Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
INVENTARIO

Delegatura de Propiedad Industrial
División de Nuevas Creaciones

PCT

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCIÓN

21. **EXPEDIENTE No.** 10-2346

54. **TÍTULO** COMPOSICIONES Y METODOS TERAPEUTICOS ANTI-CD20

51. **CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL**

71. **SOLICITANTE** WYEITH Y TRUBION PHARMACEUTICALS, INC.

DOMICILIO MADISON, NEW JERSEY, SEATTLE, WASHINGTON, USA. Respect.

74. **APODERADO** LUZ CLEMENCIA DE PAEZ
C.C. 35.456.344 de Usaquén

22. **BOGOTÁ, D.C.,**

Titulo, Cesion, Poder Trubion
12-01-2010

(FORMA P-10)

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

PETITORIO

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 10-002346- -00000-0000
Fecha: 2010-01-12 16:28:55 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 351

FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE PCT ENTRADA EN FASE NACIONAL

1 SOLICITUD DE:

☒ Patente de Invención. ☐ Patente de Modelo de Utilidad.
☒ Capítulo I. ☐ Capítulo II.

2 SOLICITANTE (71)

Nombre: **WYETH y TRUBION PHARMACEUTICALS, INC.**
Sociedades constituidas y existentes bajo las leyes del Estado de Delaware, Estados Unidos de América.

Dirección: Five Giralda Farms,
Madison,
New Jersey 07940-0874,
Estados Unidos de América

y

2401 4th Avenue,
Suite 1050,
Seattle,
Washington 98121,
Estados Unidos de América

Domicilio: Madison,
New Jersey,
Estados Unidos de América

y

Seattle,
Washington,
Estados Unidos de América

Respectivamente

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☐ NIT ☐
C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número _____

3 REPRESENTANTE O APODERADO

Nombre: LUZ CLEMENCIA DE PAEZ
Dirección: Carrera 4ª. No. 72-35
Teléfono: 347 36 11
Fax: 211 86 50
E-mail: clientes@cavelier.com
Domicilio: Bogotá, Colombia.

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☒ NIT ☐
C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número 35.456.344 T.P 23.555

4 INVENTOR (ES) (72)

1. **Nitin K. DAMLE**
53 Stevenson Lane,
Upper Saddle River,
New Jersey 07458,
Estados Unidos de América

2. **Lioudmila TCHISTIAKOVA**
19 Abbot Bridge Drive,
Andover,
Massachusetts 01810,
Estados Unidos de América

3. **Kyriaki DUNUSSI-JOANNOPOULOS**
64 Douglas Road,
Belmont,
Massachusetts 02478,
Estados Unidos de América

4. **Sandy Alexander SIMON**
1904 NE 68th Street,
Seattle,
Washington 98115,
Estados Unidos de América

5. William BRADY
618 219th Place SW,
Bothell,
Washington 98021,
Estados Unidos de América

6. Laura Sue GROSMAIRE
19909 280 th Avenue SE,
Hobart,
Washington 98025,
Estados Unidos de América

7. Jeffrey Alan LEDBETTER
18798 Ridgefield Road NW,
Shoreline,
Washington 98177,
Estados Unidos de América

(5) **PCT (86)**
Solicitud Internacional No. PCT/US2008/007464 Fecha: 12 de junio 2008
Publicación Internacional No. WO 2008/156713 A3 Fecha: 24 de diciembre de 2008

(6) **Título (54)**
COMPOSICIONES Y MÉTODOS TERAPÉUTICOS ANTI-CD20 (Folio 357)

(7) **Clasificación Internacional (51)** C07K 016/028

(8) **Prioridad** SI ☒ NO ☐

(33) País de Origen	(32) Fecha	(31) Número de Solicitud
US	12 de junio de 2007	60/934,341

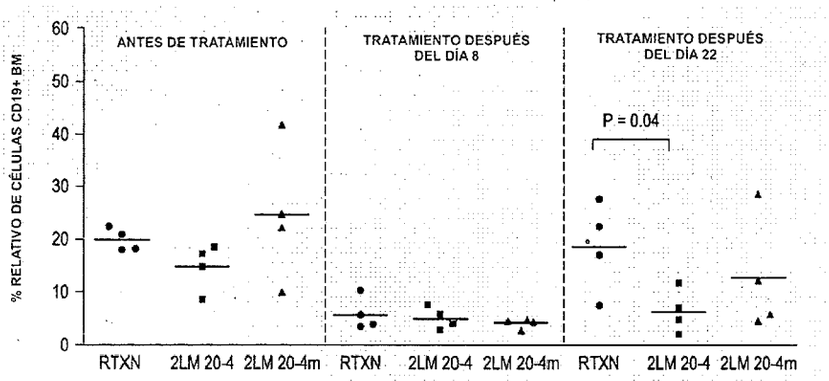
(9) **Comprobante de pago No.:** 10 - 195 **Fecha:** 5 de enero de 2010
10 - 235 5 de enero de 2010
10 - 235 5 de enero de 2010

(10) **Anexos:**

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud por $ 554.000.oo.
- ☒ Comprobante de pago por 19 reivindicaciones adicionales después de la décima reivindicación por $494.000.oo.
- ☒ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- ☒ Poder de la Sociedad **WYETH.**
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- ☐ Declaraciones.
- ☒ Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☐ Copia del examen preliminar efectuado por la IPEA.
- ☐ Traducción del examen preliminar efectuado por la IPEA.
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.
- ☒ Arte final 12x12
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☒ Otros: VER HOJA DE DOCUMENTOS ANEXOS

11

FIGURA CARACTERÍSTICA



12 Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: LUZ CLEMENCIA DE PAEZ

FIRMA : Luz Clemencia de Páez

C.C. 35.456.344 de Usaquén T.P. 23.555

JGG

DOCUMENTOS ANEXOS

1. ☒ Publicación Internacional WO 2008/156713 A3

   Descripción:

   Páginas 73 en el idioma original

   Páginas 115 en español

   Reivindicaciones: Número (s) 29

   Figuras: Número (s) 29

2. ☒ **Forma PCT/ISA/210.** Informe de Búsqueda Internacional.

3. ☒ Listado de Secuencias.

4. ☒ Extracto de publicación.

NO SE REALIZARON MODIFICACIONES EN LA FASE INTERNACIONAL

5

13665
S3f, A9

APOSTILLE

(CONVENTION DE LA HAYE DU 5 OCTOBRE 1961)

1. COUNTRY: UNITED STATES OF AMERICA

2. THIS PUBLIC DOCUMENT HAS BEEN SIGNED BY:
MICHELLE L KALBFELL

3. ACTING IN THE CAPACITY OF:
NOTARY PUBLIC OF NEW JERSEY

4. BEARS THE SEAL/STAMP OF:
MICHELLE L KALBFELL, NOTARY

CERTIFIED

5. AT TRENTON, NEW JERSEY

6. THE 27TH DAY OF SEPTEMBER 2005

7. BY: John E McCormac, CPA, NEW JERSEY TREASURER

8. NO. A239925

9. SEAL/STAMP:

10. SIGNATURE

COMO NOTARIA SEXTA DEL CIRCULO DE BOGOTA D.C. HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA
BOGOTA D.C. REPUBLICA DE COLOMBIA
06 ENE 2010
NOTARIO ENCARGADO
REPUBLICA DE COLOMBIA

6.

CAVELIER
ABOGADOS
EDIFICIO SISKI
CARRERA 4a N° 72-35
BOGOTA, 8 – COLOMBIA

193

AM101316

REPRESENTACION, RATIFICACION Y PODER

REPRESENTATION, RATIFICATION AND POWER- OF- ATTORNEY

Yo (nosotros), abajo firmado (s)/I (we), the undersigned

WYETH

domiciliado (s) en/of 5 Giralda Farms,Madison, NJ 07940

ESTADOS UNIDOS DE AMERICA

por el presente ratificamos la Solicitud de patente No 05.084.045

presentada por Emilio Ferrero

como agente oficioso ante La Superintendencia de Industria y Comercio

Bogota, Colombia

el 24 de Agosto de 2005

por el presente nombramos a EMILIO FERRERO, tpa. 31929; GONZALO PERDOMO, tpa. 831; LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, tpa. 23555 y GERMAN CAVELIER, tpa. 832, domiciliados en la Carrera 4a N° 72-35, Bogotá, Colombia, en obedecimiento a lo dispuesto en el parágrafo 1o del Artículo 543 del Código de Comercio, el primero como principal y los demás como suplentes, en su orden, como mis (nuestros) representantes en todos los asuntos de propiedad industrial con facultad para recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales. El primer representante suplente reemplazará al principal en caso de ausencia o impedimento temporal o definitivo de aquél. La misma regla se aplicará cuando el segundo representante suplente haya de reemplazar al primero, o el tercero al segundo. En tales casos, el representante principal, o el primero, o segundo suplente, en su caso, o ambos, declararán su intención de no ejercer la representación mediante declaración autenticada por Notario Público en Colombia, o por Notario u otro Funcionario Público, o Cónsul de Colombia, en el extranjero; y si se tratare de impedimento, con el certificado respectivo. Si alguno de los nombrados faltare definitivamente, el siguiente tomará su lugar. Cuando cesare la ausencia o impedimento del representante principal, o de su primero o segundo suplentes, en su caso, podrán ejercer la representación, en su orden, uno u otros según el caso, asumiéndola por el solo hecho de ejercerla, cesando en ese momento el ejercicio de la representación por el primero, segundo o tercer suplente en su caso.

Además, confiero (conferimos) poder a los abogados arriba nombrados, para obtener la protección de mi (nuestra) propiedad industrial y contra la competencia desleal, a cuyo efecto autorizo (amos) a los dichos apoderados para que me (nos) representen ante cualesquiera entidades o personas, ejerzan o no jurisdicción, especialmente ante las del orden administrativo, contencioso- administrativo y judicial, así como los tribunales de arbitramento, en todo lo concerniente a los siguientes asuntos: a) Obtención de patentes de invención, modelos de utilidad y diseños industriales; el registro de marcas de fábrica, colectivas, defensivas, de servicio, lemas comerciales, nombres

hereby ratify the Colombian Patent Application No. 05.084.045

filed without a Power of Attorney by Emilio Ferrero

before The Superintendence of Industry and Commerce

in Bogotá, Colombia

on August 24, 2005

in due compliance with the terms of paragraph 1st. of article 543 of the Commercial Code, do hereby appoint EMILIO FERRERO, tpa. 31929; GONZALO PERDOMO, tpa. 831; LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, tpa. 23555 and GERMAN CAVELIER, tpa. 832, domiciled at Carrera 4a N° 72-35, Bogotá, Colombia, the first as principal and the others as alternates, in the order of their appointment, as our representatives for the above identified Patent Application. The first alternate shall replace the principal in case of his absence or of temporal or definitive impediment. The same rule will apply when the second alternate representative is to replace the first one, or when the third is to replace the first or second alternates in their turn, or both of them, second. In such cases, the principal representative, or the first or second alternates in their turn, or both of them, shall state their intention not to act as representatives through a declaration given before a Notary Public in Colombia, or before a Notary or another Public Official or a Colombian Consul abroad; and in case of impediment, the appropriate certificate shall suffice. If any of the appointees were to be definitely absent, the following alternate shall take his place. When the absence or impediment of the principal representative, or of the first or second alternate in their turn, is [illegible] taken again in their sequence, by the principal, the first or second alternate depending on case, and the mere fact of its exercise shall suffice. The exercise of the representation by the first, second or third alternates in their turn shall end at such time [illegible] of Attorney in favor of the above [illegible] may obtain the protection of the above identified industrial property, for which purpose I (we) authorize the said attorneys to represent me (us) before any authorities or persons, with or without jurisdiction, especially those administrative, administrative contentious, and judicial, as well as before Arbitration Court, in all matters concerning the obtainment of a patent(s), utility model(s) and industrial design(s); its renewal, assignment, change of name or domicile, voluntary cancellation; the registration of licenses of use of the above rights; any opposition(s) thereto or observations, administrative or Court cancellation or nullity

COMO NOTARIA RECIBIDO CIRCULO DE BOGOTA D.C. HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON EL DOCUMENTO PRESENTADO QUE HE TENIDO A LA VISTA
BOGOTA D.C. NOTARIA DE COLOMBIA
06 ENE 2010

© CAVELIER ABOGADOS

comerciales, enseñas, nombres de dominio, variedades vegetales y denominaciones de origen; su renovación, traspaso, cambio de nombre o domicilio, cancelación voluntaria; y el registro de licencias de uso de esos derechos; b) Las acciones de competencia desleal, protección del consumidor, oposiciones u observaciones, cancelación administrativa y judicial, nulidad, medidas cautelares, concesión de licencias, la tutela, la protección de secretos industriales, y en general los juicios civiles, penales, administrativos o contencioso-administrativos relacionados con estos derechos; acciones y procesos que promovamos o se nos promuevan. Y para que en todos los asuntos arriba determinados, puedan sustituir este mandato, transigir, conciliar, admitir los hechos del proceso, desistir, cancelar, recibir, renunciar, y ratificar los actos de agentes oficiosos.

actions brought against the above identified industrial property right . And that in all the above matters they may compromise, conciliate, admit the facts of the case, desist, cancel, receive, resign, and ratify acts done by representatives without a power of attorney.

The English language content of this Representation, Ratification and Power of Attorney is the controlling language in the case of any conflict.

Dado y firmado hoy/Given and signed this September 29, 2005

en/in Madison, New Jersey, United States of America

por/by Gale F. Matthews, Assistant Secretary

Firma/Signature



© CAVELIER ABOGADOS

8.

CERTIFICACIÓN NOTARIAL (SOCIEDAD)

A los 20 días del mes de Septiembre de 200 5 compareció(eron) ante mí, Gale F. Matthews

Quien(es) conozco personalmente y que firma(n) este documento en representación de la Sociedad/compañía denominada **WYETH**

Certifico:

1. Que he visto los siguientes documentos:*
Actas de la Junta Directiva fechado 21 Abril 2005

2.Que dichos documentos prueban lo siguiente:

2.1.Que **WYETH**

es una Sociedad/Compañía legalmente constituída y existente de acuerdo con las leyes de Estado de Delaware, Estados Unidos de América

2.2.Que el domicilio de dicha Sociedad/Compañía es 5 Giralda Farms, Madison, N J 07940, Estados Unidos de America

2.4.Que el(los) Sr.(Sres.) Gale F. Matthews está(n) autorizado(s) para otorgar el presente Poder.

