, marcadores o restos que se detectan directamente (tales como marcadores fluorescentes, cromóforos, electrodenso, quimioluminiscentes y radioactivos), así como restos, tales como enzimas o ligandos, que se detectan indirectamente, por ejemplo, a través de una reacción enzimática o interacción molecular. Los marcadores ejemplares incluyen, pero no se limitan a, los radioisótopos ^{32}P , ^{14}C , ^{125}I , ^3H y ^{131}I , fluoróforos tales como quelatos de tierras raras o fluoresceína y sus derivados, rodamina y sus derivados, dansilo, umbeliferona, luciferasas, por ejemplo, luciferasa de luciérnaga y luciferasa bacteriana (documento US 4.737.456), luciferina, 2,3-dihidroftalazindionas, peroxidasa de rábano picante (HRP), fosfatasa alcalina, β -galactosidasa, glucoamilasa, lisozima, oxidasas de sacáridos, por ejemplo, glucosa oxidasa, galactosa oxidasa y glucosa 6-fosfato deshidrogenasa, oxidasas heterocíclicas tales como uricasa y xantina oxidasa, acopladas con una enzima que emplea peróxido de hidrógeno para oxidar un precursor de tinte tal como HRP, lactoperoxidasa o microperoxidasa, biotina/avidina, marcadores de espín, marcadores de bacteriófagos, radicales libres estables y similares.

F. Formulaciones farmacéuticas

Las formulaciones farmacéuticas de un anticuerpo anti-CD19 humano de acuerdo con la invención se preparan mezclando dicho anticuerpo que tiene el grado deseado de pureza con uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables opcionales (Remington's Pharmaceutical Sciences 16.^a edición, Osol, A. Ed. [1980]), en forma de

formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. Los vehículos farmacéuticamente aceptables son, en general, atóxicos para los receptores a las dosis y concentraciones empleadas, e incluyen, pero no se limitan a: tampones tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes incluyendo ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbencilamonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio, 5 cloruro de bencetonio; fenol, alcohol butílico o bencílico; alquilparabenos tales como metil o propilparabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 residuos); proteínas tales como seroalbúmina, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos incluyendo glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; glúcidos tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones formadores de sales tales como sodio; complejos metálicos (por ejemplo, complejos Zn-proteína); y/o tensioactivos no iónicos tales como polietilenglicol (PEG). Los vehículos farmacéuticamente aceptables ejemplares en el presente documento incluyen además, agentes de dispersión intersticial del fármaco tales como glucoproteínas de hialuronidasa activa a pH neutro soluble (sHASEGP), por ejemplo, glucoproteínas de hialuronidasa PH-20 soluble humana, tales como 10 rhuPH20 (HYLENEX®, Baxter International, Inc.). Determinadas sHASEGP ejemplares y procedimientos de uso, incluyendo rhuPH20, se describen en los documentos US 2005/0260186 y US 2006/0104968. En un aspecto, una sHASEGP se combina con una o más glucosaminoglucanasas adicionales, tales como condroitinasas.

Las formulaciones de anticuerpo liofilizadas ejemplares se describen en el documento US 6.267.958. Las formulaciones de anticuerpo acuosas incluyen las descritas en los documentos US 6.171.586 y WO 2006/044908, incluyendo las últimas formulaciones un tampón histidina-acetato.

La formulación en el presente documento también puede contener más de un ingrediente activo, según sea necesario, para la indicación concreta que se está tratando, preferentemente aquellos con actividades complementarias que no se vean afectadas de forma adversa entre sí. Dichos ingredientes activos están presentes adecuadamente en combinación en cantidades que sean eficaces para el propósito pretendido.

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

Se pueden preparar preparaciones de liberación lenta. Los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación lenta incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el anticuerpo, estando dichas matrices en forma de artículos conformados, por ejemplo, películas o microcápsulas.

Las formulaciones que se van a usar para su administración *in vivo* son, en general, estériles. Se puede conseguir fácilmente la esterilidad, por ejemplo, por filtración a través de membranas de filtración estériles.

G. Composiciones y procedimientos terapéuticos

Cualquiera de los anticuerpos anti-CD19 humano de acuerdo con la invención se puede usar en procedimientos terapéuticos, solo o en combinación, como anticuerpo monoespecífico o como anticuerpo multiespecífico.

El CD19 se expresa en la mayoría de los linfocitos B (marcador universal de linfocitos B) con la excepción de las células madre y las células plasmáticas, y con frecuencia se expresa en la mayoría de las neoplasias malignas humanas de linfocitos B (antígeno asociado a tumores), como el linfoma y las leucemias, excepto mieloma múltiple, 50 por ejemplo, en el linfoma no Hodgkin y en la leucemia linfocítica aguda.

Los anticuerpos biespecíficos que reconocen dos proteínas de la superficie celular en diferentes poblaciones celulares ofrecen la posibilidad de redirigir a las células inmunitarias citotóxicas para la destrucción de las células diana patógenas.

En un aspecto, se proporciona un anticuerpo anti-CD19 humano para su uso como un medicamento. En otros aspectos, se proporciona un anticuerpo anti-CD19 humano para su uso en el tratamiento de un cáncer de linfocitos B. En realizaciones adicionales, en el presente documento se proporciona un anticuerpo anti-CD19 humano para su uso en la disminución de linfocitos B para el tratamiento de artritis reumatoide, lupus, psoriasis, LLC, LNH o LDLBG. 60 Un "individuo" de acuerdo con cualquiera de los modos de realización anteriores es preferentemente un ser humano. El cáncer de linfocitos B es en un modo de realización un linfoma de linfocitos B o una leucemia de linfocitos B. En un modo de realización, el cáncer de linfocitos B es linfoma no Hodgkin o leucemia linfocítica aguda.

En otros aspectos, se proporciona un anticuerpo anti-CD19 humano para su uso en la inmunoterapia del cáncer. En determinados modos de realización, se proporciona un anticuerpo anti-CD19 humano para su uso en un procedimiento de inmunoterapia del cáncer. Un "individuo" de acuerdo con cualquiera de los modos de realización

anteriores es preferentemente un ser humano.

En otro aspecto, en el presente documento se proporcionan formulaciones farmacéuticas que comprenden cualquiera de los anticuerpos anti-CD19 humano de acuerdo con la invención, por ejemplo, para su uso en cualquiera de los procedimientos terapéuticos anteriores. En un modo de realización, una formulación farmacéutica comprende cualquiera de los anticuerpos anti-CD19 humano de acuerdo con la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En otro modo de realización, una formulación farmacéutica comprende cualquiera de los anticuerpos anti-CD19 humano de acuerdo con la invención y al menos un agente terapéutico adicional.

Los anticuerpos de acuerdo con la invención se pueden usar solos o bien en combinación con otros agentes en un tratamiento. Por ejemplo, se puede coadministrar un anticuerpo de acuerdo con la invención con al menos un agente terapéutico adicional.

Dichas politerapias indicadas anteriormente engloban la administración combinada (donde se incluyen dos o más agentes terapéuticos en la misma formulación o en formulaciones separadas) y la administración separada, en cuyo caso, la administración del anticuerpo de acuerdo con la invención se puede producir antes, simultáneamente y/o después de la administración del agente o agentes terapéutico(s) adicional(es). En un modo de realización, la administración del anticuerpo anti-CD19 humano y la administración de un agente terapéutico adicional se produce dentro de aproximadamente un mes, o dentro de aproximadamente una, dos o tres semanas, o dentro de aproximadamente uno, dos, tres, cuatro, cinco o seis días, entre sí.

Un anticuerpo de acuerdo con la invención (y cualquier agente terapéutico adicional) se puede administrar por cualquier medio adecuado, que incluye la administración parenteral, intrapulmonar e intranasal y, si se desea para el tratamiento local, la administración intralesional. Las infusiones parenterales incluyen administración intramuscular, intravenosa, intraarterial, intraperitoneal o subcutánea. La dosificación puede ser por cualquier vía adecuada, por ejemplo, por inyecciones, tales como inyecciones intravenosas o subcutáneas, dependiendo, en parte, de si la administración es breve o prolongada. En el presente documento se contemplan diversas pautas de dosificación que incluyen, pero sin limitarse a, administraciones únicas o múltiples durante diversos momentos, administración con inyección intravenosa rápida y perfusión intermitente.