Ciudad Madison

Estado New Jersey

Hoy 20 Septiembre de 200 5

NOTARIAL CERTIFICATION (CORPORATION)

On this 20th day of September 200 5 appeared before me Gale F. Matthews

who(m) I know personally and who(m) signed this document as representative(s) of the Corporation/Company named **WYETH**

I certify:

1.That I have seen the following documents:*
Board of Director's minutes dated April 21, 2005.

2. That the above documents duly prove the following:

2.1.That **WYETH**

is a Corporation/Company legally constituted and in existence in accordance with the laws State of Delaware, United States Of America

2.2.That the principal office of said Corporation/Company is 5 Giralda Farms, Madison, N J 07940, United States Of America

2.4. That Mr.(Messrs.) Mrs. Gale F. Matthews is(are) authorized to grant the present Power of Attorney

City Madison

State New Jersey

This 20th day of September 200 5

--- NOTARIO PÚBLICO O FUNCIONARIO AUTORIZADO --- NOTARY PUBLIC OR ATTESTING OFICIAL ---

* Los documentos que certifican la existencia de la compañía deben identificarse con fecha y origen

* The documents that certify the existence of the company must be identified with date and origin

michelle l. kalbfell

MICHELLE L. KALBFELL
NOTARY PUBLIC, State of New Jersey
No. 2108903
Qualified in Morris County
Commission Expires Oct. 25, 2005

APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. Country:
   This public document
2. has been signed by:
3. acting in the capacity of:
4. bears the seal/stamp of:

Certified

5. at:
6. the 06 ENE 2010
7. by
8. No.
9. Seal/stamp
10. Signature

COMO NOTARIA SEXTA DEL CIRCULO DE BOGOTA D.C. HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA BOGOTA D.C., REPUBLICA DE COLOMBIA

NOTARIO ENCARGADO

Jaime Vargas

REPUBLICA DE COLOMBIA

NOTARIO ENCARGADO

NOTARIA SEXTA DE BOGOTA

© CAVELIER ABOGADOS

TRADUCCIÓN OFICIAL No. 14.12/05 preparada por María Elvira Martelo, traductora oficial aprobada por el Ministerio de Justicia mediante Resolución No. 2879 de 1995 y reconocida por el Ministerio de Relaciones Exteriores.

A continuación se traducen los sellos y legalizaciones de un documento escrito en inglés y español, por el cual **WYETH,** sociedad domiciliada en 5 Giralda Farms, Madison, NJ 07940, Estados Unidos de América, ratifica la solicitud de patente No. 05.084.045 presentada por Emilio Ferrero el 24 de agosto de 2005 y también otorga poder a **EMILIO FERRERO, GONZALO PERDOMO, LUZ CLEMENCIA DE PAEZ Y GERMAN CAVELIER.**

Dado y firmado el 20 septiembre de 2005

en Madison, New Jersey, Estados Unidos de América

Por Gale F. Matthews, Secretario Asistente

Firma: (Firma ilegible)

CERTIFICADO NOTARIAL (SOCIEDAD) en inglés y español referente a la existencia legal de **WYETH** y de la capacidad legal de Gale F. Matthews para otorgar el documento anterior.

Dado en la ciudad de Madison, Estado de New Jersey, el 20 de septiembre de 2005.

Firma ilegible

(Sello notarial), MICHELLE L. KALBFELL, NOTARIO PÚBLICO, Estado de New Jersey. No. 2108903, Calificada en el Condado de Morris. Comisión expira el 23 de octubre de 2005.

COMO NOTARIA SEXTA DEL CIRCULO DE BOGOTA, D.C. HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE TUVE A LA VISTA
BOGOTA D.C. - REPUBLICA DE COLOMBIA
06 ENE 2010
NOTARIO ENCARGADO

REPUBLICA DE COLOMBIA
Jaime Vargas Rubio
NOTARIO ENCARGADO
NOTARIA SEXTA DE BOGOTA

APOSTILLA

(Convención de La Haya del 5 de octubre de 1961)

1. PAÍS: ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA

2. ESTE DOCUMENTO PÚBLICO HA SIDO FIRMADO POR:

MICHELLE L. KALBFELL

3. ACTUANDO EN SU CAPACIDAD DE:

NOTARIO PÚBLICO DE NEW JERSEY

4. LLEVA EL SELLO/TIMBRE DE

MICHELLE L. KALBFELL, NOTARIO

CERTIFICADO

5. EN TRENTON, NEW JERSEY

6. EL 27 DE SEPTIEMBRE DE 2005

7. POR John E McCormac, CPC, TESORERO DE NEW JERSEY

8. **No. A239925**

9. SELLO: SELLO DEL (ILEGIBLE), ESTADO DE NEW JERSEY

10. FIRMA (FIRMA ILEGIBLE)

Es traducción fiel y completa de la cual se deja copia en esta oficina para su confrontación.

TRADUCCION No.: 14/12/05
MARIA ELVIRA MARTELO
Traductora e Interprete Oficial
Inglés - Español - Inglés
Res. No. 2879 Min. Justicia

COLO 13798-841-003-1

WPC 13798 - ID 26

DIC 20/05

COMO NOTARIA SEXTA DEL CIRCULO DE BOGOTA, D.C. HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA
BOGOTA D.C. REPUBLICA DE COLOMBIA
06 ENE 2010
NOTARIO ENCARGADO

REPUBLICA DE COLOMBIA
Jaime Vargas Rambo
NOTARIO ENCARGADO
NOTARIA SEXTA DE BOGOTA

MINISTERIO DE RELACIONES
EXTERIORES

NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

35187

Nana Maitelo

CUYA FIRMA APARECE EN EL
DOCUMENTO DESEMPEÑA
LAS FUNCIONES INDICADAS

2005 DEC 21 A 11: 04

ucs

JEFE DE LEGALIZACIONES
SANTAFE DE BOGOTA D.C.

COMO NOTARIA ENCARGADA DEL CIRCULO DE BOGOTA D.C. HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA CONCUERDA CON EL ORIGINAL QUE TUVE A LA VISTA

06 ENE 2010

REPÚBLICA DE COLOMBIA
NOTARÍA SEXTA DE BOGOTÁ
Jaime Vargas
NOTARIO
ENCARGADO

COMO NOTARIO SEXTO DEL CIRCULO DE BOGOTA HAGO CONSTAR QUE LA(S) FIRMA(S)

CONCUERDA(N) CON LA FIRMA REGISTRADA POR

EL (ELLA)(LOS) EN ESTA NOTARIA

SANTAFE DE BOGOTA

21 DIC 2005

NOTARIA SEXTA
PABLO CARLOS
BARRERA

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau

(43) International Publication Date
24 December 2008 (24.12.2008)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2008/156713 A3

(51) International Patent Classification:
C07K 16/28 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)

(21) International Application Number:
PCT/US2008/007464

(22) International Filing Date: 12 June 2008 (12.06.2008)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/934,341 12 June 2007 (12.06.2007) US

(71) Applicants *(for all designated States except US)*: **WYETH** [US/US]; Five Giralda Farms, Madison, NJ 07940-0874 (US). **TRUBION PHARMACEUTICALS, INC.** [US/US]; 2401 4th Avenue, Suite 1050, Seattle, WA 98121 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants *(for US only)*: **DAMLE, Nitin, K.** [US/US]; 53 Stevenson Lane, Upper Saddle River, NJ 07458 (US). **TCHISTIAKOVA, Lioudmila** [CA/US]; 19 Abbot Bridge Drive, Andover, MA 01810 (US). **DUNUSSI-JOANNOPOULOS, Kyriaki** [US/US]; 64 Douglas Road, Belmont, MA 02478 (US). **SIMON, Sandy, Alexander** [US/US]; 1904 Ne 68th Street, Seattle, WA 98115 (US). **BRADY, William** [US/US]; 618 219th Place Sw, Bothell, WA 98021 (US). **GROSMAIRE, Laura, Sue** [US/US]; 19909 280th Avenue Se, Hobart, WA 98025 (US). **LEDBETTER, Jeffrey, Alan** [US/US]; 18798 Ridgefield Road Nw, Shoreline, WA 98177 (US).

(74) Agents: **GUNNISON, Jane, T.** et al.; Ropes & Gray Llp, 1211 Avenue Of The Americas, New York, NY 10036 (US).

(81) Designated States *(unless otherwise indicated, for every kind of national protection available)*: AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States *(unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available)*: ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:
— *with international search report*

[Continued on next page]

(54) Title: ANTI-CD20 THERAPEUTIC COMPOSITIONS AND METHODS

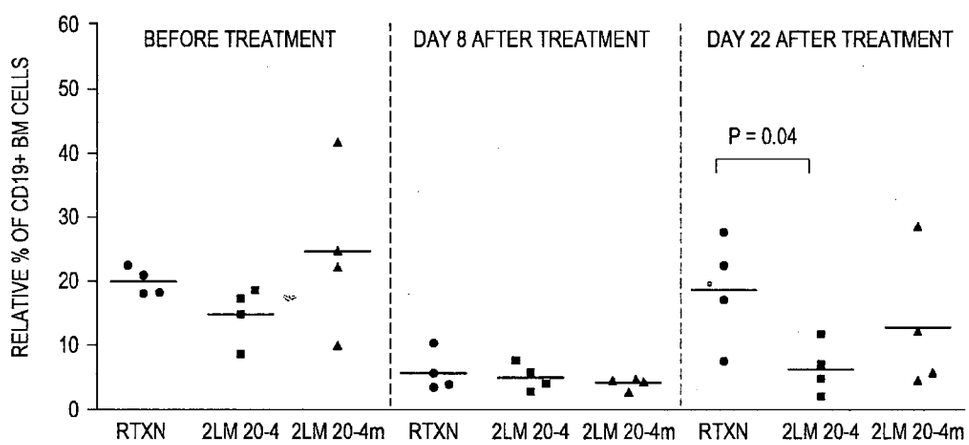


Figure 9

(57) Abstract: The present invention provides materials and methods for treatment of diseases involving aberrant B-cell activity, using a CD20-specific binding molecule, in particular, antibodies or antigen binding fragment thereof. The compositions disclosed herein is useful for the treatment and diagnosis of B-cell disorders, such as B-cell malignancies and autoimmune diseases.

WO 2008/156713 A3

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau

(43) International Publication Date
24 December 2008 (24.12.2008)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2008/156713 A2

(51) International Patent Classification:
C07K 16/28 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)

(21) International Application Number:
PCT/US2008/007464

(22) International Filing Date: 12 June 2008 (12.06.2008)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/934,341 12 June 2007 (12.06.2007) US

(71) Applicants *(for all designated States except US)*: **WYETH** [US/US]; Five Giralda Farms, Madison, NJ 07940-0874 (US). **TRUBION PHARMACEUTICALS, INC.** [US/US]; 2401 4th Avenue, Suite 1050, Seattle, WA 98121 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants *(for US only)*: **DAMLE, Nitin, K.** [US/US]; 53 Stevenson Lane, Upper Saddle River, NJ 07458 (US). **TCHISTIAKOVA, Lioudmila** [CA/US]; 19 Abbot Bridge Drive, Andover, MA 01810 (US). **DUNUSSI-JOANNOPOULOS, Kyriaki** [US/US]; 64 Douglas Road, Belmont, MA 02478 (US). **SIMON, Sandy, Alexander** [US/US]; 1904 Ne 68th Street, Seattle, WA 98115 (US). **BRADY, William** [US/US]; 618 219th Place Sw, Bothell, WA 98021 (US). **GROSMAIRE, Laura, Sue** [US/US]; 19909 280th Avenue Se, Hobart, WA 98025 (US). **LEDBETTER, Jeffrey, Alan** [US/US]; 18798 Ridgefield Road Nw, Shoreline, WA 98177 (US).

(74) Agents: **GUNNISON, Jane, T.** et al.; Ropes & Gray Llp, 1211 Avenue Of The Americas, New York, NY 10036 (US).

(81) Designated States *(unless otherwise indicated, for every kind of national protection available)*: AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States *(unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available)*: ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:
— *without international search report and to be republished upon receipt of that report*

WO 2008/156713 A2

(54) Title: ANTI-CD20 THERAPEUTIC COMPOSITIONS AND METHODS

(57) Abstract: The present invention provides materials and methods for treatment of diseases involving aberrant B-cell activity, using a CD20-specific binding molecule, in particular, antibodies or antigen binding fragment thereof. The compositions disclosed herein is useful for the treatment and diagnosis of B-cell disorders, such as B-cell malignancies and autoimmune diseases.

ANTI-CD20 THERAPEUTIC COMPOSITIONS AND METHODS

FIELD OF THE INVENTION

[0001] The invention provides materials and methods for treatment of diseases involving aberrant B-cell activity, using a CD20-specific binding molecule. The compositions disclosed herein are useful for the treatment and diagnosis of B-cell disorders, such as B-cell malignancies and autoimmune diseases.

BACKGROUND INFORMATION

[0002] In its usual role, the human immune system protects the body from damage from foreign substances and pathogens. One way in which the immune system protects the body is by production of specialized cells called B lymphocytes or B-cells. B-cells produce antibodies that bind to, and in some cases mediate destruction of, a foreign substance or pathogen.

[0003] In some instances though, the human immune system, and specifically the B lymphocytes of the human immune system, go awry and disease results. There are numerous cancers that involve uncontrolled proliferation of B-cells. There are also numerous autoimmune diseases that involve B-cell production of antibodies that, instead of binding to foreign substances and pathogens, bind to parts of the body. In addition, there are numerous autoimmune and inflammatory diseases that involve B-cells in their pathology, for example, through inappropriate B-cell antigen presentation to T-cells or through other pathways involving B-cells. For example, autoimmune-prone mice deficient in B-cells do not develop autoimmune kidney disease, vasculitis or autoantibodies. (Shlomchik et al., *J Exp. Med.* 1994, 180:1295-306). Interestingly, these autoimmune-prone mice that possess B-cells but are deficient in immunoglobulin production, do develop autoimmune diseases when induced experimentally (Chan et al., *J Exp. Med.* 1999, 189:1639-48), indicating that B-cells play an integral role in development of autoimmune disease.

[0004] B-cells can be identified by molecules on their cell surface. CD20 was the first human B-cell lineage-specific surface molecule identified by a monoclonal antibody. It is a non-glycosylated, hydrophobic 35 kDa B-cell transmembrane phosphoprotein that has both its amino and carboxy ends situated inside the cell. Einfeld *et al.*, *EMBO J.* 1988, 7:711-17. CD20 is expressed by all normal mature B-cells, but is not expressed by precursor

B-cells or plasma cells. Natural ligands for CD20 have not been identified, and the function of CD20 in B-cell biology is still incompletely understood.

[0005] Certain anti-CD20 monoclonal antibodies can affect the viability and growth of B-cells. (Clark *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1986, 83:4494-98). Extensive cross-linking of CD20 can induce apoptosis in B lymphoma cell lines (Shan *et al.*, *Blood* 1998, 91:1644-52), and cross-linking of CD20 on the cell surface has been reported to increase the magnitude and enhance the kinetics of signal transduction, for example, as detected by measuring tyrosine phosphorylation of cellular substrates. (Deans et al., *J. Immunol.* 1993, 146:846-53). Therefore, in addition to cellular depletion by complement and ADCC mechanisms, Fc-receptor binding by certain CD20 monoclonal antibodies *in vivo* may promote apoptosis of malignant B-cells by CD20 cross-linking, consistent with the theory that effectiveness of CD20 therapy of human lymphoma in a SCID mouse model may be dependent upon Fc-receptor binding by the CD20 monoclonal antibody (Funakoshi *et al.*, *J. Immunotherapy* 1996, 19:93-101). The presence of multiple membrane spanning domains in the CD20 polypeptide (Einfeld et al., *EMBO J.* 1988, 7:711-17; Stamenkovic *et al.*, *J.Exp. Med.* 1988, 167:1975-80; Tedder et al., *J. Immunol.* 1988, 141:4388-4394), prevent CD20 internalization after antibody binding, and this was recognized as an important feature for therapy of B-cell malignancies when a murine CD20 monoclonal antibody, 1F5, was injected into patients with B-cell lymphoma, resulting in significant depletion of malignant cells and partial clinical responses (Press et al., *Blood* 1987, 69:584-91).

[0006] Because normal mature B-cells also express CD20, normal B-cells are depleted by anti-CD20 antibody therapy (Reff et al., *Blood* 1994, 83:435-445). After treatment is completed, however, normal B-cells can be regenerated from CD20 negative B-cell precursors; therefore, patients treated with anti-CD20 therapy do not experience significant immunosuppression.

[0007] CD20 is expressed by malignant cells of B-cell origin, including B-cell lymphoma and chronic lymphocytic leukemia (CLL). CD20 is not expressed by malignancies of pre-B-cells, such as acute lymphoblastic leukemia. CD20 is therefore a good target for therapy of B-cell lymphoma, CLL, and other diseases in which B-cells are involved in the disease etiology. Other B-cell disorders include autoimmune diseases in which autoantibodies are produced during the differentiation of B-cells into plasma cells.

[0008] The use of monoclonal antibodies (mAb) targeting molecules preferentially expressed on the surface of a tumor cell is now a well-established therapeutic strategy, with at least 7 distinct mAb therapeutics approved and currently being used in cancer therapy:

Rituxan® (RITUXAN), trastuzumab, alemtuzumab, cetuximab, panitumumab, bevacizumab and gemtuzumab ozogamicin. Such mAb therapeutics mediate their anti-tumor activity via two distinct mechanisms. The first mechanism involves the mAb-mediated inhibition of the key receptor-ligand/counter-receptor interactions that contribute to the tumor growth and the second mechanism is dependent on the participation of the effector components of the host's immune system such as FcR^+ effector cells capable of mediating antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) and humoral factors such as complement capable of mediating complement-dependent cytotoxicity (CDC). In case of the latter, the mAb therapeutic must possess the capability to interact with the FcγRs on effector cells and complement. With the exception of EGFR-targeted panitumumab, each of the five immunotherapeutic mAb currently being used in cancer therapy possess the capability to engage the effector components of the immune system.

[0009] RITUXAN was the first mAb to be approved for clinical use in cancer. RITUXAN is a recombinant mouse human IgG1 chimeric mAb in which variable domains of the heavy and light chains of a murine anti-CD20 mAb were fused to the human constant regions of IgG1.

[0010] In addition, CD20 has also been targeted by radioimmunotherapeutic agents to treat B-cell related diseases. One treatment consists of anti-CD20 antibodies prepared in the form of radionuclides for treating B-cell lymphoma (e.g., ^{131}I-labeled anti-CD20 antibody), as well as a ^{89}Sr-labeled form for the palliation of bone pain caused by prostate and breast cancer metastases (Endo, *Gan To Kagaku Ryoho* 1999, 26: 744-748).

[0011] In one study, RITUXAN was tested for safety, tolerability and preliminary clinical efficacy for the treatment of 18 patients with Systemic Lupus Erythematosus (SLE) (who were non-immunosuppressed patients). Of the 18 patients treated, six patients received one infusion of RITUXAN at 100 mg/m^2 (low dose), six patients received one infusion of RITUXAN at 375 mg/m^2 (medium dose), and six patients received four weekly infusions of RITUXAN at 375 mg/m^2 (high dose). Even at the low or medium dosage, three of the 12 patients (25%) developed elevated levels of human anti-chimera antibodies (HACA) at two months.

[0012] Accordingly, there is a need to develop novel CD20-specific binding molecules for therapy, preferably, novel CD20-specific binding molecules that do not cause, or have a reduced potential to cause, a HACA reaction when administered to patients who are not immunosuppressed. In addition, although there has been extensive research carried out

on antibody-based therapies, there remains a need in the art for compositions and methods to treat diseases associated with aberrant B-cell activity.

SUMMARY OF THE INVENTION

[0013] The invention relates to novel CD20 binding molecules that are useful in the diagnosis and treatment of B cell mediated diseases and conditions in a subject in need thereof including but not limited to B cell cancers, rheumatoid arthritis and lupus erythematosis. In various embodiments, the invention provides novel heavy chain CDR sequences, light chain CDR sequences, novel variable domain sequences comprising the CDR sequences and CD20 binding molecules comprising a novel CDR or variable domain sequence, nucleic acids, vectors, host cells, compositions and kits comprising the CDRs, binding domains or molecules comprising them. In some embodiments, the CD20 binding molecules comprising a novel CDR sequence or variable domain is an antibody or an antigen-binding fragment thereof. In other embodiments, the CD20 binding molecule is a small modular immunopharmaceutical SMIP. In some embodiments, the antibody or SMIP is humanized and comprises human sequence framework and constant region sequences. The CD20 binding molecules of the invention bind CD20 on cell, show CDC and ADCC activity, deplete the CD19+ B cell in blood, bone marrow and lymph nodes, reduce B cell lymphoma tumor growth, and/or reduce the progression and effects of disseminated lymphoma. The CD20 binding molecules of the invention also are useful to detect and quantify the presence of CD20 or cells expressing them, for example in a biological sample from a subject.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

[0014] Figure 1. Binding of anti-CD20 SMIPs to primary B cells. Primary B cells isolated from buffy coat were incubated with the indicated concentration of a variety of anti-CD20 SMIPs, as specified. Binding of SMIPs was analyzed by flow cytometry (MFI) using labeled anti-human IgG-PE antibody (Fc specific). Ec50 of each SMIP was calculated accordingly.

[0015] Figure 2. In Vitro Growth Inhibitory Effect of 018011 (also referred to as 18011 or 011, which are the identical molecule) against Human B–Cell Lymphomas.

[0016] Figure 3A-3B. Complement dependent Cytotoxicity assay of anti-CD20 SMIPs. A: Ramos B cells were incubated with anti-CD20 SMIPs in the presence of 10% human sera (Quidel) for 3.5 hours at 37°C. Cell death was measured by LDH release from cells (Promega kit). B: primary human B cells ($5X10^5$) isolated from buffy coat were pre-incubated with anti-human CD55 antibody (2 μg/ml) for 10 min at 37°C. Anti-CD20 SMIPs at the indicated concentrations and serum (10%) were then added. After 3.5-hour incubation, cell death was assessed by 7-AAD staining and flow cytometry analysis.

[0017] Figure 4A-4B. These in vitro studies demonstrate that 018011 binds in a dose-dependent manner to CD20+ B-cell lymphoma cells and is able to bring about both Fc-mediated cellular cytotoxicity as well as complement-dependent cytotoxicity against CD20+ B-cell lymphoma target cells. This demonstration of effector functional capability may be important to the ability of 018011 to inhibit growth of human B-cell lymphomas. A. Complement-Dependent Cytotoxicity of 018011 Against SU-DHL4 B-Cell Lymphoma Cells. B. Complement-Dependent Cytotoxicity of 018011 Against BJAB B-Cell Lymphoma Cells.

[0018] Figure 5. Antibody dependent cytotoxicity assay of anti-CD20 SMIPs. BJAB lymphoma cells were labeled with CFSE, then incubated with SMIPs and activated human PBMC. Cells were stained with PI and analyzed by flow cytometry. Only $CFSE^+$ cells were assessed for cell death.

[0019] Figure 6A-6B. A. Fc-mediated Cellular Cytotoxicity of 018011 Against SU-DHL4 B-cell Lymphoma. B. Fc-mediated Cellular Cytotoxicity of 018011 Against Ramos B-cell Lymphoma.

[0020] Figure 7. ADCC of CD20-SMIPs against Ramos B cells.

[0021] Figure 8. Depletion of peripheral CD19+ B Cells in non-human primate. Both 2LM 20-4 and 2LM 20-4 mut Fc demonstrated effective depletion of peripheral CD19+ B cells in non-human primate that is at least comparable to Rituxan.

[0022] Figure 9. Depletion of bone marrow CD19+ B Cells in non-human primate. Both 2LM 20-4 and 2LM 20-4 mut Fc demonstrated effective depletion of bone marrow CD19+ B cells in non-human primate that is at least comparable to Rituxan.

[0023] Figure 10. Depletion of Lymph Node CD19+ B Cells in non-human primate. Both 2LM 20-4 and 2LM 20-4 mut Fc demonstrated effective depletion of lymph node CD19+ B cells in non-human primate that is at least comparable to Rituxan.

[0024] Figure 11. Pharmacokinetic (PK) analysis of 2LM 20-4 and 2LM 20-4 mut Fc in cynomolgus monkeys after IV administration. PK profiles of 2LM 20-4 and 2LM 20-4 mut Fc are comparable to that of Rituxan.

[0025] Figure 12. Effect of 018011 and Rituximab on Ramos Subcutaneous Xenografts Established in Balb/c Nude Mice.

[0026] Figure 13. Survival Analysis of 018011 and Rituximab on Ramos Subcutaneous Xenografts Established in Balb/c Nude Mice.

[0027] Figure 14. Effect of 018011, TRU-015 and Rituximab on Ramos Subcutaneous Xenografts Established in nu/nu Nude Mice.

[0028] Figure 15. Survival Analysis of 018011, TRU-015 and Rituximab on Ramos Subcutaneous Xenografts Established in nu/nu Nude Mice.

[0029] Figure 16. Survival Analysis of 018011, TRU-015- and Rituximab-treated Scid Mice with Disseminated Ramos B Cell Lymphoma.

[0030] Figure 17. Detection of Human B Lymphoma Cells in Bone Marrow of Scid Mice with Disseminated Disease.

[0031] Figure 18. Survival Analysis of 018011-, TRU-015-, and Rituximab-treated Scid Mice with Disseminated WSU-DLCL2 Diffuse Large Cell Lymphoma.

[0032] Figure 19. Effect of 018011 Administered either Intravenously or Intraperitoneally on the Growth of Ramos Subcutaneous Xenografts.

[0033] Figure 20. Effect of 018011 and Rituximab on Non-irradiated and Irradiated Ramos Subcutaneous Xenografts.

[0034] Figure 21A-21C. Mean Tumor Volumes Over Time. On study Day 0, nude mice bearing palpable Ramos tumors were sorted into treatment groups (n=8/group) such that the mean tumor volume for each group was equivalent. Mice were treated IV on days 0, 2, 4, 6, and 8 with 100 μg of human IgG, TRU-015, 018008 (also referred to as 18008 or 008, which are the identical molecule), 018011, or 2Lm20-4. Tumors were measured on the indicated days with a caliper and tumor volume was calculated using the formula: $V=\frac{1}{2}[\text{length} \times (\text{width})^2]$. Once an animal was taken out of the study due to tumor volume exceeding specified limits, the value for the last tumor volume was carried forward. Results are shown only through day 10, when the last control mice were sacrificed.

[0035] Figure 22A-22C. Tumor Volumes of Individual Mice at an Early Time Point. Mice were treated and monitored, and tumor volumes were determined as described in the legend to Figure 21. Results are shown in terms of tumor volume of individual mice on day 8 (the last time point in which all mice were alive) (**i**) or relative tumor volume of individual mice on day 8 relative to day 0 (**ii**). Significant differences among groups were determined using a one-way ANOVA with Dunnett's multiple comparison post test (for comparison with huIgG treated controls) and Tukey's multiple comparison post test (for all other pairwise comparisons); p values for all pair wise comparisons are indicated.

[0036] Figure 23A-23C. Survival Percentages of Mice Treated with TRU-015 or HuCD20 SMIPs. Mice were treated and monitored, and tumor volumes were determined as described in the legend to Figure 21. Tumor volumes were determined at least 3 times a week (M W F) with the exception that monitoring was switched to once per week during time periods when all mice remaining in the study had no palpable tumors. Mice were sacrificed when tumor volumes reached more than 1500 mm^3 (or 1200 mm^3 on Fridays). No mice were found dead or sacrificed for other reasons.

[0037] Figure 24A-24C. Percentage of Tumor-Free Mice Over Time. Mice were treated and monitored, and tumor volumes were determined as described in the legend to Figure 21. A mouse was considered "tumor-free" if it had no palpable tumor. Tumor volumes were determined at least 3 times a week (M W F) with the exception that monitoring was switched to once per week during time periods when all mice remaining in the study had no palpable tumors.

[0038] Figure 25A-25C. Mean Body Weights of Mice Over Time. Mice were treated and monitored as described in the legend to Figure 21. Body weights were determined on the indicated days of the study.