Los anticuerpos de acuerdo con la invención se formularían, dosificarían y administrarían de manera consecuente con la buena práctica médica. Los factores que se deben tener en consideración en este contexto incluyen el trastorno concreto que se está tratando, el mamífero concreto que se está tratando, la afección clínica del paciente individual, la causa del trastorno, el sitio de administración del agente, el procedimiento de administración, la programación de la administración y otros factores conocidos por los médicos. No es necesario, pero el anticuerpo se formula opcionalmente con uno o más agentes usados actualmente para prevenir o tratar el trastorno en cuestión. La cantidad eficaz de dichos otros agentes depende de la cantidad de anticuerpo presente en la formulación, del tipo de trastorno o tratamiento y de otros factores analizados anteriormente. Estos se usan, en general, en las mismas dosificaciones y por las vías de administración como se describe en el presente documento, o aproximadamente de un 1 a un 99 % de las dosificaciones descritas en el presente documento, o en cualquier dosificación y por cualquier vía que se determine empíricamente/clínicamente que sea apropiada.

Para la prevención o tratamiento de la enfermedad, la dosificación apropiada de un anticuerpo de acuerdo con la invención (cuando se usa solo o en combinación con uno o más de otros agentes terapéuticos adicionales) dependerá del tipo de enfermedad que se va a tratar, del tipo de anticuerpo, de la gravedad y la evolución de la enfermedad, ya sea si el anticuerpo se administra para propósitos preventivos o terapéuticos, del tratamiento previo, de la anamnesis del paciente y de la respuesta al anticuerpo y del criterio del médico especialista. El anticuerpo se administra adecuadamente al paciente de una vez o durante una serie de tratamientos. Dependiendo del tipo y de la gravedad de la enfermedad, de aproximadamente 1 µg/kg a 15 mg/kg (por ejemplo, 0,5 mg/kg-10 mg/kg) de anticuerpo puede ser una dosificación inicial candidata para la administración al paciente, ya sea, por ejemplo, mediante una o más administraciones separadas o mediante perfusión continua. Una dosificación diaria típica podría variar de aproximadamente 1 µg/kg a 100 mg/kg o más, dependiendo de los factores mencionados anteriormente. Para administraciones repetidas durante varios días o más, dependiendo de la afección, en general, se prolongaría el tratamiento hasta que se produjera una supresión deseada de los síntomas de la enfermedad. Una dosificación ejemplar del anticuerpo estaría en el intervalo de aproximadamente 0,05 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg. Por tanto, se pueden administrar al paciente una o más dosis de aproximadamente 0,5 mg/kg, 2,0 mg/kg, 4,0 mg/kg o 10 mg/kg (o cualquier combinación de las mismas). Dichas dosis se pueden administrar intermitentemente, por ejemplo, cada semana o cada tres semanas (por ejemplo, de modo que el paciente reciba de aproximadamente dos a aproximadamente veinte o, por ejemplo, aproximadamente seis dosis del anticuerpo). Se puede administrar una dosis de carga mayor inicial, seguida de una o más dosis menores. Sin embargo, pueden ser útiles otras pautas de dosificación. La progresión de este tratamiento se supervisa fácilmente por técnicas y ensayos convencionales.

En el presente documento se proporciona además el uso de un anticuerpo de acuerdo con la invención para el tratamiento de una enfermedad inflamatoria, una enfermedad autoinmunitaria, artritis reumatoide, lupus, psoriasis o una enfermedad ósea, y para la fabricación de una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo de acuerdo con invención.

En el presente documento se proporciona además un anticuerpo de acuerdo con la invención para el tratamiento de una enfermedad inflamatoria, una enfermedad autoinmunitaria, artritis reumatoide, lupus, psoriasis o una enfermedad ósea.

Se entiende que se puede llevar a cabo cualquiera de las formulaciones o procedimientos terapéuticos anteriores usando un inmunoconjugado de acuerdo con la invención en lugar de o además de un anticuerpo anti-CD19 humano.

III. Artículos de fabricación

En otro aspecto se proporciona un artículo de fabricación que contiene materiales útiles para el tratamiento, prevención y/o diagnóstico de los trastornos descritos anteriormente. El artículo de fabricación comprende un recipiente y una ficha técnica o prospecto del envase en o asociado con el recipiente. Los recipientes adecuados incluyen, por ejemplo, frascos, viales, jeringuillas, bolsas de solución i.v., etc. Los recipientes se pueden formar a partir de una variedad de materiales, tales como vidrio o plástico. El recipiente contiene una composición que por sí misma o combinada con otra composición es eficaz para tratar, prevenir y/o diagnosticar la afección y que puede tener una vía de acceso estéril (por ejemplo, el recipiente puede ser una bolsa de solución intravenosa o un vial que tenga un tapón perforable por una aguja de inyección hipodérmica). Al menos un agente activo de la composición es un anticuerpo de acuerdo con la invención. La ficha técnica o prospecto del envase indica que la composición se usa para tratar la afección de elección. Además, el artículo de fabricación puede comprender (a) un primer recipiente con una composición contenida en el mismo, en el que la composición comprende un anticuerpo de acuerdo con la invención; y (b) un segundo recipiente con una composición contenida en el mismo, en el que la composición comprende otro agente citotóxico o terapéutico de otro tipo. El artículo de fabricación en este modo de realización puede comprender adicionalmente un prospecto que indica que las composiciones se pueden usar para tratar una afección concreta. De forma alternativa, o adicionalmente, el artículo de fabricación puede comprender además un segundo (o tercer) recipiente que comprenda un tampón farmacéuticamente aceptable, tal como agua bacteriostática para inyectables (BWI), solución salina tamponada con fosfato, solución de Ringer y solución de dextrosa. Puede incluir además otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y del usuario, incluyendo otros tampones, diluyentes, filtros, agujas y jeringuillas.

Se entiende que cualquiera de los artículos de fabricación anteriores puede incluir un inmunoconjugado de acuerdo con la invención en lugar de o además de un anticuerpo anti-CD19 humano.

IV. Descripción del listado de secuencias

SEQ ID NO: 1	dominio variable de la cadena pesada del anticuerpo murino anti-CD19 humano 8B8
SEQ ID NO: 2	dominio variable de la cadena ligera del anticuerpo murino anti-CD19 humano 8B8
SEQ ID NO: 3	HVR-H1 del anticuerpo murino anti-CD19 humano 8B8
SEQ ID NO: 4	HVR-H2 del anticuerpo murino anti-CD19 humano 8B8
SEQ ID NO: 5	HVR-H3 del anticuerpo murino anti-CD19 humano 8B8
SEQ ID NO: 6	HVR-L1 del anticuerpo murino anti-CD19 humano 8B8
SEQ ID NO: 7	HVR-L2 del anticuerpo murino anti-CD19 humano 8B8
SEQ ID NO: 8	HVR-L3 del anticuerpo murino anti-CD19 humano 8B8
SEQ ID NO: 9	dominio variable de la cadena pesada humanizado
SEQ ID NO: 10-28	alternancia de secuencias de la variante del dominio variable de la cadena ligera humanizada y la variante de la HVR-L1 humanizada

V. Nomenclatura de anticuerpos

número de secuencia								
anticuerpo o región variable del anticuerpo	dominio variable de la cadena pesada (VH)	dominio variable de la cadena ligera (VL)	HVR-H1	HVR-H2	HVR-H3	HVR-L1	HVR-L2	HVR-L3
0:wt	1	2	3	4	5	6	7	8
1:N27dH	9	10	3	11	5	12	7	8
2:N27dQ	9	13	3	11	5	14	7	8
3:S27eA	9	15	3	11	5	16	7	8
4:S27eV	9	17	3	11	5	18	7	8
5:S27eP	9	19	3	11	5	20	7	8

número de secuencia								
anticuerpo o región variable del anticuerpo	dominio variable de la cadena pesada (VH)	dominio variable de la cadena ligera (VL)	HVR-H1	HVR-H2	HVR-H3	HVR-L1	HVR-L2	HVR-L3
6:N28Q	9	21	3	11	5	22	7	8
7:G29A	9	23	3	11	5	24	7	8
8:G29V	9	25	3	11	5	26	7	8
9:S27eP N28S	9	27	3	11	5	28	7	8

VI. Ejemplos

Los siguientes son ejemplos de procedimientos y composiciones de la invención. Se entiende que se pueden poner en práctica otros modos de realización diversos, dada la descripción general proporcionada anteriormente.