[0039] Figure 26. Flow Cytometric Evaluation of 018011 or Rituximab Bound to Cells Isolated from Ramos B-cell Lymphoma Xenografts.

[0040] Figure 27. In Vitro Growth Inhibitory Effect of 018011 against Human B–Cell Lymphomas.

[0041] Figure 28. Effect of Cross-linking of 018011 on Activation-induced Death of Ramos B-Cell Lymphoma Cells.

[0042] Figure 29 is a table summarizing amino acid residues at several key positions of the exemplary humanized SMIPs. Residues listed under the "Hinge" column depict the residues for positions 220, 226, 229 and 230 of SEQ ID NO: 60. Residue 331 in the "IgG1 Fc" column refers to residue 331 in SEQ ID NO: 61.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

I. Definitions

[0043] In order that the present invention may be more readily understood, certain terms are first defined. Additional definitions are set forth throughout the detailed description.

[0044] A "CD20 binding molecule" according to various embodiments of the invention is a molecule comprising a CD20-binding portion of the humanized CD20 binding molecule specifically exemplified herein. A type of CD20 binding molecule contemplated by the invention is an antibody or a CD20-binding fragment thereof. A binding molecule may be modified according to methods standard in the art, for example, to improve its binding affinity, to improve its specificity, to diminish its immunogenicity, to alter its effector functions and/or to improve its availability in the body of an individual. Such modifications may include, for example, amino acid sequence modifications or expression as a fusion protein. Such fusion proteins are also binding molecules according to the invention. An exemplary binding molecule of the invention is a small modular immunopharmaceutical (SMIP).

[0045] The term "antibody" refers to an immunoglobulin or fragment thereof, and encompasses any such polypeptide comprising an antigen-binding fragment of an antibody. The term includes but is not limited to polyclonal, monoclonal, monospecific, polyspecific, humanized, human, single-chain, chimeric, synthetic, recombinant, hybrid, mutated, grafted, and *in vitro* generated antibodies.

[0046] The term "antibody" also includes antigen-binding fragments of an antibody. Examples of antigen-binding fragments include, but are not limited to, Fab fragments (consisting of the V_L, V_H, C_L and C_H1 domains); Fd fragments (consisting of the V_H and C_H1 domains); Fv fragments (referring to a dimer of one heavy and one light chain variable domain in tight, non-covalent association); dAb fragments (consisting of a V_H domain); isolated CDR regions; $(Fab')_2$ fragments, bivalent fragments (comprising two Fab fragments

linked by a disulphide bridge at the hinge region), scFv (referring to a fusion of the V_L and V_H domains, linked together with a short linker), and other antibody fragments that retain antigen-binding function. The part of the antigen that is specifically recognized and bound by the antibody is referred to as the "epitope."

[0047] An antigen-binding fragment of an anti-CD20 antibody of the invention can be produced by conventional biochemical techniques, such as enzyme cleavage, or recombinant DNA techniques known in the art. These fragments may be produced by proteolytic cleavage of intact antibodies by methods well known in the art, or by inserting stop codons at the desired locations in the vectors using site-directed mutagenesis, such as after C_H1 to produce Fab fragments or after the hinge region to produce $(Fab')_2$ fragments. For example, Papain digestion of antibodies produces two identical antigen-binding fragments, called "Fab" fragments, each with a single antigen-binding site, and a residual "Fc" fragment. Pepsin treatment of an antibody yields an $F(ab')_2$ fragment that has two antigen-combining sites and is still capable of cross-linking antigen. Single chain antibodies may be produced by joining V_L and V_H coding regions with a DNA that encodes a peptide linker connecting the V_L and V_H protein fragments

[0048] "*In vitro* generated antibody" refers to an antibody where all or part of the variable region (e.g., at least one CDR) is generated in a non-immune cell selection (e.g., an *in vitro* phage display, protein chip or any other method in which candidate sequences can be tested for their ability to bind to an antigen). This term excludes sequences generated by genomic rearrangement in an immune cell.

[0049] An antigen-binding fragment/domain may comprise an antibody light chain variable region (V_L) and an antibody heavy chain variable region (V_H); however, it does not have to comprise both. Fd fragments, for example, have two V_H regions and often retain some antigen-binding function of the intact antigen-binding domain. Examples of antigen-binding fragments of an antibody include (1) a Fab fragment, a monovalent fragment having the V_L, V_H, C_L and C_H1 domains; (2) a $F(ab')_2$ fragment, a bivalent fragment having two Fab fragments linked by a disulfide bridge at the hinge region; (3) a Fd fragment having the two V_H and C_H1 domains; (4) a Fv fragment having the V_L and V_H domains of a single arm of an antibody, (5) a dAb fragment (Ward et al., (1989) *Nature* 341:544-546), that has a V_H domain; (6) an isolated complementarity determining region (CDR), and (7) a single chain Fv (scFv). Although the two domains of the Fv fragment, V_L and V_H, are coded for by separate genes, they can be joined, using recombinant DNA methods, by a synthetic linker that enables them to be made as a single protein chain in which the V_L and V_H regions pair to

form monovalent molecules (known as single chain Fv (scFv); see e.g., Bird et al. (1988) *Science* 242:423-426; and Huston et al. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883). These antibody fragments are obtained using conventional techniques known to those with skill in the art, and the fragments are evaluated for function in the same manner as are intact antibodies.

[0050] The term "human antibody" includes antibodies having variable and constant regions corresponding substantially to human germline immunoglobulin sequences known in the art, including, for example, those described by Kabat et al. (See Kabat, et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242). The human antibodies of the invention may include amino acid residues not encoded by human germline immunoglobulin sequences (e.g., mutations introduced by random or site-specific mutagenesis *in vitro* or by somatic mutation *in vivo*). The human antibody can have at least one, two, three, four, five, or more positions replaced with an amino acid residue that is not encoded by the human germline immunoglobulin sequence. CDRs are as defined by Kabat or in Chothia C, Lesk AM, Canonical structures for the hypervariable regions of immunoglobulins, J Mol Biol. 1987 Aug 20;196(4):901-17. CDRs typically refer to regions that are hypervariable in sequence and/or form structurally defined loops, for example, Kabat CDRs are based on sequence variability, as described in *Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Department of Health and Human Services* (1991), eds. Kabat *et al*, or alternatively, to the location of the hypervariable structural loops as described by Chothia. *See, e.g.*, Chothia, D. *et al.* (1992) *J. Mol. Biol.* 227:799-817; and Tomlinson et al. (1995) *EMBO J.* 14:4628-4638. Still another standard is the AbM definition used by Oxford Molecular's AbM antibody modelling software, which defines the contact hypervariable regions based on crystal structure. See, generally, e.g., *Protein Sequence and Structure Analysis of Antibody Variable Domains.* In: *Antibody Engineering Lab Manual* (Ed.: Duebel, S. and Kontermann, R., Springer-Verlag, Heidelberg). Embodiments described with respect to Kabat CDRs can alternatively be implemented using similar described relationships with respect to Chothia hypervariable loops or to the AbM-defined loops.

[0051] The term "effective amount" refers to a dosage or amount that is sufficient over a course of therapy to reduce any CD20 activity, to ameliorate one or more clinical symptoms or achieve a desired biological outcome.

[0052] The phrase "inhibit" or "antagonize" CD20 activity and its cognates refer to a reduction, inhibition, or otherwise diminution of at least one activity of CD20 due to

binding a CD20-specific binding molecule, wherein the reduction is relative to the activity of CD20 in the absence of the same molecule. Inhibition or antagonism does not necessarily indicate a total elimination of the CD20 biological activity. A reduction in activity may be at least about 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, or more.

[0053] The term "isolated" refers to a molecule that is substantially free of its natural environment. For instance, an isolated protein is substantially free of cellular material or other proteins from the cell or tissue source from which it was derived. The term also refers to preparations where the isolated protein is sufficiently pure for pharmaceutical compositions; or at least 70% (w/w) pure; or at least 80% (w/w) pure; or at least 90% pure; or at least 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, or 100% (w/w) pure.

[0054] The term "therapeutic agent" is a substance that treats or assists in treating a medical disorder. Therapeutic agents may include, but are not limited to, anti-proliferative agents, anti-cancer agents including chemotherapeutics, anti-virals, anti-infectives, immune modulators, and the like that modulate immune cells or immune responses in a manner that complements the reduction of the CD20 activity by the CD20-specific binding molecules of the invention. Non-limiting examples and uses of therapeutic agents are described herein.

[0055] As used herein, a "therapeutically effective amount" of a CD20-specific binding molecule refers to an amount of a CD20-specific binding molecule that is effective, upon single or multiple dose administration to a subject (such as a human patient) at treating, preventing, curing, delaying, reducing the severity of, and/or ameliorating at least one symptom of a disorder or recurring disorder, or prolonging the survival of the subject beyond that expected in the absence of treatment. When applied to an individual active ingredient, administered alone, a therapeutically effective dose refers to that ingredient alone. When applied to a combination, a therapeutically effective dose refers to combined amounts of the active ingredients that result in the therapeutic effect, whether administered in combination, serially or simultaneously. The invention specifically contemplates that one or more CD20-specific binding molecules may be administered according to methods of the invention, each in an effective dose.

[0056] The term "treatment" or 'treating" refers to a therapeutic, preventative or prophylactic measures. A therapeutic treatment may improve at least one symptom of disease in an individual receiving treatment or may delay worsening of a progressive disease in a individual, or prevent onset of additional associated diseases. The treatment may be administered to a subject having a medical disorder or who ultimately may acquire the disorder, to prevent, cure, delay, reduce the severity of, and/or ameliorate one or more

symptoms of the disorder or recurring disorder, or in order to prolong the survival of a subject beyond that expected in the absence of treatment.

[0057] The term "human CD20" is intended to refer to the human B lymphocyte-restricted differentiation antigen (also known as Bp35). CD20 is expressed during early pre-B cell development and remains until plasma cell differentiation. The CD20 molecule may regulate a step in the activation process which is required for cell cycle initiation and differentiation, and is usually expressed at very high levels on neoplastic B cells. CD20 is present on both "normal" B cell as well as "malignant" B cells (i. e. those B cells whose unabated proliferation can lead to B cell lymphoma).

II. CD20-specific binding molecules

According to the invention, the CD20 binding molecules bind CD20 on primary B cells and on B cell lymphoma cell lines including NU-DHL1, Ramos, SU-DHL4, SU-DHL5, and WSU-DLCL2. In various embodiments, the CD20 binding molecules bind CD20 expressing cells with an EC50 comparable to the EC50 shown in Figure 1 and/or bind in a dose-dependent manner. In various embodiments, the CD20 binding molecules possess one or more properties selected from: complement mediated cytotoxicity (CDC) in primary B cells and in at least Ramos, SU-DHL4 and BJAB cells, in some cases with at least 40% cytotoxicity; antibody-dependent (or Fc-dependent cyotoxicity (ADCC or FcCC) in at least Ramos, BJAB and SU-DHL4 cells, that is dose-dependent and in some cases with at least 40% cytotoxicity; maintains CD19+ B cell depletion in bone marrow and lymph nodes for a longer duration than RITUXAN® or for longer than 8 days and for at least 10, 12, 14, 16, 18, 20 or 21 days; reduces the growth established xenograft tumors in a mouse model as described in the Examples and is protective when administered in the early stages of disseminated lymphoma in various mouse models, as described in the Examples.

[0058] In some embodiments, the α-CD20 binding molecules are Small Modular - ImmunoPharmaceuticals (SMIPs). In one aspect, the invention provides humanized CD20-specific binding molecules. Applicants have provided 57 novel CD20-specific binding molecules that are useful for treatment of mammalian subjects, including humans and domestic animals. The invention also provides nucleic acid sequences encoding CD20-specific binding molecules.

[0059] In certain embodiments, the CD20-specific binding molecules of the invention have a high binding affinity, a low dissociation rate, and specifically bind to human CD20.

[0060] In certain embodiments, the humanized CD20-specific binding molecules of the invention are antibodies, in particular anti-CD20 monoclonal antibodies (mAbs), or antigen-binding fragments thereof.

[0061] A chimeric antibody is an antibody having portions derived from different antibodies. For example, a chimeric antibody may have a variable region and a constant region derived from two different antibodies. The donor antibodies may be from the same or different species. In certain embodiments, the variable region of a chimeric anti-CD20 antibody of the invention is non-human, e.g., murine, (or a combination of non-human and human) and the constant region is human.

[0062] The humanized CD20 binding molecules of the invention also include CDR grafted humanized anti-CD20 antibodies. In one embodiment, the humanized antibody comprises heavy and/or light chain CDRs of a humanized anti-CD20 SMIP of the invention (SEQ ID NOS: 1-59) and heavy chain and light chain frameworks and constant regions of a human acceptor immunoglobulin. Methods of making humanized antibodies are disclosed in U.S. Pat. Nos: 5,530,101; 5,585,089; 5,693,761; 5,693,762; and 6,180,370 each of which is incorporated herein by reference in its entirety.

[0063] Antigen-binding fragments of the antibodies of the invention, that retain the binding specificity of the intact antibody, are also included in the invention. Antigen-binding fragments include partial or full heavy chains or light chains, variable regions, or CDR regions of any CD20-specific antibodies described herein.

[0064] In some embodiments, a humanized CD20-specific antibody of the invention comprises the heavy chain CDR3, the light chain CDR3, or both, of any binding molecule exemplified in the sequence listing of the application. In embodiments comprising a HCDR3 and an LCDR3, they can be from the same molecule or different molecules in the sequence listing of the application. In some embodiments, a humanized CD20-specific antibody of the invention comprises the heavy chain CDR1, CDR2 and CDR3, the light chain CDR1, CDR2 and CDR3, or all six CDRs of a binding molecule exemplified in the sequence listing of the application or the HCDR1-3 and LCDR1-3 may be from different binding molecules in the sequence listing of the application. In some embodiments, a humanized CD20-specific antibody of the invention is an antibody comprising a heavy chain variable domain, a light chain variable domain or both, of a binding molecule exemplified in the sequence listing of the application. Also encompassed by the invention are humanized anti-CD20 antibodies comprising any V_H shown in the sequence listing of the application, any V_L shown in the sequence listing of the application, any combination of such V_H and V_L or any V_H/V_L pair

shown in the sequence listing of the application, or antigen binding portion of such antibodies.

[0065] In certain embodiments, a CD20-specific binding molecule of the invention is a CD20-specific, small modular immunopharmaceutical (SMIP).

[0066] A humanized anti-CD20 SMIP of the invention contains three modular domains: a binding domain, a hinge domain, and an effector domain. In some embodiments, the binding domain of an anti-CD20 SMIP of the invention comprises a V_H domain and a V_L domain. The hinge domain of an anti-CD20 SMIP of the invention performs two complementary functions by providing a flexible link between the binding domain and effector domain while also controlling association, or multimerization, of the SMIPs. The effector domain of a humanized anti-CD20 SMIP of the invention can comprise e.g., an human antibody Fc domain, or a non-antibody protein with effector function. The effector domain determines which type of immune cell is activated and regulates the balance of effector functions employed, including the relative activity of antibody dependent cellular cytotoxicity (ADCC) or complement dependent cytotoxicity (CDC). Effector domains also can be engineered to regulate SMIP drug multimerization.

[0067] The binding domain of a SMIP of the invention may have one or more binding regions, such as variable light chain and variable heavy chain binding regions derived from one or more immunoglobulins. These regions are typically separated by linker peptides, which may be any linker peptide known in the art to be compatible with domain or region joinder. Exemplary linkers are linkers based on the Gly_4Ser linker motif, such as $(Gly_4Ser)n$, where n=1-5 or any linker shown in the sequence listing of the application. Any suitable linker can be used in the context of the present invention, examples of which are described in WO 2007/146968.

[0068] In some embodiments, the binding domain comprises a humanized single chain immunoglobulin-derived Fv product, which may include all or a portion of at least one immunoglobulin light chain variable region and all or a portion of at least one immunoglobulin heavy chain variable region, joined by a linker.

[0069] The hinge domain of a humanized anti-CD20 SMIP of the invention may be a naturally occurring peptide, a mutated or genetically engineered peptide, or an artificial peptide. For example, the hinge region may be derived from an immunoglobulin hinge region (e.g., portions of the immunoglobulin heavy chain sequence that is responsible for forming intra-chain immunoglobulin-domain disulfide bonds in C_H1 and C_H2 regions). The hinge region may also may be a fragment of (e.g., 5-65 amino acids, 10-50 amino acids, 15-

35 amino acids, 18-32 amino acids, 20-30 amino acids, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28 or 29 amino acids) an immunoglobulin polypeptide chain region classically regarded as having hinge function. The hinge domain may also include amino acids located (according to structural criteria for assigning a particular residue to a particular domain that may vary, as known in the art) in an adjoining immunoglobulin domain, such as the C_H1 domain, the C_H2 domain, or the variable domain.

[0070] The hinge domain of a humanized anti-CD20 SMIP of the invention may be a human hinge region, i.e., the hinge region of the heavy chain of a human antibody. In embodiments comprising a human hinge region, the hinge region may be from any human immunoglobulin isotype, such a human IgG immunoglobulin (i.e., a human IgG1, IgG2, IgG3, or IgG4). In certain embodiments, the hinge domain comprises zero or one cysteine residue. In some embodiments, a humanized anti-CD20 SMIP of the invention comprises a hinge shown in any one of SEQ IDS 60 or 63 to 66.

[0071] A humanized anti-CD20 SMIP of the invention contains sufficient amino acid sequence of a constant region of an immunoglobulin to provide an effector function, preferably ADCC and/or CDC. For example, the effector domain may comprise the sequence of a human immunoglobulin C_H2 domain, or may comprise human immunoglobulin C_H2 and C_H3 domains. In embodiments comprising C_H2 and C_H3 domains, the domains may be from the same or different human immunoglobulins. In other embodiments, the effector domain may comprise the sequences of a human immunoglobulin IgE C_H3 and C_H4 regions.

[0072] In certain embodiments, the CD20-binding domain of the SMIPs of the invention comprises a V_H amino acid sequence, a V_L amino acid sequence, any of both a V_H and a V_L amino acid sequence or a V_H/V_L pair set forth in SEQ ID NOs: 1-59. In certain embodiments, the hinge domain of the SMIPs of the invention comprises an amino acid sequence as set forth in SEQ ID NO: 60. In certain embodiments, the effector domain of the SMIPs of the invention comprises an amino acid sequence as set forth in SEQ ID NO: 60 or 61.

[0073] In certain embodiments, the CD20-binding domain of the SMIPs of the invention comprises a V_H region with human immunoglobulin framework sequences and the heavy chain CDR1, CDR2, and CDR3 amino acid sequences light chain CDR1, CDR2, and CDR3 amino acid sequences, or both, of the CD20-binding domain of a SMIP selected from SEQ ID NOs: 1-59. In certain embodiments, the SMIP hinge domain further comprises SEQ ID NO: 60, and the effector domain comprises SEQ ID NO: 61.

[0074] The invention provides numerous heavy chain V_H, light chain V_L, and CDR sequences useful for generating CD20-specific binding molecules. For example, one or more of the CDRs shown in the sequence listing of the application can be combined with a human framework sub-region (e. g. , a fully human FR1, FR2, FR3, or FR4) to generate a CD20-specific binding molecule. In certain embodiments, the CD20-specific binding molecules of the invention comprise three CDRs from a light chain variable region, and three CDRs from a heavy chain variable region, wherein the heavy chain CDRs and the light chain CDRs are from the same reference sequence. The CDRs of the invention may be grafted to any type of immunoglobulin frameworks.

[0075] The invention also provides humanized CD20-specific binding molecules comprising an amino acid sequence that is substantially identical or substantially homologous to a sequence shown in the sequence listing of the application, and humanized CD20-specific binding molecules comprising CDRs that are substantially identical or substantially homologous to the CDR sequences (underlined) shown in The sequence listing of the application. For example, a number of amino acids or nucleotide bases may be changed in the sequences shown in the sequence listing of the application, in particular in one or more CDRs, framework regions, or both. Accordingly, in some embodiments, a CD20-specific binding molecule of the invention has an amino acid sequence that is at least 80% identical to a sequence as set forth in SEQ ID NOs 1-59. In other embodiments, the amino acid sequence is 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% identical to a sequence the sequence of as set forth in SEQ ID NOs 1-59. Any suitable linker can be used in the context of the present invention, examples of which are described in WO 2007/146968.

[0076] Sequences substantially identical or homologous (e.g., at least about 85% sequence identity) to the sequences disclosed herein are also part of this application. In some embodiment, the sequence identity can be about 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% or higher. Alternatively, in connection with nucleic acids, substantial identity or homology exists when the nucleic acid segments will hybridize under selective hybridization conditions (e.g., highly stringent hybridization conditions), to the complement of the strand. The nucleic acids may be present in whole cells, in a cell lysate, or in a partially purified or substantially pure form.

[0077] Changes to the amino acid sequence may be generated by changing the nucleic acid sequence encoding the amino acid sequence. A nucleic acid sequence encoding a variant of a given CDR may be prepared by methods known in the art using the guidance of the present specification for particular sequences. These methods include, but are not limited

to, preparation by site-directed (or oligonucleotide-mediated) mutagenesis, PCR mutagenesis, and cassette mutagenesis of an earlier prepared nucleic acid encoding the CDR, all of which are techniques well known in the art. For example, site-directed mutagenesis may be used to prepare substitution variants (see, e. g., Carter et al. , (1985) Nucleic Acids Res. 13: 4431-4443 and Kunkel et. al. , (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 488-492, both of which are hereby incorporated by reference).

[0078] In another aspect, the invention provides nucleic acids encoding an anti-CD20 binding molecule of the invention. In some embodiments, the nucleic acid encodes a polypeptide comprising the V_H or V_L, amino acid sequence set forth in any one of SEQ ID NOS: 1-59, or encodes a polypeptide comprising the amino acid sequence of any one of SEQ ID NOS: 1-59. In some embodiments, the nucleic acid is any one of SEQ ID NOS: 67-126 or a fragment of one of those sequences encoding a V_H region or a V_L region.

III. Producing CD20 Binding Molecules

[0079] The humanized CD20-specific binding molecules of the invention can be prepared, for example, by recombinant DNA technologies. For example, in the case of an antibody, or an antigen-binding fragment thereof of the invention, a host cell may be transfected with one or more recombinant expression vectors carrying DNA fragments encoding the immunoglobulin light and heavy chains of the antibody, or an antigen-binding fragment of the antibody, such that the light and heavy chains are expressed in the host cell and, preferably, secreted into the medium in which the host cell is cultured, from which medium the antibody can be recovered. In the case of a SMIP, a nucleic acid encoding the SMIP is introduced into and expressed in a host cell.

[0080] Standard recombinant DNA methodologies may be used to obtain antibody heavy and light chain genes or a nucleic acid encoding the SMIP, incorporate these genes into recombinant expression vectors and introduce the vectors into host cells, such as those described in Sambrook, Fritsch and Maniatis (eds), Molecular Cloning; A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor, N. Y.,(1989), Ausubel, F. M. et al. (eds.) Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates, (1989) and in U. S. Pat. No. 4,816, 397 by Boss et al. , all of which are herein incorporated by reference.

[0081] For example, to express an antibody, or an antigen-binding fragment thereof, of the invention, nucleic acids encoding the light and heavy chain variable regions may be first obtained. These nucleic acids can be obtained by amplification and modification of human germline light and heavy chain variable region genes using the polymerase chain

reaction (PCR). Germline DNA sequences for human heavy and light chain variable region genes are known in the art. Once the V_H and V_L fragments are obtained, these sequences can be genetically engineered to encode, for example, one or more of the SMIP sequences, the V_H and the V_L fragments of the SMIP sequences, or the CDRs of the SMIP sequences disclosed herein (see, e. g., the sequence listing of the application).

[0082] To express the antibodies of the invention or antigen-binding fragments thereof, one or more nucleic acids encoding partial or full-length light and heavy chains or in the case of SMIPs, a nucleic acid encoding the SMIP may be inserted into an expression vector or vectors such that the nucleic acids are operably linked to transcriptional and translational control sequences. The expression vector and expression control sequences are generally chosen to be compatible with the expression host cell used.

[0083] In addition to the antibody heavy chain and/or light chain genes, the recombinant expression vectors of the invention may additionally carry regulatory sequences that control the expression of the antibody chain(s) (or fragments) or SMIPs in a host cell, such as promoters, enhancers or other expression control elements (e. g. , polyadenylation signals) that control the transcription or translation of the nucleic acid(s) encoding the binding molecule of the invention. Such regulatory sequences are known in the art (see, e.g., Goeddel, Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego,Calif. (1990), herein incorporated by reference). It will be appreciated by those skilled in the art that the design of the expression vector, including the selection of regulatory sequences may depend on such factors as the choice of the host cell to be transformed, the level of expression of protein desired, etc. Exemplary regulatory sequences for mammalian host cell expression include viral elements that direct high levels of protein expression in mammalian cells, such as promoters and/or enhancers derived from cytomegalovirus (CMV) (such as the CMV promoter/enhancer), Simian Virus 40 (SV40) (such as the SV40 promoter/enhancer),adenovirus, (e. g. , the adenovirus major late promoter (AdMLP)) and polyoma virus. For further description of viral regulatory elements, and sequences thereof, see e. g. , U. S. Pat. No. 5,168, 062 by Stinski, U. S. Pat. No. 4,510, 245 by Bell et al. and U. S. Pat. No. 4,968, 615 by Schaffner et al. , all of which are herein incorporated by reference.

[0084] In addition to sequences encoding the antibody heavy chain and/or light chain or SMIP of the invention and regulatory sequences, the recombinant expression vectors of the invention may carry additional sequences, such as sequences that regulate replication of the vector in host cells (e. g. , origins of replication) and selectable marker genes. The

selectable marker gene facilitates selection of host cells into which the vector has been introduced (see

e. g., U. S. Pat. Nos. 4,399, 216,4, 634.665 and 5,179, 017, all byAxel et al.). For example, typically the selectable marker gene confers resistance to drugs, such asG418, hygromycin or methotrexate, on a host cell into which the vector has been introduced. Other suitable selectable marker genes include the dihydrofolate reductase (DHFR) gene (for use in dhfr- host cells with methotrexate selection/amplification) and the neomycin gene (for G418 selection).

[0085] For expression, the expression vector(s) encoding the antibody heavy and light chains or the SMIP may be transfected into a host cell by standard techniques, such as electroporation, calcium-phosphate precipitation, or DEAE-dextran transfection. In certain embodiments, the expression vector used to express the CD20-specific binding molecules of the invention are viral vectors, such as retro-viral vectors. Such viral vectors may also be used to generate stable cell lines (as a source of a continuous supply of the CD20-specific binding molecules).

[0086] Suitable mammalian host cells for expressing the recombinant humanized anti-CD20 binding molecules of the invention include PER.C6 cells (Crucell, The Netherlands), Chinese Hamster Ovary (CHO cells) (includingdhfr-CHO cells, described in Urlaub and Chasin, (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 4216-4220, used with a DHFR selectable marker, e. g. , as described in R. J. Kaufman and P. A. Sharp (1982) Mol. Biol. 159: 601-621), NS0 myeloma cells, COS cells and SP2 cells. Additionally, host cells express GnTin (described in W09954342 and U. S. Pat. Pub. 20030003097, both herein incorporated by reference) may also be used, such that expressed CD20-specific binding molecules have increased ADCC activity.

[0087] When recombinant expression vectors encoding the antibody or SMIP are introduced into mammalian host cells, the antibodies and SMIPs are generally produced by culturing the host cells for a period of time sufficient to allow for expression of the protein in the host cells or, more preferably, secretion of the antibody or antigen-binding fragment or the SMIP into the culture medium in which the host cells are grown. The anti-CD20 binding molecule can be recovered from the culture medium using standard protein purification methods.

[0088] It will be understood that variations on the above procedure are within the scope of the present invention. For example, recombinant DNA technology may be used to remove some or all of the DNA encoding either or both of the light and heavy chains that is

not necessary for binding to CD20. In addition, bi-functional antibodies may be produced in which one heavy and one light chain are an antibody of the invention and the other heavy and light chain are specific for an antigen other than CD20 (e. g., by crosslinking an antibody of the invention to a second antibody by standard chemical crosslinking methods).