Aunque la invención precedente se ha descrito con cierto detalle a modo de ilustración y ejemplo para los propósitos de claridad de comprensión, no se deben interpretar las descripciones y ejemplos como limitantes del alcance de la invención.

Ejemplo 1

Inmunización y generación de anticuerpos de ratón anti-CD19 humano (hibridomas)

Se inmunizó seis veces a ratones Balb/c y se aplicó una dosis de refuerzo con células HEK293 transfectadas con CD19 (densidad media de receptores 35.000 por célula). Se controló la respuesta inmunitaria analizando muestras de suero con un ELISA en células de CD19 en células NIH-3T3 transfectadas con CD19 humano. Se usaron células esplénicas de ratones con valores suficientes de anticuerpo anti-CD19 humano para su immortalización por fusión con la línea celular de mieloma de ratón P3X63 Ag8.653. Se llevaron a cabo tres fusiones y se cribaron los sobrenadantes de hibridoma mediante ELISA en células NIH-3T3 transfectadas con CD19 humano y ensayo de unión por FACS usando células Daudi (CD19⁺) y CD19⁻ para determinar los anticuerpos específicos anti-CD19 humano.

Ejemplo 2

Cribado de hibridomas y evaluación funcional biológica celular del anticuerpo anti-CD19

ELISA en células para la detección de anticuerpos contra el CD19h

Se aplicó un ELISA en células para el cribado de hibridomas y para identificar aquellos hibridomas que segregan anticuerpos contra el CD19 humano. Se usaron células NIH3T3 transfectadas con CD19 humano como células positivas; se usaron células NIH3T3 no transfectadas como células de control negativo. Para la evaluación de los hibridomas positivos se cuantificó la proporción de DO entre las células NIH3T3 transfectadas y no transfectadas.

-Medio de cultivo: DMEM con alto contenido de glucosa (4,5 mg/ml), SBF al 10 %, piruvato Na, AANE, glutamina.

-Control positivo de anticuerpos: anticuerpo monoclonal anti-CD19 (IgG1) Pharmingen n.º cat. 555409 c = 1 mg/ml.

-Anticuerpo de detección: anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón (H + L) conjugado con HRP Bio-Rad n.º cat. 170-06516.

-Dilución 1: 2000 en reactivo de bloqueo de ELISA 1x.

-Otros reactivos: fibronectina Roche n.º cat. 838039 c = 1 mg/ml.

-Glutardialdehído: solución madre al 25 % // Calidad de Agar Scientific n.º R102, concentración final: 0,05 % en PBS.

-Reactivo de bloqueo de ELISA: 10x solución madre // Roche n.º cat. 1112589.

-Sustrato TMB: Roche n.º cat. 11432559.

-Solución de paro: H₂SO₄ 1 M

-BioRad n.º cat. 170-6516 Dilución 1: 2000 en 1x reactivo de bloqueo de ELISA.

Día 1:

- Recubrimiento de fibronectina: 5 µg/cm² en PBS; placa de 96 pocillos = 32 cm²; 160 µg/placa en 6 ml.

- PBS, 50 µl/pocillo.

- Incubar 45 min a TA, aspirar la solución de recubrimiento.

- Sembrar 1,25 x 10⁴ células/pocillo en 50 µl de medio de cultivo en una placa de 96 pocillos.

- Incubar 40 horas a 37 °C.

- Agregar a la mitad superior de la placa: células NIH3T3 que expresan CD19.

- Agregar a la mitad inferior de la placa: células NIH3T3 no transfectadas.

Día 3:

- Adición de anticuerpo de control positivo o muestras (sobrenadante o suero de ratón) en 50 µl de medio de cultivo.

- Incubar durante 2 h a 4 °C.

- Eliminar el medio, fijar las células con 100 µl de glutardialdehído (0,05 % en PBS).

- Lavar dos veces con 200 µl de PBS.

- Adición del anticuerpo de detección 1: 2000, 50 µl/pocillo.

- Incubar 2 h a TA.

- Lavar tres veces con 200 µl de PBS.

- Agregar 50 µl de TMB, incubar durante 30 min a TA,

- parar mediante la adición de 25 µl de H₂SO₄ 1 M; leer la extinción a 450 nm/620 nm.

- Cálculo de resultados: proporción de DO NIH3T3 CD19: DO NIH3T3 no transfectadas.

Ejemplo 3

Humanización del anticuerpo anti-CD19

La especificidad de unión a CD19 del anticuerpo murino se transfirió a una región estructural aceptora humana para eliminar potenciales problemas de inmunogenicidad debidos a tramos de secuencia que el cuerpo humano reconocerá como exógenos. Esto se realizó injertando todas las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) del anticuerpo murino (donante) en un región estructural del anticuerpo humano (aceptor), y se denomina injerto de CDR o humanización de anticuerpos.

La secuencia de aminoácidos murina se alineó con una colección de genes V de anticuerpos de la línea germinal humana, y se clasificó de acuerdo con la identidad de secuencia y la homología. Antes de seleccionar una secuencia aceptora concreta, se deben determinar las llamadas estructuras clásicas de bucle del anticuerpo donante (Morea, V. y cols., Methods, Vol 20, n.º 3 [2000] 267-279). Estas estructuras clásicas de bucle están determinadas por el tipo de residuos presentes en las llamadas posiciones clásicas. Estas posiciones se encuentran (parcialmente) fuera de las regiones CDR, y se deben mantener funcionalmente equivalentes en la construcción final para conservar la conformación de las CDR del anticuerpo original (donante). Se eligió la secuencia VBASE_VH1_1 de la línea germinal humana como el aceptor para la cadena pesada y se eligió la secuencia VBASE_VK2_5 para la cadena ligera. Esto dio como resultado el anticuerpo humanizado natural.

Ejemplo 4

Expresión de anticuerpos de unión a CD19

Se generaron secuencias que codifican el dominio variable del anticuerpo mediante síntesis génicas.

Para la introducción de las mutaciones puntuales respectivas se realizó una reacción de cambio rápido basada en un cebador 33mero. Todas las secuencias se verificaron por secuenciación (SequiServe, Vaterstetten, Alemania). Todas las secuencias se clonaron en vectores que permiten la selección y propagación en *E. coli* (origen de replicación del vector pUC18, betalactamasa para resistencia a la ampicilina). Estos vectores contienen adicionalmente casetes que permiten la expresión en células de mamíferos (origen de replicación, oriP, del virus de Epstein-Barr [VEB], el potenciador y promotor temprano inmediato del citomegalovirus humano [CMVH] y una secuencia de poliadenilación).

Todos los segmentos génicos que codifican las cadenas ligeras y pesadas del anticuerpo están precedidos por una secuencia de ADN que codifica un péptido señal (MGWSCILFLVATATGVHS; SEQ ID NO: 29). Las proteínas se expresaron mediante transfección transitoria de células de riñón embrionario humano HEK 293 en suspensión. Estas células se cultivaron a 37 °C y 8 % de CO₂. El día de la transfección, las células se sembraron en medio fresco a una densidad de 1-2 x 10⁶ células viables/ml. Se cotransfectaron cantidades equimolares de ADN plasmídico de la cadena pesada y ligera. Los sobrenadantes del cultivo celular se extrajeron 7 días después de la transfección, se centrifugaron (14.000 x g durante 45 min a 4 °C) y posteriormente se filtraron a través de un filtro de 0,22 µm. Estos sobrenadantes se podían congelar y almacenar a -20 °C antes de su purificación.

Ejemplo 5

Purificación de anticuerpos de unión a CD19

Procedimiento general:

Se carga sobrenadante de fermentación sin células (HEK 293F) en una columna de afinidad de proteína A (MabSelect™ SuRe, GE Healthcare, 8 x 100 mm) equilibrada previamente (solución salina tamponada con fosfato, PBS) con un tiempo de contacto de 5 minutos. Después del lavado (PBS, 5 volúmenes de columna), el anticuerpo se eluye con ácido cítrico/NaOH 25 mM (pH 3,0).

El eluido se ajusta a pH 5,5 con Tris 1 M y se incuba durante la noche a 4 °C. Después de esto se realiza una filtración final (0,45 µm).

Purificación de la variante 5 del anticuerpo anti-CD19 humano (S27eP):

Se cargó sobrenadante de fermentación sin células (244 ml, HEK 293F) en una columna de afinidad de proteína A (MabSelect™ SuRe, GE Healthcare, 8 x 100 mm) equilibrada previamente (solución salina tamponada con fosfato, PBS) con un tiempo de contacto de 5 minutos. Después del lavado (PBS, 5 volúmenes de columna), el anticuerpo se eluyó con ácido cítrico/NaOH 25 mM (pH 3,0). El eluido se ajustó a pH 5,5 con Tris 1 M y se incubó durante la noche a 4 °C. La filtración final (0,45 µm) devolvió 31,1 mg (5,7 ml, 5,45 mg/ml) de producto puro al 99,0 % (SEC).

Purificación de la variante 9 del anticuerpo anti-CD19 humano (S27eP/N28S):

Se cargó sobrenadante de fermentación sin células (260 ml, HEK 293F) en una columna de afinidad de proteína A (MabSelect™ SuRe, GE Healthcare, 8 x 100 mm) equilibrada previamente (PBS) con un tiempo de contacto de 5 minutos. Después del lavado (PBS, 5 volúmenes de columna), la proteína diana se eluyó con ácido cítrico/NaOH 25 mM (pH 3,0). El eluido se ajustó a pH 5,5 con Tris 1 M (pH 9,0) y se incubó durante la noche a 4 °C. La filtración final (0,2 µm) devolvió 9,1 mg (5,2 ml, 1,75 mg/ml) de producto puro al 98,0 % (SEC).

Ejemplo 6

Suministro de células que expresan el DEC del CD19 y unión de los anticuerpos al mismo

Se transfectaron células HEK293 con 1 µl de ADN plasmídico por cada 1,5 x 10⁶ células usando LipofectAmine 2000 y después de esto se incubaron durante 48 horas a 37 °C. Los plásmidos codificaron el dominio extracelular (DEC)

del CD19 humano (PEEPLVVKVE EGDNAVLQCL KGTSDGPTQQ LTWSRESPLK PFLKLSLGLP GLGIHMRPLA IWLFI FNVSQ QMGGFYLCQP GPPSEKAWQP GWTVNVEGSG ELFRWNVSDL GGLGCGLNKR SSEGPPSSPG KLMSPKLYVW AKDRPEIWEG EPPCLPPRDS LNQSLSQDLT MAPGSTLWLS CGVPPDSVSR GPLSWTHVHP KGPKSLLSLE LKDDRPARDM WVMETGLLLP RATAQDAGKY YCHRGNTMS FHLEITARPV LWHWLLRTGG WK SEQ ID NO: 30) o del CD19 de macaco cangrejero (PQEPLVVKVE EGDNAVLQCL EGTSDGPTQQ LVWCRDSPFE PFLNLSLGLP GMGIRMGPLG IWLFI FNVSQ QTGGFYLCQP GLPSEKAWQP GWTVSVEGSG ELFRWNVSDL GGLGCGLNKR SSEGPPSSPG KLNSSQLYVW AKDRPEMWEG EPVCGPPRDS LNQSLSQDLT MAPGSTLWLS CGVPPDSVSR GPLSWTHVRP KGPKSLLSL ELKDDRPDRD MWVVDTGILL TRATAQDAGK YYCHRGNTWK SFYLEITARP ALWHWLLRIG GWKV; SEQ ID NO: 31) fusionado con la secuencia

de anclaje GPI PSCA humana **DTDLCNASGA HALQPAAAIL ALLPALGLLL WGPQQL**; SEQ ID NO: 32) para su presentación extracelular. Las células transfectadas respectivas se lavaron dos veces en tampón FACS (PBS que contiene un 5 % de suero bovino fetal [SBF]) y se suspendieron de nuevo en tampón FACS a una concentración final de 2×10^6 células/ml correspondiente a $5,0 \times 10^4$ células/25 µl/pocillo. La concentración inicial de los anticuerpos se ajustó a 60 µg/ml (concentración final 2x) y a continuación se diluyó en una serie de valoración 1:3 (v/v). El anticuerpo primario se incubó en las células durante una hora a temperatura ambiente, seguido de dos etapas de lavado. Para la detección secundaria, se usó el anticuerpo anti-hulG (H + F) conjugado con Alexa488 a una concentración de 30 µg/ml. El anticuerpo secundario se incubó durante una hora a temperatura ambiente. Posteriormente, las células se lavaron dos veces y se suspendieron de nuevo en 70 µl/pocillo de tampón FACS y se analizaron usando un BD FACS Canto.

Los valores respectivos de ECR₅₀ para el anticuerpo natural humanizado y las variantes 5 (S27eP) y 9 (S27eP/M28S) se muestran en la siguiente tabla.

	wt [µg/ml]	variante 5 [µg/ml]	variante 9 [µg/ml]
DEC CD19 humano	0,087	0,084	0,089
DEC CD19 macaco cangrejero	0,313	0,255	0,435

Ejemplo 7

Espectrometría de masas (LC-MS/MS)

El material del anticuerpo (aproximadamente 80 µg) se desnaturalizó en tampón histidina-HCl 200 mM (pH 6,0) que comprende guanidinio-HCl aproximadamente 7 M, se redujo usando TCEP 10 mM y se cambió el tampón a histidina-HCl 200 mM (pH 6,0) usando columnas de centrifugación Zeba 7K MWCO (Thermo Scientific). Finalmente, el material se digirió con 2,5 µg de tripsina o termolisina (Promega) durante 16 horas a 37 °C. La captura de datos se realizó con una RP-UPLC en gradiente en una columna ACQUITY BEH300 C18 (Waters) usando un sistema de UPLC NanoAcquity (Waters) seguido de MS/MS basado en CID en un espectrómetro de masas Orbitrap Fusion Tribrid (Thermo Scientific) con un TriVersa NanoMate (Advion) como fuente de ionización de nanoelectrospray. Los datos se evaluaron usando Mascot MS/MS Ion Searches (Matrix Science) y el programa informático interno de evaluación de datos de MS Peptide Analyzer (Roche Diagnostics GmbH). La cuantificación se realizó mediante la integración de cromatogramas realizados por intercambio iónico de los péptidos correspondientes.

Resultados:

El nivel de desamidación y formación de succinimida del anticuerpo anti-CD19 humanizado natural (variante 0:wt) tras la incubación a 37 °C durante 2 semanas a pH 7,4 en tampón PBS se muestra en la siguiente tabla (fragmento usado: SSQSLENSNGNTYLNWYLQKPGQSPQLLIYR; SEQ ID NO: 35).

muestra	forma desamidada [%]	formación de succinimida [%]
referencia	~8	0
incubado a 37 °C durante 2 semanas a pH 7,4 en tampón PBS	26-32	0

El nivel de desamidación y formación de succinimida tras la incubación de la variante 5 del anticuerpo anti-CD19 humanizado (S27eP) se muestra en la siguiente tabla (fragmento usado: SSQSLENPNGNTYLNWYLQKPGQSPQLLIYR; SEQ ID NO: 35).

muestra	forma desamidada [%]	formación de succinimida [%]
referencia	2	2
incubado a 37 °C durante 2 semanas a pH 7,4 en tampón PBS	7	0
incubado a 40 °C durante 2 semanas a pH 6,0 en tampón de histidina/NaCl	4	2

El nivel de desamidación y formación de succinimida tras la incubación de la variante 3 del anticuerpo anti-CD19 humanizado (S27eA) se muestra en la siguiente tabla (fragmento usado: SSQSLENGANGNTYLNWYLQKPGQSPQLLIYR; SEQ ID NO: 35).

muestra	forma desamidada [%]	formación de succinimida [%]
referencia	7	2
incubado a 37 °C durante 2 semanas a pH 7,4 en tampón PBS	23	1
incubado a 40 °C durante 2 semanas a pH 6,0 en tampón de histidina/NaCl	13	1

El nivel de desamidación y formación de succinimida tras la incubación de la variante 7 del anticuerpo anti-CD19 humanizado (G29A) se muestra en la siguiente tabla (fragmento usado: SSQSLENSNANTYLNWYLQKPGQSPQLLIYR; SEQ ID NO: 35).

muestra	forma desamidada [%]	formación de succinimida [%]
referencia	8	0
incubado a 37 °C durante 2 semanas a pH 7,4 en tampón PBS	45	0,5
incubado a 40 °C durante 2 semanas a pH 6,0 en tampón de histidina/NaCl	13	0

Ejemplo 8

Determinación de afinidad por CD19

Se usó un ensayo basado en resonancia de plasmón superficial (SPR) para determinar los parámetros cinéticos de la unión entre los anticuerpos anti-CD19 humano y el dominio extracelular del receptor del CD19 humano recombinante.