[0089] Methods for making SMIPs have been described in U. S. Patent Publication Nos. 2003/0133939, 2003/0118592, and 2005/0136049, which are incorporated herein by reference in their entirety. In certain embodiments, SMIPs of the invention are binding domain-immunoglobulin fusion proteins that feature (1) a binding domain for a cognate structure (such as an antigen, a counterreceptor or the like), (2) an IgG1, IGA or IgE hinge region or a mutant IgG1 hinge region having either zero, one or two cysteine residues, and (3) immunoglobulin C_H2 and C_H3 domains. In certain embodiments, the binding domain comprises one or two cysteine (Cys) residues in the hinge region. In certain embodiments, when the binding domain comprises two Cys residues, the first Cys, which is involved in binding between the heavy chain and light chain, is not deleted or substituted with another amino acid.

[0090] The humanized anti-CD20 SMIPs of the invention are related to a chimeric anti-CD20 SMIP, TRU-015, which is a recombinant (murine/human) single chain protein that binds to the CD20 antigen, as described in US 2007/0213293. The binding domain of TRU-015 was based onthe publically available 2H7 binding domais. The binding domain is connected to the effector domain, the C_H2 and C_H3 domains of human IgG1 through a modified CSS hinge region.

IV. Therapeutic Uses

[0091] In another aspect, the invention provides a method of treating a subject having or suspected of having a disease associated with aberrant B-cell activity, comprising administering to a patient a therapeutically effective amount of a humanized CD20-specific binding molecule of the invention. In one embodiment, the CD20-specific binding molecule is a CD20-specific small, modular immunopharmaceutical (SMIP).

[0092] "Aberrant B-cell activity" refers to cell activity that deviates from the normal, proper, or expected course. For example, aberrant cell activity may include inappropriate proliferation of cells whose DNA or other cellular components have become damaged or defective. Aberrant B-cell activity may include cell proliferation whose characteristics are associated with a disease caused by, mediated by, or resulting in inappropriately high levels of cell division, inappropriately low levels of apoptosis, or both.

Such diseases may be characterized, for example, by single or multiple local abnormal proliferations of cells, groups of cells or tissue(s), whether cancerous or non-cancerous, benign or malignant, described more fully below. Aberrant B-cell activity may also include aberrant antibody production, such as production of autoantibodies, or overproduction of antibodies typically desirable at normal levels. It is contemplated that aberrant B-cell activity may occur in certain subpopulations of B-cells and not in other subpopulations. Aberrant B-cell activity may also include inappropriate stimulation of T-cells, such as by inappropriate B-cell antigen presentation to T-cells or by other pathways involving B-cells.

[0093] "A subject having or suspected of having a disease associated with aberrant B-cell activity" is a subject in which a disease or a symptom of a disease may be caused by aberrant B-cell activity, may be exacerbated by aberrant B-cell activity, or may be relieved by regulation of B-cell activity. Examples of such diseases are B cell cancers (such as B-cell lymphoma, a B-cell leukemia, a B-cell myeloma), a disease characterized by autoantibody production or a disease characterized by inappropriate T-cell stimulation, such as by inappropriate B-cell antigen presentation to T-cells or by other pathways involving B-cells.

[0094] In one aspect, an individual treated by methods of the invention demonstrates an improved response to treatment with the CD20-specific binding molecule described herein, which is improved over the response to other treatments, such as for example, ENBREL® (Amgen/Wyeth), HUMIRA® (Abbott), REMICADE® (Johnson&Johnson/Schering-Plough), RITUXAN® (Genentech/Roche), ocrelizumab (Genentech/Roche), ORENCIA® (BMS), ACTEMRA® (Roche/Chugai), CIMZIA® (UCB Pharma) for treatment of RA and RITUXAN® (Genentech/Roche), ocrelizumab (Genentech/Roche), belimumab (HGS), epratuzumab (Immunomedics/UCB), Humax CD20® (Genmab/GSK), atacicept (Zymogenetics), ORENCIA® (BMS), and ACTEMRA® (Roche/Chugai) for treatment of lupus (SLE). A response that is improved over other treatments refers to a clinical response wherein treatment by the method of the invention results in a clinical response in a patient that is better than the other therapy, either alone or in combination with other agents. An improved response is assessed by comparison of clinical criteria well-known in the art and described herein. Exemplary criteria include, but are not limited to, duration of B cell depletion, reduction in B cell numbers overall, reduction in B cell numbers in a biological sample, reduction in tumor size, reduction in the number of tumors existing and/or appearing after treatment, and improved overall response as assessed by patients themselves and physicians, e.g., using an International Prognostic Index. The improvement may be in one or more than one of the clinical criteria. An improved response

with the method of the invention may be due to an inadequate response to previous or current treatment, for example, because of toxicity (e.g., infusion related adverse events) and/or inadequate efficacy of the other treatment. In addition, there may be dosing regimen or schedules of the present inventive binding molecules that are improved (e.g., subcutaneous administration).

[0095] For example, treatment with a humanized CD20 SMIP produced a significant reduction in CD19+ B cells in the bone marrow and lymph nodes twenty-two days after treatment with the humanized CD20 SMIP compared to RITUXAN®. See Figures 9 and 10 and Example 4.

[0096] In rheumatoid arthritis, major cell types responsible for chronic inflammation and subsequent cartilage destruction and bone erosion in the joints are macrophages, synovial fibroblasts, neutrophils, and lymphocytes (Marrack et al., Nat Med. 2001;7:899-905). It has been demonstrated that T and B lymphocytes that infiltrate inflamed synovial tissues are often organized into structures that resemble lymphoid follicles (Berek & Kim, Semin Immunol. 1997;9:261-268; Berek &, Schroder, Ann N Y Acad Sci. 1997;815:211-217; Kim & Berek, Arthritis Res. 2000;2:126-131). Molecular analysis of B cells isolated from synovial follicular structures during rheumatoid arthritis demonstrated the importance of B cells in local antigen-driven specific immune responses and in increased production of rheumatoid factor (RF), the high-affinity antibodies with self-reactivity (Weyand & Goronzy, Ann N Y Acad Sci. 2003;987:140-149; Gause et al, BioDrugs. 2001;15:73-79). Positivity for RF is associated with more aggressive articular disease and a higher frequency of extra-articular manifestations (van Zeben et al., Ann Rheum Dis. 1992;51:1029-1035)

[0097] Evidence regarding the pathogenicity of B cells in RA has been recently obtained from clinical trials in patients with refractory disease by using B cell ablation with rituximab (Rituxan®), a human chimeric anti-CD20 monoclonal antibody (Leandro et al, Ann Rheum Dis. 2002;61:883-888; Edwards et al., N Engl J Med. 2004;350:2572-2581). In all groups treated with rituximab, a significantly higher proportion of patients had a 20 percent improvement in disease symptoms according to the ACR criteria. All ACR responses were maintained at week 48 in the rituximab–methotrexate group. In this study involving 161 patients with active RA, serious infections occurred in one patient (2.5 percent) in the control group and in four patients (3.3 percent) in the rituximab groups, indicating that B cell depletion is a relatively safe therapy in RA.

[0098] CD20 is a 35KD non-glycosylated tetraspanning cell membrane-embedded phosphoprotein, is restricted to the B-cell lineage and is expressed on pre-B cells, immature B cells, mature naive and memory B cells, but not on early pro-B cells and plasma cells. At present, the mechanism by which removal of pathogenic B cells and their precursors, but not antibody-secreting plasma cells, leads to clinical improvement remains elusive (Cragg et al., Therapy. Curr Dir Autoimmun 2005; 8:140-17410). Given that B cells exist as lymphoid aggregates within the synovium of RA patients, B cell functions other than antibody production (e.g., cytokine production, antigen presentation, provision of costimulatory signals to T cells) might also play an important role in disease pathogenesis (Martin & Chan, Immunity. 2004;20:517-527).

[0099] In vitro studies suggest that rituximab induces lysis of CD20-positive lymphoma cells through three possible mechanisms: ADCC, CDC and direct signaling leading to apoptosis (Clark & Ledbetter, Ann Rheum Dis 2005; 64:77-8012). Evidence in humans suggests that B cell lysis in SLE occurs likely via ADCC and apoptosis by engagement of FcγRIIIa (CD16) on natural killer cells and macrophages, since the degree of B cell depletion in SLE as well as the clinical response of lymphoma, depends upon FcγRIIIa polymorphism (Anolik et al., Arthritis Rheum 2003; 48:455-459).

[0100] Anti-CD20 therapy has also been tested in several other autoimmune disorders, including systemic lupus erythematosus (SLE), providing in the process novel insights into the role of B cells in autoimmunity (Eisenberg R., Arthritis Res Ther. 2003;5:157-159). A majority of SLE patients receiving rituximab demonstrate complete B cell depletion and clinical improvement (Anolik et al., Curr Rheumatol Rep. 2003;5:350-356). In contrast, those without B cell depletion do not respond to the treatment. The B cell number is usually lowest 1–3 months after the initial dose and this depletion lasts for 3–12 months.

[0101] Patients may develop human antichimeric antibody (HACA) after treatment, as rituximab is a chimeric antibody. In one study, 33% of patients treated with rituximab had high HACA titers (Looney et al., Curr Opin Rheumatol. 2004;16:180-185). Interestingly, these include patients who received only a single dose of rituximab. The HACAs are found to be associated with less effective B cell depletion, and lower serum levels of rituximab at 2 months after initial infusion.

[0102] Rituximab treatment induces an almost complete depletion of all peripheral blood B cell populations in patients with RA (Leandro et al., Arthritis Rheum 2006; 54:613-620). Failure to achieve 97% depletion of circulating B cells for at least 3 months in 1 patient

was associated with a lack of response to treatment. B cell repopulation of the peripheral blood was dependent upon the formation of naïve B cells, rather than the expansion of memory B cells. Patients who experienced an earlier disease relapse, at the time of B cell return, tended to show a higher number of circulating memory B cells at repopulation, as compared with patients whose relapse occurred later. Less extensive B cell depletion in solid tissues thus may be associated with an earlier relapse of RA.

[0103] The recent clinical successes of rituximab in autoimmunity indicate that there is need for the development of alternative B cell-targeting therapeutics that would be less immunogenic and could potentially delete all clonal remnants of pathologic autoreactive B cells in the hope of reestablishing immune tolerance.

[0104] Despite significant clinical responses seen in patients treated with existing CD20-targeted therapies, the therapeutic effects of these agents are not durable, and the frequency of disease relapse, particularly in lymphoma patients, remains high. CD20-targeted therapies are highly effective at depleting both normal and transformed B cells from circulation. However, their ability to ablate B cells embedded in tissues or in the lymphatics is more limited, possibly due to the reduced ability of large biomolecules to access these sites or to increased target cell resistance provided by the tissue microenvironment. Whatever the reason, these environments may provide a protected reservoir for surviving B cells or lymphoma cells that can reemerge subsequent to an apparently successful treatment regimen and give rise to disease relapse.

[0105] Treatment of non-human primates with the humanized SMIP followed by resection and analysis of tissues has demonstrated a superior capacity of the CD20 SMIP to eliminate tissue embedded B cells compared to control treatments. This, combined with a clear capacity to eliminate B cells from circulation, suggest that patients treated with this agent will respond favorably in the near term to effective B cell ablation, but moreover that efficacy following treatment will be of significantly greater duration as compared to current CD20-targeted therapies. For these agents, it appears that the depth of depletion in bone marrow and lymph node tissue is significant, indicating that these molecules may be able to deplete B cells efficiently in immunologically active, relevant areas. Thus, these molecules may provide a preferred therapy to treat a broader set of patients, including those in whom there is a need to enhance such efficacy.

[0106] In a related aspect, the individual treated by the methods of the invention is also administered RITUXAN. In one embodiment, RITUXAN may have been administered as a first line of treatment and continue when treatment with a method of the invention has

begun. In another embodiment, RITUXAN treatment is discontinued after treatment with a method of the invention has begun.

[0107] "A subject having or suspected of having a rheumatic disease" is a subject or individual affected by a disease or disorder of articular origin or of the musculoskeletal system, affecting such areas as joints, cartilage, muscles, nerves, and tendons. It is further contemplated that the subject having or suspected of having a rheumatic disease may have previously received therapy to treat a rheumatic disease. In one embodiment, the rheumatic disease includes, but is not limited to, rheumatoid arthritis, ankylosing spondylitis, dermatomyositis, Henoch Schonlein purpura, juvenile rheumatoid arthritis, psoriatic arthritis, Raynaud's syndrome, Reiter's syndrome, sarcoidosis, spondyloarthropathies, progressive systemic sclerosis and myositis.

[0108] "A subject having or suspected of having a central nervous system autoimmune disease" or "central nervous system disorder" is a subject or individual affected by a disease or disorder affecting the central nervous system, including the brain and spinal cord, or such areas as the optic nerve. It is further contemplated that subject having or suspected a central nervous system disorder may have previously received therapy to treat a central nervous system disorder. In one embodiment, the central nervous system autoimmune disease includes, but is not limited to, multiple sclerosis, allergic encephalomyelitis, neuromyelitis optica, lupus myelitis and lupus cerebritis.

[0109] "Vasculitis" refers to a disease or disorder associated with inflammation in a blood vessel. Exemplary vasculitis disorders include, but are not limited to, Behcet's disease, central nervous system vasculitis, Churg-Strauss syndrome, cryoglobulinemia, giant cell arteritis, Henoch Schonlein purpura, hypersensitivity vasculitis/angiitis, Kawasaki disease, leucocytoclastic vasculitis, polyantitis, polyarteritis nodosa, polymyalgia, polychondritis, rheumatoid vasculitis, Takayasu's arteritis, Wegener's granulamatosis, vasculitis due to hepatitis, familial Mediterranean fever, microscopic polyangiitis, Cogan's syndrome, Whiskott-Aldrich syndrome and thromboangiitis obliterans.

[0110] Methods contemplated by the invention are useful for treating diseases such as B cell cancers (for example, B-cell lymphomas, B-cell leukemias, B-cell lymphomas), diseases characterized by autoantibody production, or diseases characterized by inappropriate T-cells stimulation of T-cells, such as by inappropriate B-cell antigen to T-cells or by other pathways involving B-cells.

[0111] B-cell cancers include B-cell lymphomas (such as various forms of Hodgkin's disease, non-Hodgkins lymphoma (NHL) or central nervous system lymphomas),

leukemias (such as acute lymphoblastic leukemia (ALL), chronic lymphocytic leukemia (CLL), Hairy cell leukemia and chronic myoblastic leukemia) and myelomas (such as multiple myeloma). Additional B cell cancers include small lymphocytic lymphoma, B-cell prolymphocytic leukemia, lymphoplasmacytic lymphoma, splenic marginal zone lymphoma, plasma cell myeloma, solitary plasmacytoma of bone, extraosseous plasmacytoma, extra-nodal marginal zone B-cell lymphoma of mucosa-associated (MALT) lymphoid tissue, nodal marginal zone B-cell lymphoma, follicular lymphoma, mantle cell lymphoma, diffuse large B-cell lymphoma, mediastinal (thymic) large B-cell lymphoma, intravascular large B-cell lymphoma, primary effusion lymphoma, Burkitt lymphoma/leukemia, B-cell proliferations of uncertain malignant potential, lymphomatoid granulomatosis, and post-transplant lymphoproliferative disorder.

[0112] Disorders characterized by autoantibody production are often considered autoimmune diseases. Autoimmune diseases include, but are not limited to: arthritis, rheumatoid arthritis, juvenile rheumatoid arthritis, osteoarthritis, polychondritis, psoriatic arthritis, psoriasis, dermatitis, polymyositis/dermatomyositis, inclusion body myositis, inflammatory myositis, toxic epidermal necrolysis, systemic scleroderma and sclerosis, CREST syndrome, responses associated with inflammatory bowel disease, Crohn's disease, ulcerative colitis, respiratory distress syndrome, adult respiratory distress syndrome (ARDS), meningitis, encephalitis, uveitis, colitis, glomerulonephritis, allergic conditions, eczema, asthma, conditions involving infiltration of T cells and chronic inflammatory responses, atherosclerosis, autoimmune myocarditis, leukocyte adhesion deficiency, systemic lupus erythematosus (SLE), subacute cutaneous lupus erythematosus, discoid lupus, lupus myelitis, lupus cerebritis, juvenile onset diabetes, multiple sclerosis, allergic encephalomyelitis, neuromyelitis optica, rheumatic fever, Sydenham's chorea, immune responses associated with acute and delayed hypersensitivity mediated by cytokines and T-lymphocytes, tuberculosis, sarcoidosis, granulomatosis including Wegener's granulomatosis and Churg-Strauss disease, agranulocytosis, vasculitis (including hypersensitivity vasculitis/angiitis, ANCA and rheumatoid vasculitis), aplastic anemia, Diamond Blackfan anemia, immune hemolytic anemia including autoimmune hemolytic anemia (AIHA), pernicious anemia, pure red cell aplasia (PRCA), Factor VIII deficiency, hemophilia A, autoimmune neutropenia, pancytopenia, leukopenia, diseases involving leukocyte diapedesis, central nervous system (CNS) inflammatory disorders, multiple organ injury syndrome, mysathenia gravis, antigen-antibody complex mediated diseases, anti-glomerular basement membrane disease, anti-phospholipid antibody syndrome, allergic neuritis, Behcet disease, Castleman's syndrome,

Goodpasture's syndrome, Lambert-Eaton Myasthenic Syndrome, Reynaud's syndrome, Sjorgen's syndrome, Stevens-Johnson syndrome, solid organ transplant rejection, graft versus host disease (GVHD), pemphigoid bullous, pemphigus, autoimmune polyendocrinopathies, seronegative spondyloarthropathies, Reiter's disease, stiff-man syndrome, giant cell arteritis, immune complex nephritis, IgA nephropathy, IgM polyneuropathies or IgM mediated neuropathy, idiopathic thrombocytopenic purpura (ITP), thrombotic throbocytopenic purpura (TTP), Henoch-Schonlein purpura, autoimmune thrombocytopenia, autoimmune disease of the testis and ovary including autoimmune orchitis and oophoritis, primary hypothyroidism; autoimmune endocrine diseases including autoimmune thyroiditis, chronic thyroiditis (Hashimoto's Thyroiditis), subacute thyroiditis, idiopathic hypothyroidism, Addison's disease, Grave's disease, autoimmune polyglandular syndromes (or polyglandular endocrinopathy syndromes), Type I diabetes also referred to as insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM) and Sheehan's syndrome; autoimmune hepatitis, lymphoid interstitial pneumonitis (HIV), bronchiolitis obliterans (non-transplant) vs NSIP, Guillain-Barre' Syndrome, large vessel vasculitis (including polymyalgia rheumatica and giant cell (Takayasu's) arteritis), medium vessel vasculitis (including Kawasaki's disease and polyarteritis nodosa), polyarteritis nodosa (PAN) ankylosing spondylitis, Berger's disease (IgA nephropathy), rapidly progressive glomerulonephritis, primary biliary cirrhosis, Celiac sprue (gluten enteropathy), cryoglobulinemia, cryoglobulinemia associated with hepatitis, amyotrophic lateral sclerosis (ALS), coronary artery disease, familial Mediterranean fever, microscopic polyangiitis, Cogan's syndrome, Whiskott-Aldrich syndrome and thromboangiitis obliterans.

[0113] Rheumatoid arthritis (RA) is a chronic disease characterized by inflammation of the joints, leading to swelling, pain, and loss of function. Patients having RA for an extended period usually exhibit progressive joint destruction, deformity, disability and even premature death.

[0114] Systemic Lupus Erythematosus (SLE) is an autoimmune disease caused by recurrent injuries to blood vessels in multiple organs, including the kidney, skin, and joints. In patients with SLE, a faulty interaction between T cells and B-cells results in the production of autoantibodies that attack the cell nucleus. There is general agreement that autoantibodies are responsible for at least some aspects of SLE. It is contemplated that new therapies that deplete the B-cell lineage, allowing the immune system to reset as new B-cells are generated from precursors, would offer hope for long lasting benefit in SLE patients.

[0115]

[0116] Crohn's disease and a related disease, ulcerative colitis, are the two main disease categories that belong to a group of illnesses called inflammatory bowel disease (IBD). Crohn's disease is a chronic disorder that causes inflammation of the digestive or gastrointestinal (GI) tract. Although it can involve any area of the GI tract from the mouth to the anus, it most commonly affects the small intestine and/or colon. In ulcerative colitis, the GI involvement is limited to the colon. Multiple sclerosis (MS) is also an autoimmune disease. It is characterized by inflammation of the central nervous system and destruction of myelin, which insulates nerve cell fibers in the brain, spinal cord, and body. Although the cause of MS is unknown, it is widely believed that autoimmune T cells are primary contributors to the pathogenesis of the disease. However, high levels of antibodies are present in the cerebral spinal fluid of patients with MS, and some theories predict that the B-cell response leading to antibody production is important for mediating the disease. The course of MS is difficult to predict, and the disease may at times either lie dormant or progress steadily. Several subtypes, or patterns of progression, have been described, which are relevant not only for prognosis but also for therapeutic decisions. Relapsing-remitting describes the initial course of 85% to 90% of individuals with MS. This subtype is characterized by unpredictable attacks (relapses) followed by periods of months to years of relative quiet (remission) with no new signs of disease activity. Deficits suffered during the attacks may either resolve or may be permanent. When deficits always resolve between attacks, this is referred to as "benign" MS. Secondary progressive describes around 80% of those with initial relapsing-remitting MS, who then begin to have neurologic decline between their acute attacks without any definite periods of remission. This decline may include new neurologic symptoms, worsening cognitive function, or other deficits. Secondary progressive is the most common type of MS and causes the greatest amount of disability. Primary progressive describes the approximately 10% of individuals who never have remission after their initial MS symptoms. Decline occurs continuously without clear attacks. The primary progressive subtype tends to affect people who are older at disease onset. Progressive relapsing describes those individuals who, from the onset of their MS, have a steady neurologic decline but also suffer superimposed attacks; and is the least common of all subtypes.

[0117] Crohn's disease may be characterized by antibodies against neutrophil antigens, i.e., the "perinuclear anti-neutrophil antibody" (pANCA), and Saccharomyces cervisiae, i.e. the "anti-Saccharomyces cervisiae antibody" (ASCA). Many patients with ulcerative colitis have the pANCA antibody in their blood, but not the ASCA antibody, while

many Crohn's patients exhibit ASCA antibodies, and not pANCA antibodies. One method of evaluating Crohn's disease is using the Crohn's disease Activity Index (CDAI), based on 18 predictor variables scores collected by physicians. CDAI values of 150 and below are associated with quiescent disease; values above that indicate active disease, and values above 450 are seen with extremely severe disease (Best, et al., "Development of a Crohn's disease activity index." Gastroenterology 70:439-444, 1976. However, since the original study, some researchers use a 'subjective value' of 200 to 250 as an healthy score.

[0118] Autoimmune thyroid disease results from the production of autoantibodies that either stimulate the thyroid to cause hyperthyroidism (Graves' disease) or destroy the thyroid to cause hypothyroidism (Hashimoto's thyroiditis). Stimulation of the thyroid is caused by autoantibodies that bind and activate the thyroid stimulating hormone (TSH) receptor. Destruction of the thyroid is caused by autoantibodies that react with other thyroid antigens.

[0119] Sjogren's syndrome is an autoimmune disease characterized by destruction of the body's moisture-producing glands.

[0120] Immune thrombocytopenic purpura (ITP) is caused by autoantibodies that bind to blood platelets and cause their destruction.

[0121] Myasthenia Gravis (MG) is a chronic autoimmune neuromuscular disorder characterized by autoantibodies that bind to acetylcholine receptors expressed at neuromuscular junctions leading to weakness of the voluntary muscle groups.

[0122] Psoriasis, is characterized by autoimmune inflammation in the skin and also associated with arthritis in 30% of cases.

[0123] Also contemplated is the treatment of idiopathic inflammatory myopathy (IIM), including dermatomyositis (DM) and polymyositis (PM). Inflammatory myopathies have been categorized using a number of classification schemes. Miller's classification schema (Miller, Rheum Dis Clin North Am. 1994, 20:811-826) identifies 2 idiopathic inflammatory myopathies (IIM), polymyositis (PM) and dermatomyositis (DM).

[0124] Polymyositis and dermatomyositis are chronic, debilitating inflammatory diseases that involve muscle and, in the case of DM, skin. These disorders are rare, with a reported annual incidence of approximately 5 to 10 cases per million adults and 0.6 to 3.2 cases per million children per year in the United States (Targoff, Curr Probl Dermatol. 1991, 3:131-180). Idiopathic inflammatory myopathy is associated with significant morbidity and mortality, with up to half of affected adults noted to have suffered significant impairment (Gottdiener et al., Am J Cardiol. 1978, 41:1141-49). Miller (Rheum Dis Clin North Am.

1994, 20:811-826 and Arthritis and Allied Conditions, Ch. 75, Eds. Koopman and Moreland, Lippincott Williams and Wilkins, 2005) sets out five groups of criteria used to diagnose IIM, i.e., Idiopathic Inflammatory Myopathy Criteria (IIMC) assessment, including muscle weakness, muscle biopsy evidence of degeneration, elevation of serum levels of muscle-associated enzymes, electromagnetic triad of myopathy, evidence of rashes in dermatomyositis, and also includes evidence of autoantibodies as a secondary criteria.

[0125] IIM associated factors, including muscle-associated enzymes and autoantibodies include, but are not limited to, creatine kinase (CK), lactate dehydrogenase, aldolase, C-reactive protein, aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), and antinuclear autoantibody (ANA), myositis-specific antibodies (MSA), and antibody to extractable nuclear antigens.

V. Pharmaceutical Compositions and Methods of Administration

[0126] In another aspect of the invention, a CD20-specific binding molecule of the invention is administered as a pharmaceutical composition. To administer a CD20-specific binding molecule to humans or test animals, it is preferable to formulate the binding molecule in a composition comprising one or more pharmaceutically acceptable carriers. The phrase "pharmaceutically or pharmacologically acceptable" refer to molecular entities and compositions that do not produce allergic, or other adverse reactions when administered using routes well-known in the art, as described below. "Pharmaceutically acceptable carriers" include any and all clinically useful solvents, dispersion media, coatings, antibacterial and antifungal agents, isotonic and absorption delaying agents and the like.

[0127] In addition, compounds may form solvates with water or common organic solvents. Such solvates are contemplated as well.

[0128] The CD20-specific binding molecule compositions may be administered orally, topically, transdermally, parenterally, by inhalation spray, vaginally, rectally, or by intracranial injection. The term parenteral as used herein includes subcutaneous injections, intravenous, intramuscular, intracisternal injection, or infusion techniques. Administration by intravenous, intradermal, intramusclar, intramammary, intraperitoneal, intrathecal, retrobulbar, intrapulmonary injection and or surgical implantation at a particular site is contemplated as well. Generally, compositions are essentially free of pyrogens, as well as other impurities that could be harmful to the recipient. In certain embodiments, injection, especially intravenous, are preferred.

[0129] Pharmaceutical compositions of the present invention containing a CD20-specific binding molecule used in a method of the invention may contain pharmaceutically acceptable carriers or additives depending on the route of administration. Examples of such carriers or additives include water, a pharmaceutical acceptable organic solvent, collagen, polyvinyl alcohol, polyvinylpyrrolidone, a carboxyvinyl polymer, carboxymethylcellulose sodium, polyacrylic sodium, sodium alginate, water-soluble dextran, carboxymethyl starch sodium, pectin, methyl cellulose, ethyl cellulose, xanthan gum, gum Arabic, casein, gelatin, agar, diglycerin, glycerin, propylene glycol, polyethylene glycol, Vaseline, paraffin, stearyl alcohol, stearic acid, human serum albumin (HSA), mannitol, sorbitol, lactose, a pharmaceutically acceptable surfactant and the like. Additives used are chosen from, but not limited to, the above or combinations thereof, as appropriate, depending on the dosage form of the present invention.