Protocolo 1:

Para capturar el anticuerpo anti-CD19 humano se usó un fragmento de anticuerpo anti-F(ab)'2 humano como anticuerpo de captura (Jackson Immuno Research; código de pedido: 109-006-006). Del anticuerpo de captura, se inmovilizaron 20 µg/ml en un chip CM5 (GE Healthcare; BR-1005-30) a pH 4,5 usando un kit de acoplamiento de aminas de acuerdo con las instrucciones del fabricante (GE Healthcare). Los tampones de la muestra y de migración fueron HBS-EP+ (GE Healthcare; BR-1006-69). La cubeta de lectura se fijó a 25 °C. El bloque de las muestras se fijó a 12 °C. Ambos se purgaron dos veces con tampón de migración. El anticuerpo anti-CD19 humano se capturó inyectando una solución 35 nM durante 60 s a un caudal de 20 µl/min. Se midió la asociación mediante inyección del DEC del CD19 humano recombinante en diversas concentraciones en solución durante 120 s a un caudal de 50 µl/min, empezando con 900 nM en diluciones 1:3 y cinco concentraciones en total. Se supervisó la fase de disociación durante hasta 600 segundos y se activó cambiando de la solución de muestra al tampón de migración. La superficie se regeneró dos veces mediante lavado durante 60 s y 30 s con una solución de glicina 10 mM (pH 1,5) a un caudal de 30 µl/min. Se corrigieron las diferencias en el índice de refracción aparente restando la respuesta obtenida de una superficie de anticuerpo de cabra anti-F(ab)'2 humano. También se restan las inyecciones del blanco (= doble referencia). Para el cálculo de la KD aparente y otros parámetros cinéticos se usó el modelo 1:1 de Langmuir.

Protocolo 2:

Para capturar el anticuerpo anti-CD19 humano se usó un anticuerpo de captura anti-Fab humano. Primero, 30 µg/ml de anticuerpo de cabra anti-Fab humano (código de pedido: 28958325; GE Healthcare Bio-Sciences AB) se inmovilizaron en un chip CM5 (GE Healthcare; BR-1005-30) a pH 5,0 usando un kit de acoplamiento de aminas (GE Healthcare) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El tampón de la muestra y de migración fue HBS-EP+ (GE Healthcare; BR-1006-69). La cubeta de lectura se fijó a 25 °C. El bloque de las muestras se fijó a 12 °C. Ambos se purgaron dos veces con tampón de migración. El anticuerpo anti-CD19 humano se capturó inyectando una solución 10 nM durante 60 s a un caudal de 10 µl/min. Se midió la asociación mediante inyección del DEC del CD19 humano recombinante durante 90 s a un caudal de 10 µl/min a una concentración de 250 nM. Se supervisó la fase de disociación durante hasta 60 segundos y se activó cambiando de la solución de muestra al tampón de migración. La superficie se regeneró mediante lavado durante 60 s con una solución de glicina 10 mM (pH 2,1) a un caudal de 10 µl/min. Se corrigieron las diferencias en el índice de refracción aparente restando la respuesta de una superficie de blanco.

Cálculo:

- 5 La unión relativa de una muestra es la proporción calculada a partir del nivel de captura y el nivel de unión (UR de unión divididas por UR de captura):

$$unión_rel = \frac{nivel_unión}{nivel_captura}$$

- 10 La concentración activa relativa de la muestra es la proporción de una muestra en comparación con una muestra de referencia:

$$conc_act_rel = \frac{unión_rel_{muestra}}{unión_rel_{referencia}}$$

LISTADO DE SECUENCIAS

- 5 <110> F. Hoffmann-La Roche AG
 <120> ANTICUERPOS HUMANIZADOS ANTI-CD19 HUMANO Y PROCEDIMIENTOS DE USO
 <130> P33094
 10 <150> EP15187820.4
 <151> 01/10/2015
 <160> 70
 15 <170> PatentIn versión 3.5
 <210> 1
 <211> 121
 <212> PRT
 20 <213> *Mus musculus*
 <400> 1

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

- 25 <210> 2
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 30 <400> 2

Asp Ala Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15

ES 2 791 989 T3

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Glu Asn Ser
20 25 30

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

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Val Ser Lys Arg Phe Ser Gly Val Leu
50 55 60

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

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

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

<210> 3
<211> 5
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 3

Asp Tyr Ile Met His
1 5

<210> 4
<211> 17
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 4

Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Ser Lys Tyr Thr Glu Lys Phe Asn
1 5 10 15

Gly

<210> 5
<211> 12
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 5

Gly Thr Tyr Tyr Tyr Gly Ser Ala Leu Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 6
<211> 16
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 6

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Glu Asn Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Asn
1 5 10 15

<210> 7
 <211> 7
 <212> PRT
 5 <213> *Mus musculus*

 <400> 7

 Arg Val Ser Lys Arg Phe Ser
 1 5
 10
 <210> 8
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 15
 <400> 8

 Leu Gln Leu Thr His Val Pro Tyr Thr
 1 5
 20
 <210> 9
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 25
 <220>
 <223> VH humanizado

 <400> 9

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

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

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

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

 Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Ser Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 30 Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

 Ala Arg Gly Thr Tyr Tyr Tyr Gly Ser Ala Leu Phe Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

 Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

 <210> 10
 <211> 112
 35 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> VL N27dH

ES 2 791 989 T3

<400> 10

Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

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

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

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Val Ser Lys Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

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

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

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

5

<210> 11
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10

<220>
<223> HVR-H2 humanizada

<400> 11

15

Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Ser Lys Tyr Thr Glu Lys Phe Gln
1 5 10 15
Gly

20

<210> 12
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

25

<220>
<223> HVR-L1 N27dH

<400> 12

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Glu His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Asn
1 5 10 15

30

<210> 13
<211> 112
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

35

<220>
<223> VL N27dQ

<400> 13

ES 2 791 989 T3

Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Glu Gln Ser
20 25 30

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

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Val Ser Lys Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

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

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

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

<210> 14
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> HVR-L1 N27dQ

<400> 14

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Glu Gln Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Asn
1 5 10 15

<210> 15
<211> 112
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> VH S27eA

<400> 15

ES 2 791 989 T3

Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Glu Asn Ala
20 25 30

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

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Val Ser Lys Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

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

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

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

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

<220>
<223> HVR-L1 S27eA

<400> 16

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Glu Asn Ala Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Asn
1 5 10 15

15 <210> 17
<211> 112
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> VL S27eV

<400> 17

ES 2 791 989 T3

Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Glu Asn Val
20 25 30

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

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Val Ser Lys Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

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

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

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

<210> 18
<211> 16
5 <212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> HVR-L1 S27eV

<400> 18

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Glu Asn Val Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Asn
1 5 10 15

15 <210> 19
<211> 112
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> VL S27eP

<400> 19

Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

ES 2 791 989 T3

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Glu Asn Pro
20 25 30

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

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Val Ser Lys Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

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

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

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

<210> 20
<211> 16
5 <212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
10 <223> HVR-L1 S27eP
<400> 20

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Glu Asn Pro Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Asn
1 5 10 15

15 <210> 21
<211> 112
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> VL N28Q
<400> 21

Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Glu Asn Ser
20 25 30

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

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Val Ser Lys Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

25

ES 2 791 989 T3

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

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

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

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

<220>
<223> HVR-L1 N28Q

<400> 22

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Glu Asn Ser Gln Gly Asn Thr Tyr Leu Asn
1 5 10 15

<210> 23
<211> 112
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> VL G29A

<400> 23

Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Glu Asn Ser
20 25 30

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

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Val Ser Lys Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

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

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

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

<210> 24
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>

ES 2 791 989 T3

<223> HVR-L1 G29A

<400> 24

5 Lys Ser Ser Gln Ser Leu Glu Asn Ser Asn Ala Asn Thr Tyr Leu Asn
1 5 10 15

<210> 25

<211> 112

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> VL G29V

15 <400> 25

Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Glu Asn Ser
20 25 30

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

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Val Ser Lys Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

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

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

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

<210> 26

20 <211> 16

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> HVR-L1 G29V

<400> 26

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Glu Asn Ser Asn Val Asn Thr Tyr Leu Asn
1 5 10 15

30 <210> 27

<211> 112

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

35 <220>

<223> VH S27eP/N28S

<400> 27

ES 2 791 989 T3

Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Glu Asn Pro
20 25 30

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

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Val Ser Lys Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

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

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

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

<210> 28
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> HVR-L1 S27eP/N28S
<400> 28

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Glu Asn Pro Ser Gly Asn Thr Tyr Leu Asn
1 5 10 15

<210> 29
<211> 19
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> péptido señal
<400> 29

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
1 5 10 15

<210> 30
<211> 272
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
<400> 30

ES 2 791 989 T3

Pro Glu Glu Pro Leu Val Val Lys Val Glu Glu Gly Asp Asn Ala Val
1 5 10 15

Leu Gln Cys Leu Lys Gly Thr Ser Asp Gly Pro Thr Gln Gln Leu Thr
20 25 30

Trp Ser Arg Glu Ser Pro Leu Lys Pro Phe Leu Lys Leu Ser Leu Gly
35 40 45

Leu Pro Gly Leu Gly Ile His Met Arg Pro Leu Ala Ile Trp Leu Phe
50 55 60

Ile Phe Asn Val Ser Gln Gln Met Gly Gly Phe Tyr Leu Cys Gln Pro
65 70 75 80

Gly Pro Pro Ser Glu Lys Ala Trp Gln Pro Gly Trp Thr Val Asn Val
85 90 95

Glu Gly Ser Gly Glu Leu Phe Arg Trp Asn Val Ser Asp Leu Gly Gly
100 105 110

Leu Gly Cys Gly Leu Lys Asn Arg Ser Ser Glu Gly Pro Ser Ser Pro
115 120 125

Ser Gly Lys Leu Met Ser Pro Lys Leu Tyr Val Trp Ala Lys Asp Arg
130 135 140

Pro Glu Ile Trp Glu Gly Glu Pro Pro Cys Leu Pro Pro Arg Asp Ser
145 150 155 160

Leu Asn Gln Ser Leu Ser Gln Asp Leu Thr Met Ala Pro Gly Ser Thr
165 170 175

Leu Trp Leu Ser Cys Gly Val Pro Pro Asp Ser Val Ser Arg Gly Pro
180 185 190

Leu Ser Trp Thr His Val His Pro Lys Gly Pro Lys Ser Leu Leu Ser
195 200 205

Leu Glu Leu Lys Asp Asp Arg Pro Ala Arg Asp Met Trp Val Met Glu
210 215 220

Thr Gly Leu Leu Leu Pro Arg Ala Thr Ala Gln Asp Ala Gly Lys Tyr
225 230 235 240

Tyr Cys His Arg Gly Asn Leu Thr Met Ser Phe His Leu Glu Ile Thr
245 250 255

Ala Arg Pro Val Leu Trp His Trp Leu Leu Arg Thr Gly Gly Trp Lys
260 265 270

<210> 31
<211> 274
<212> PRT
<213> *Macaca fascicularis*

ES 2 791 989 T3

<400> 31

```

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

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

Trp Cys Arg Asp Ser Pro Phe Glu Pro Phe Leu Asn Leu Ser Leu Gly
          35          40          45

Leu Pro Gly Met Gly Ile Arg Met Gly Pro Leu Gly Ile Trp Leu Leu
          50          55          60

Ile Phe Asn Val Ser Asn Gln Thr Gly Gly Phe Tyr Leu Cys Gln Pro
65          70          75          80

Gly Leu Pro Ser Glu Lys Ala Trp Gln Pro Gly Trp Thr Val Ser Val
          85          90          95

Glu Gly Ser Gly Glu Leu Phe Arg Trp Asn Val Ser Asp Leu Gly Gly
          100          105          110

Leu Gly Cys Gly Leu Lys Asn Arg Ser Ser Glu Gly Pro Ser Ser Pro
          115          120          125
Ser Gly Lys Leu Asn Ser Ser Gln Leu Tyr Val Trp Ala Lys Asp Arg
          130          135          140

Pro Glu Met Trp Glu Gly Glu Pro Val Cys Gly Pro Pro Arg Asp Ser
145          150          155          160

Leu Asn Gln Ser Leu Ser Gln Asp Leu Thr Met Ala Pro Gly Ser Thr
          165          170          175

Leu Trp Leu Ser Cys Gly Val Pro Pro Asp Ser Val Ser Arg Gly Pro
          180          185          190

Leu Ser Trp Thr His Val Arg Pro Lys Gly Pro Lys Ser Ser Leu Leu
          195          200          205

Ser Leu Glu Leu Lys Asp Asp Arg Pro Asp Arg Asp Met Trp Val Val
          210          215          220

Asp Thr Gly Leu Leu Leu Thr Arg Ala Thr Ala Gln Asp Ala Gly Lys
225          230          235          240

Tyr Tyr Cys His Arg Gly Asn Trp Thr Lys Ser Phe Tyr Leu Glu Ile
          245          250          255

Thr Ala Arg Pro Ala Leu Trp His Trp Leu Leu Arg Ile Gly Gly Trp
          260          265          270
Lys Val

```

ES 2 791 989 T3

<210> 32
 <211> 36
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 32

Asp Thr Asp Leu Cys Asn Ala Ser Gly Ala His Ala Leu Gln Pro Ala
 1 5 10 15

Ala Ala Ile Leu Ala Leu Leu Pro Ala Leu Gly Leu Leu Leu Trp Gly
 20 25 30

Pro Gly Gln Leu
 35

10

<210> 33
 <211> 537
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

15

<400> 33

ES 2 791 989 T3

Pro Glu Glu Pro Leu Val Val Lys Val Glu Glu Gly Asp Asn Ala Val
 1 5 10 15
 Leu Gln Cys Leu Lys Gly Thr Ser Asp Gly Pro Thr Gln Gln Leu Thr
 20 25 30
 Trp Ser Arg Glu Ser Pro Leu Lys Pro Phe Leu Lys Leu Ser Leu Gly
 35 40 45
 Leu Pro Gly Leu Gly Ile His Met Arg Pro Leu Ala Ile Trp Leu Phe
 50 55 60
 Ile Phe Asn Val Ser Gln Gln Met Gly Gly Phe Tyr Leu Cys Gln Pro
 65 70 75 80
 Gly Pro Pro Ser Glu Lys Ala Trp Gln Pro Gly Trp Thr Val Asn Val
 85 90 95
 Glu Gly Ser Gly Glu Leu Phe Arg Trp Asn Val Ser Asp Leu Gly Gly
 100 105 110
 Leu Gly Cys Gly Leu Lys Asn Arg Ser Ser Glu Gly Pro Ser Ser Pro
 115 120 125
 Ser Gly Lys Leu Met Ser Pro Lys Leu Tyr Val Trp Ala Lys Asp Arg
 130 135 140
 Pro Glu Ile Trp Glu Gly Glu Pro Pro Cys Leu Pro Pro Arg Asp Ser
 145 150 155 160
 Leu Asn Gln Ser Leu Ser Gln Asp Leu Thr Met Ala Pro Gly Ser Thr
 165 170 175
 Leu Trp Leu Ser Cys Gly Val Pro Pro Asp Ser Val Ser Arg Gly Pro
 180 185 190
 Leu Ser Trp Thr His Val His Pro Lys Gly Pro Lys Ser Leu Leu Ser
 195 200 205
 Leu Glu Leu Lys Asp Asp Arg Pro Ala Arg Asp Met Trp Val Met Glu
 210 215 220
 Thr Gly Leu Leu Leu Pro Arg Ala Thr Ala Gln Asp Ala Gly Lys Tyr
 225 230 235 240

ES 2 791 989 T3

Tyr Cys His Arg Gly Asn Leu Thr Met Ser Phe His Leu Glu Ile Thr
 245 250 255
 Ala Arg Pro Val Leu Trp His Trp Leu Leu Arg Thr Gly Gly Trp Lys
 260 265 270
 Val Ser Ala Val Thr Leu Ala Tyr Leu Ile Phe Cys Leu Cys Ser Leu
 275 280 285
 Val Gly Ile Leu His Leu Gln Arg Ala Leu Val Leu Arg Arg Lys Arg
 290 295 300
 Lys Arg Met Thr Asp Pro Thr Arg Arg Phe Phe Lys Val Thr Pro Pro
 305 310 315 320
 Pro Gly Ser Gly Pro Gln Asn Gln Tyr Gly Asn Val Leu Ser Leu Pro
 325 330 335
 Thr Pro Thr Ser Gly Leu Gly Arg Ala Gln Arg Trp Ala Ala Gly Leu
 340 345 350
 Gly Gly Thr Ala Pro Ser Tyr Gly Asn Pro Ser Ser Asp Val Gln Ala
 355 360 365
 Asp Gly Ala Leu Gly Ser Arg Ser Pro Pro Gly Val Gly Pro Glu Glu
 370 375 380
 Glu Glu Gly Glu Gly Tyr Glu Glu Pro Asp Ser Glu Glu Asp Ser Glu
 385 390 395 400
 Phe Tyr Glu Asn Asp Ser Asn Leu Gly Gln Asp Gln Leu Ser Gln Asp
 405 410 415
 Gly Ser Gly Tyr Glu Asn Pro Glu Asp Glu Pro Leu Gly Pro Glu Asp
 420 425 430
 Glu Asp Ser Phe Ser Asn Ala Glu Ser Tyr Glu Asn Glu Asp Glu Glu
 435 440 445
 Leu Thr Gln Pro Val Ala Arg Thr Met Asp Phe Leu Ser Pro His Gly
 450 455 460
 Ser Ala Trp Asp Pro Ser Arg Glu Ala Thr Ser Leu Gly Ser Gln Ser
 465 470 475 480
 Tyr Glu Asp Met Arg Gly Ile Leu Tyr Ala Ala Pro Gln Leu Arg Ser
 485 490 495

ES 2 791 989 T3

Ile Arg Gly Gln Pro Gly Pro Asn His Glu Glu Asp Ala Asp Ser Tyr
500 505 510

Glu Asn Met Asp Asn Pro Asp Gly Pro Asp Pro Ala Trp Gly Gly Gly
515 520 525

Gly Arg Met Gly Thr Trp Ser Thr Arg
530 535

<210> 34
<211> 538
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 34

Pro Glu Glu Pro Leu Val Val Lys Val Glu Glu Gly Asp Asn Ala Val
1 5 10 15

Leu Gln Cys Leu Lys Gly Thr Ser Asp Gly Pro Thr Gln Gln Leu Thr
20 25 30

Trp Ser Arg Glu Ser Pro Leu Lys Pro Phe Leu Lys Leu Ser Leu Gly
35 40 45

Leu Pro Gly Leu Gly Ile His Met Arg Pro Leu Ala Ile Trp Leu Phe
50 55 60

Ile Phe Asn Val Ser Gln Gln Met Gly Gly Phe Tyr Leu Cys Gln Pro
65 70 75 80

Gly Pro Pro Ser Glu Lys Ala Trp Gln Pro Gly Trp Thr Val Asn Val
85 90 95

Glu Gly Ser Gly Glu Leu Phe Arg Trp Asn Val Ser Asp Leu Gly Gly
100 105 110

Leu Gly Cys Gly Leu Lys Asn Arg Ser Ser Glu Gly Pro Ser Ser Pro
115 120 125

Ser Gly Lys Leu Met Ser Pro Lys Leu Tyr Val Trp Ala Lys Asp Arg
130 135 140

Pro Glu Ile Trp Glu Gly Glu Pro Pro Cys Leu Pro Pro Arg Asp Ser
145 150 155 160

Leu Asn Gln Ser Leu Ser Gln Asp Leu Thr Met Ala Pro Gly Ser Thr
165 170 175

ES 2 791 989 T3

Leu Trp Leu Ser Cys Gly Val Pro Pro Asp Ser Val Ser Arg Gly Pro
 180 185 190

Leu Ser Trp Thr His Val His Pro Lys Gly Pro Lys Ser Leu Leu Ser
 195 200 205

Leu Glu Leu Lys Asp Asp Arg Pro Ala Arg Asp Met Trp Val Met Glu
 210 215 220

Thr Gly Leu Leu Leu Pro Arg Ala Thr Ala Gln Asp Ala Gly Lys Tyr
 225 230 235 240

Tyr Cys His Arg Gly Asn Leu Thr Met Ser Phe His Leu Glu Ile Thr
 245 250 255

Ala Arg Pro Val Leu Trp His Trp Leu Leu Arg Thr Gly Gly Trp Lys
 260 265 270

Val Ser Ala Val Thr Leu Ala Tyr Leu Ile Phe Cys Leu Cys Ser Leu
 275 280 285

Val Gly Ile Leu His Leu Gln Arg Ala Leu Val Leu Arg Arg Lys Arg
 290 295 300

Lys Arg Met Thr Asp Pro Thr Arg Arg Phe Phe Lys Val Thr Pro Pro
 305 310 315 320

Pro Gly Ser Gly Pro Gln Asn Gln Tyr Gly Asn Val Leu Ser Leu Pro
 325 330 335

Thr Pro Thr Ser Gly Leu Gly Arg Ala Gln Arg Trp Ala Ala Gly Leu
 340 345 350

Gly Gly Thr Ala Pro Ser Tyr Gly Asn Pro Ser Ser Asp Val Gln Ala
 355 360 365

Asp Gly Ala Leu Gly Ser Arg Ser Pro Pro Gly Val Gly Pro Glu Glu
 370 375 380

Glu Glu Gly Glu Gly Tyr Glu Glu Pro Asp Ser Glu Glu Asp Ser Glu
 385 390 395 400

Phe Tyr Glu Asn Asp Ser Asn Leu Gly Gln Asp Gln Leu Ser Gln Asp
 405 410 415

Gly Ser Gly Tyr Glu Asn Pro Glu Asp Glu Pro Leu Gly Pro Glu Asp
 420 425 430

ES 2 791 989 T3

Glu Asp Ser Phe Ser Asn Ala Glu Ser Tyr Glu Asn Glu Asp Glu Glu
435 440 445

Leu Thr Gln Pro Val Ala Arg Thr Met Asp Phe Leu Ser Pro His Gly
450 455 460

Ser Ala Trp Asp Pro Ser Arg Glu Ala Thr Ser Leu Ala Gly Ser Gln
465 470 475 480

Ser Tyr Glu Asp Met Arg Gly Ile Leu Tyr Ala Ala Pro Gln Leu Arg
485 490 495

Ser Ile Arg Gly Gln Pro Gly Pro Asn His Glu Glu Asp Ala Asp Ser
500 505 510

Tyr Glu Asn Met Asp Asn Pro Asp Gly Pro Asp Pro Ala Trp Gly Gly
515 520 525

Gly Gly Arg Met Gly Thr Trp Ser Thr Arg
530 535

<210> 35
<211> 31
5 <212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
10 <223> fragmento de anticuerpo para análisis por EM

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (8) .. (8)
15 <223> X = S, P, A

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (10) .. (10)
20 <223> X = G o A

<400> 35

Ser Ser Gln Ser Leu Glu Asn Xaa Asn Xaa Asn Thr Tyr Leu Asn Trp
1 5 10 15

Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg
20 25 30

25 <210> 36
<211> 6
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

30 <400> 36

Asn Ser Asn Gly Asn Thr
1 5

35 <210> 37
<211> 4
<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 37

Lys Phe Asn Gly

5 1

<210> 38

<211> 6

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> fragmento de HVR-H2 humanizada con la mutación N64Q

15 <400> 38

Thr Glu Lys Phe Gln Gly

1 5

<210> 39

20 <211> 8

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> fragmento de HVR-L2 humanizada con la mutación S27eP

<400> 39

Leu Glu Asn Pro Asn Gly Asn Thr

1 5

30 <210> 40

<211> 8

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

35 <220>

<223> fragmento de HVR-L2 humanizada con la mutación S27eP/N28S

<400> 40

40 **Leu Glu Asn Pro Ser Gly Asn Thr**

1 5

<210> 41

45 <211> 18

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> conector

50 <400> 41

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly

1 5 10 15

Gly Ser

55 <210> 42

<211> 15

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 5 <223> fragmento de receptor de transferrina humana

<400> 42

Ile Gly Gln Asn Met Val Thr Ile Val Gln Ser Asn Gly Asn Leu
 1 5 10 15

10 <210> 43
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> fragmento de receptor de transferrina humana

<400> 43

20 Asn Met Val Thr Ile Val Gln Ser Asn Gly Asn Leu Asp Pro Val
 1 5 10 15

<210> 44
 <211> 15
 25 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> fragmento de receptor de transferrina humana

30 <400> 44

Gln Ser Asn Gly Asn Leu Asp Pro Val Glu Ser Pro Glu Gly Tyr
 1 5 10 15

35 <210> 45
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> conector peptídico

<400> 45

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 20 25 30

45 <210> 46
 <211> 118
 <212> PRT
 50 <213> *Mus musculus*

<400> 46

ES 2 791 989 T3

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

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

Gly Met His Trp Ile Arg Gln Ala Pro Lys Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Ala Met Ile Tyr Tyr Asp Ser Ser Lys Met Asn Tyr Ala Asp Thr Val
50 55 60

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

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

Ala Val Pro Thr Ser His Tyr Val Val Asp Val Trp Gly Gln Gly Val
100 105 110

Ser Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 47
<211> 107
5 <212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 47

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Ala Ser Leu Glu
1 5 10 15

10 Glu Ile Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Asp Ile Gly Asn Trp
20 25 30

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

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

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

Glu Asp Ile Gly Ile Tyr Tyr Cys Leu Gln Ala Tyr Asn Thr Pro Trp
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
100 105

<210> 48
<211> 107

<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> variante L104V y L106I de la SEQ ID NO: 57

<400> 48

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Ala Ser Leu Glu
1 5 10 15

Glu Ile Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Asp Ile Gly Asn Trp
20 25 30

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

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

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

Glu Asp Ile Gly Ile Tyr Tyr Cys Leu Gln Ala Tyr Asn Thr Pro Trp
85 90 95

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

10

<210> 49
<211> 122
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

15

<220>
<223> variante_DASG de humanización de VH 299-023

<400> 49

20

ES 2 791 989 T3

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

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

Met Ser Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly
35 40 45

Tyr Ile Trp Ser Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Ser
50 55 60

Arg Val Thr Ile Ser Lys Thr Ser Thr Thr Val Ser Leu Lys Leu Ser
65 70 75 80

Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Arg Tyr
85 90 95

Gly Thr Ser Tyr Pro Asp Tyr Gly Asp Ala Ser Gly Phe Asp Pro Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 50
<211> 110
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> variante_NYA de humanización de VL 299-009

<400> 50

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
20 25 30

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

Tyr Arg Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Tyr Ala Ser Ser Asn
85 90 95

Val Asp Asn Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 51
 <211> 7
 <212> PRT
 5 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 <400> 51
 Gly Phe Ser Leu Ser Ser Tyr
 1 5
 10
 <210> 52
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 15
 <400> 52
 Trp Ser Gly Gly Ser
 1 5
 20
 <210> 53
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 25
 <400> 53
 Arg Tyr Gly Thr Ser Tyr Pro Asp Tyr Gly Asp Ala Asn Gly Phe Asp
 1 5 10 15
 Pro
 30
 <210> 54
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 35 <223> HVR-H3 DASG 299-000
 <400> 54
 Arg Tyr Gly Thr Ser Tyr Pro Asp Tyr Gly Asp Ala Ser Gly Phe Asp
 1 5 10 15
 Pro
 40
 <210> 55
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 45
 <220>
 <223> HVR-H3 DAQG 299-000
 <400> 55
 50
 Arg Tyr Gly Thr Ser Tyr Pro Asp Tyr Gly Asp Ala Gln Gly Phe Asp
 1 5 10 15
 Pro

<210> 56
 <211> 11
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> HVR-L1 RAA 299-000

 10 <400> 56

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

 <210> 57
 15 <211> 7
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

 <400> 57
 20 Arg Ala Ser Thr Leu Ala Ser
 1 5

 <210> 58
 <211> 12
 25 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> HVR-L3 NYA 299-000
 30 <400> 58

 Gln Gln Asn Tyr Ala Ser Ser Asn Val Asp Asn Thr
 1 5 10

 35 <210> 59
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 40 <220>
 <223> variante 0 de la secuencia de LC

 <400> 59

 Gln Ser Leu Glu Asn Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu
 1 5 10
 45

 <210> 60
 <211> 12
 <212> PRT
 50 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> variante 1 de la secuencia de LC

 55 <400> 60

 Gln Ser Leu Glu His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu
 1 5 10

 <210> 61

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

5 <220>
 <223> variante 2 de la secuencia de LC

<400> 61

Gln Ser Leu Glu Gln Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu
 1 5 10

10

<210> 62
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> variante 3 de la secuencia de LC

20 <400> 62

Gln Ser Leu Glu Asn Ala Asn Gly Asn Thr Tyr Leu
 1 5 10

25

<210> 63
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> variante 4 de la secuencia de LC

<400> 63

Gln Ser Leu Glu Asn Val Asn Gly Asn Thr Tyr
 1 5 10

35

<210> 64
 <211> 12

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> variante 5 de la secuencia de LC

45 <400> 64

Gln Ser Leu Glu Asn Pro Asn Gly Asn Thr Tyr Leu
 1 5 10

50

<210> 65
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <223> variante 6 de la secuencia de LC

<400> 65

Gln Ser Leu Glu Asn Ser Gln Gly Asn Thr Tyr Leu
 1 5 10

<210> 66
 <211> 12
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> variante 7 de la secuencia de LC
 10 <400> 66

 Gln Ser Leu Glu Asn Ser Asn Ala Asn Thr Tyr Leu
 1 5 10

 <210> 67
 15 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 20 <223> variante 8 de la secuencia de LC

 <400> 67

 Gln Ser Leu Glu Asn Ser Asn Val Asn Thr Tyr Leu
 1 5 10
 25
 <210> 68
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 30
 <220>
 <223> variante 9 de la secuencia de LC

 <400> 68
 35
 Gln Ser Leu Glu Asn Pro Ser Gly Asn Thr Tyr Leu
 1 5 10

 <210> 69
 <211> 10
 40 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> variante 0 de la secuencia de HC
 45
 <400> 69

 Thr Glu Lys Phe Asn Gly Lys Ala Thr Leu
 1 5 10
 50
 <210> 70
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 55
 <220>
 <223> variante 1 de la secuencia de HC

 <400> 70

ES 2 791 989 T3

Thr	Glu	Lys	Phe	Gln	Gly	Arg	Val	Thr	Met
1				5					10

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo que se une específicamente al CD19 humano, en el que el anticuerpo comprende
 - (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 03,
 - (b) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11,
 - (c) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 05,
 - (d) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20 o 28,
 - (e) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 07, y
 - (f) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 08.
2. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.
3. El anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en el que el anticuerpo es un anticuerpo humano, humanizado o quimérico.
4. El anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo que se une específicamente al CD19 humano.
5. El anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el anticuerpo comprende
 - (a) una secuencia de VH que tiene al menos un 95 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 09 y una secuencia de VL que tiene al menos un 95 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 19; o
 - (b) una secuencia de VH que tiene al menos un 95 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 09 y una secuencia de VL que tiene al menos un 95 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 27; o
 - (c) una secuencia de VH y una secuencia de VL como en (a) o (b).
6. El anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el anticuerpo es un anticuerpo multiespecífico.
7. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 6, en el que el anticuerpo es un anticuerpo biespecífico.
8. El anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el anticuerpo es un anticuerpo bivalente o trivalente.
9. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 8, en el que el anticuerpo es un anticuerpo bivalente.
10. Una formulación farmacéutica que comprende el anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
11. El anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 para su uso como medicamento.
12. El anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 para su uso en el tratamiento de cáncer de linfocitos B.
13. El anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 para su uso en la disminución de los linfocitos B en el tratamiento de artritis reumatoide, lupus, psoriasis, LLC, LNH o LDLBG.