[0130] Formulation of the pharmaceutical composition will vary according to the route of administration selected (e.g., solution, emulsion). For example, an appropriate composition comprising an anti-CD20 antibody (or the CD20-binding fragment thereof, such as a SMIP) to be administered can be prepared in a physiologically acceptable vehicle or carrier. For solutions or emulsions, suitable carriers include, for example, aqueous or alcoholic/aqueous solutions, emulsions or suspensions, including saline and buffered media. Parenteral vehicles can include sodium chloride solution, Ringer's dextrose, dextrose and sodium chloride, lactated Ringer's or fixed oils. Intravenous vehicles can include various additives, preservatives, or fluid, nutrient or electrolyte replenishers

[0131] A variety of aqueous carriers, e.g., water, buffered water, 0.4% saline, 0.3% glycine, or aqueous suspensions may contain the active compound in admixture with excipients suitable for the manufacture of aqueous suspensions. Such excipients are suspending agents, for example sodium carboxymethylcellulose, methylcellulose, hydroxypropylmethylcellulose, sodium alginate, polyvinylpyrrolidone, gum tragacanth and gum acacia; dispersing or wetting agents may be a naturally-occurring phosphatide, for example lecithin, or condensation products of an alkylene oxide with fatty acids, for example polyoxyethylene stearate, or condensation products of ethylene oxide with long chain aliphatic alcohols, for example heptadecaethyl-eneoxycetanol, or condensation products of ethylene oxide with partial esters derived from fatty acids and a hexitol such as polyoxyethylene sorbitol monooleate, or condensation products of ethylene oxide with partial esters derived from fatty acids and hexitol anhydrides, for example polyethylene sorbitan

monooleate. The aqueous suspensions may also contain one or more preservatives, for example ethyl, or n-propyl, p-hydroxybenzoate.

[0132] The CD20-specific binding molecule composition can be lyophilized for storage and reconstituted in a suitable carrier prior to use. This technique has been shown to be effective with conventional immunoglobulins. Any suitable lyophilization and reconstitution techniques can be employed. It will be appreciated by those skilled in the art that lyophilization and reconstitution can lead to varying degrees of antibody activity loss and that use levels may have to be adjusted to compensate.

[0133] Dispersible powders and granules suitable for preparation of an aqueous suspension by the addition of water provide the active compound in admixture with a dispersing or wetting agent, suspending agent and one or more preservatives. Suitable dispersing or wetting agents and suspending agents are exemplified by those already mentioned above.

[0134] The concentration of CD20-specific binding molecule in these formulations can vary widely, for example from less than about 0.5%, usually at or at least about 1% to as much as 15 or 20% by weight and will be selected primarily based on fluid volumes, viscosities, etc., in accordance with the particular mode of administration selected. Thus, a typical pharmaceutical composition for parenteral injection could be made up to contain 1 ml sterile buffered water, and 50 mg of antibody. A typical composition for intravenous infusion could be made up to contain 250 ml of sterile Ringer's solution, and 150 mg of antibody. Actual methods for preparing parenterally administrable compositions will be known or apparent to those skilled in the art and are described in more detail in, for example, Remington's Pharmaceutical Science, 15th ed., Mack Publishing Company, Easton, Pa. (1980). An effective dosage of antibody is within the range of 0.01 mg to 1000 mg per kg of body weight per administration.

[0135] The pharmaceutical compositions may be in the form of a sterile injectable aqueous, oleaginous suspension, dispersions or sterile powders for the extemporaneous preparation of sterile injectable solutions or dispersions. The suspension may be formulated according to the known art using those suitable dispersing or wetting agents and suspending agents which have been mentioned above. The sterile injectable preparation may also be a sterile injectable solution or suspension in a non-toxic parenterally-acceptable diluent or solvent, for example as a solution in 1,3-butane diol. The carrier can be a solvent or dispersion medium containing, for example, water, ethanol, polyol (for example, glycerol, propylene glycol, and liquid polyethylene glycol, and the like), suitable mixtures thereof,

vegetable oils, Ringer's solution and isotonic sodium chloride solution. In addition, sterile, fixed oils are conventionally employed as a solvent or suspending medium. For this purpose any bland fixed oil may be employed including synthetic mono- or diglycerides. In addition, fatty acids such as oleic acid find use in the preparation of injectables.

[0136] In all cases the form must be sterile and must be fluid to the extent that easy syringability exists. The proper fluidity can be maintained, for example, by the use of a coating, such as lecithin, by the maintenance of the required particle size in the case of dispersion and by the use of surfactants. It must be stable under the conditions of manufacture and storage and must be preserved against the contaminating action of microorganisms, such as bacteria and fungi. The prevention of the action of microorganisms can be brought about by various antibacterial and antifungal agents, for example, parabens, chlorobutanol, phenol, sorbic acid, thimerosal, and the like. In many cases, it will be desirable to include isotonic agents, for example, sugars or sodium chloride. Prolonged absorption of the injectable compositions can be brought about by the use in the compositions of agents delaying absorption, for example, aluminum monostearate and gelatin.

[0137] Compositions useful for administration may be formulated with uptake or absorption enhancers to increase their efficacy. Such enhancers include for example, salicylate, glycocholate/linoleate, glycholate, aprotinin, bacitracin, SDS, caprate and the like. See, e.g., Fix (J. Pharm. Sci., 85:1282-1285, 1996) and Oliyai and Stella (Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol., 32:521-544, 1993).

[0138] In addition, the properties of hydrophilicity and hydrophobicity of the compositions contemplated for use in the invention are well balanced, thereby enhancing their utility for both in vitro and especially in vivo uses, while other compositions lacking such balance are of substantially less utility. Specifically, compositions contemplated for use in the invention have an appropriate degree of solubility in aqueous media which permit absorption and bioavailability in the body, while also having a degree of solubility in lipids which permits the compounds to traverse the cell membrane to a putative site of action. Thus, antibody compositions contemplated are maximally effective when they can be delivered to the site of target antigen activity.

[0139] In one aspect, methods of the invention include a step of administration of a pharmaceutical composition comprising a CD20-specific binding molecule of the invention.

[0140] Methods of the invention are performed using any medically-accepted means for introducing a therapeutic directly or indirectly into a mammalian subject, including but not limited to injections, oral ingestion, intranasal, topical, transdermal, parenteral, inhalation

spray, vaginal, or rectal administration. The term parenteral as used herein includes subcutaneous, intravenous, intramuscular, and intracisternal injections, as well as catheter or infusion techniques. Administration by, intradermal, intramammary, intraperitoneal, intrathecal, retrobulbar, intrapulmonary injection, epidural, and or surgical implantation at a particular site is contemplated as well. Pharmaceutical compositions for oral or transmucosal administration may be either in liquid or solid composition form.

[0141] In certain embodiments, a pharmaceutical composition is formulated to be compatible with its intended route of administration. Solutions or suspensions used for parenteral, intradermal, or subcutaneous application can include the following components: a sterile diluent such as water for injection, saline solution, fixed oils, polyethylene glycols, glycerine, propylene glycol or other synthetic solvents; antibacterial agents such as benzyl alcohol or methyl parabens; antioxidants such as ascorbic acid or sodium bisulfite; chelating agents such as ethylenediaminetetraacetic acid; buffers such as acetates, citrates or phosphates and agents for the adjustment of tonicity such as sodium chloride or dextrose. pH can be adjusted with acids or bases, such as hydrochloric acid or sodium hydroxide. The parenteral preparation can be enclosed in ampoules, disposable syringes or multiple dose vials made of glass or plastic.

[0142] Solutions or suspensions used for subcutaneous application typically include one or more of the following components: a sterile diluent such as water for injection, saline solution, fixed oils, polyethylene glycols, glycerine, propylene glycol or other synthetic solvents; antibacterial agents such as benzyl alcohol or methyl parabens; antioxidants such as ascorbic acid or sodium bisulfite; chelating agents such as ethylenediaminetetra acetic acid; buffers such as acetates, citrates or phosphates; and agents for the adjustment of tonicity such as sodium chloride or dextrose. The pH can be adjusted with acids or bases, such as hydrochloric acid or sodium hydroxide. Such preparations may be enclosed in ampoules, disposable syringes or multiple dose vials made of glass or plastic. In some embodiments, the CD20 binding molecule is in lyophilized dosage form and may further comprise the one or more of following excipients: L-histidine, L-methionine, sucrose, and polysorbate 80.

[0143] Also contemplated is subcutaneous therapy using a pharmaceutical composition of the present invention. These therapies can be administered daily, weekly, or, more preferably, biweekly, or monthly. Ultimately the attending physician will decide on the appropriate duration of intravenous. or subcutaneous therapy, or therapy with a small molecule, and the timing of administration of the therapy, using the pharmaceutical composition of the present invention.

[0144] In an exemplary embodiment, to supply a high dosage subcutaneously, in which the volume limitation is small (e.g., about 1-1.2 ml per injection), the concentration of CD20 binding molecule is generally 100 mg/ml or greater.

[0145] In other embodiments, administration is performed at the site of a cancer or affected tissue needing treatment by direct injection into the site or via a sustained delivery or sustained release mechanism, which can deliver the formulation internally. For example, biodegradable microspheres or capsules or other biodegradable polymer configurations capable of sustained delivery of a composition (e.g., a soluble polypeptide, antibody, or small molecule) can be included in the formulations of the invention implanted near the cancer.

[0146] Therapeutic compositions may also be delivered to the patient at multiple sites. The multiple administrations may be rendered simultaneously or may be administered over a continuous period of time.

[0147] Also contemplated in the present invention is the administration of a CD20-specific binding molecule composition in conjunction with a second agent. Second agents contemplated by the invention are listed in the paragraphs below.

[0148] A second agent may be a B-cell-associated molecule. Other B-cell-associated molecules contemplated by the invention include binding molecules which bind to B-cell surface molecules that are not CD20. B-cell-associated molecules include, but are not limited to, CD19 (B-lymphocyte antigen CD19, also referred to as B-lymphocyte surface antigen B4, or Leu-12), CD21, CD22 (B-cell receptor CD22, also referred to as Leu-14, B-lymphocyte cell adhesion molecule, or BL-CAM), CD23, CD37, CD40 (B-cell surface antigen CD40, also referred to as Tumor Necrosis Factor receptor superfamily member 5, CD40L receptor, or Bp50), CD80 (T lymphocyte activation antigen CD80, also referred to as Activation B7-1 antigen, B7, B7-1, or BB1), CD86 (T lymphocyte activation antigen CD86, also referred to as Activation B7-2 antigen, B70, FUN-1, or BU63), CD137 (also referred to as Tumor Necrosis Factor receptor superfamily member 9), CD152 (also referred to as cytotoxic T-lymphocyte protein 4 or CTLA-4), L6 (Tumor-associated antigen L6, also referred to as Transmembrane 4-superfamily member 1, Membrane component surface marker 1, or M3S1), CD30 (lymphocyte activation antigen CD30, also referred to as Tumor Necrosis Factor receptor superfamily member 8, CD30L receptor, or Ki-1), CD50 (also referred to as Intercellular adhesion molecule-3 (ICAM3), or ICAM-R), CD54 (also referred to as Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM1), or Major group rhinovirus receptor), B7-H1 (ligand for an immunoinhibitory receptor expressed by activated T cells, B-cells, and myeloid cells, also referred to as PD-L1; see Dong, et al., "B7-H1, a third member of the B7

family, co-stimulates T-cell proliferation and interleukin-10 secretion," Nat. Med. 1999, 5:1365-1369), CD134 (also referred to as Tumor Necrosis Factor receptor superfamily member 4, OX40, OX40L receptor, ACT35 antigen, or TAX-transcriptionally activated glycoprotein 1 receptor), 41BB (4-1BB ligand receptor, T-cell antigen 4-1BB, or T-cell antigen ILA), CD153 (also referred to as Tumor Necrosis Factor ligand superfamily member 8, CD30 ligand, or CD30-L), CD154 (also referred to as Tumor Necrosis Factor ligand superfamily member 5, TNF-related activation protein, TRAP, or T cell antigen Gp39) and Toll receptors. The above list of construct targets and/or target antigens is exemplary only and is not exhaustive.

[0149] Examples of chemotherapeutic agents contemplated as second agents include, but are not limited to alkylating agents, such as nitrogen mustards (e.g., mechlorethamine, cyclophosphamide, ifosfamide, melphalan, and chlorambucil); nitrosoureas (e.g., carmustine (BCNU), lomustine (CCNU), and semustine (methyl-CCNU)); ethylenimines and methyl-melamines (e.g., triethylenemelamine (TEM), triethylene thiophosphoramide (thiotepa), and hexamethylmelamine (HMM, altretamine)); alkyl sulfonates (e.g., buslfan); and triazines (e.g., dacabazine (DTIC)); antimetabolites, such as folic acid analogs (e.g., methotrexate, trimetrexate, and pemetrexed (multi-targeted antifolate)); pyrimidine analogs (such as 5-fluorouracil (5-FU), fluorodeoxyuridine, gemcitabine, cytosine arabinoside (AraC, cytarabine), 5-azacytidine, and 2,2'-difluorodeoxycytidine); and purine analogs (e.g., 6-mercaptopurine, 6-thioguanine, azathioprine, 2'-deoxycoformycin (pentostatin), erythrohydroxynonyladenine (EHNA), fludarabine phosphate, 2-chlorodeoxyadenosine (cladribine, 2-CdA)); Type I topoisomerase inhibitors such as camptothecin (CPT), topotecan, and irinotecan; certain natural products, such as epipodophylotoxins (e.g., etoposide and teniposide); and vinca alkaloids (e.g., vinblastine, vincristine, and vinorelbine); anti-tumor antibiotics such as actinomycin D, doxorubicin, and bleomycin; certain radiosensitizers such as 5-bromodeozyuridine, 5-iododeoxyuridine, and bromodeoxycytidine; platinum coordination complexes such as cisplatin, carboplatin, and oxaliplatin; substituted ureas, such as hydroxyurea; and methylhydrazine derivatives such as N-methylhydrazine (MIH) and procarbazine.

[0150] Non-limiting examples of chemotherapeutic agents, radiotherapeutic agents and other active and ancillary agents are also shown in Table 1.

TABLE 1

Alkylating agents

Nitrogen mustards
mechlorethamine
cyclophosphamide
ifosfamide
melphalan
chlorambucil

Nitrosoureas
carmustine (BCNU)
lomustine (CCNU)
semustine (methyl-CCNU)

Ethylenimine/Methyl-melamine
thriethylenemelamine (TEM)
triethylene thiophosphoramide (thiotepa)
hexamethylmelamine (HMM, altretamine)

Alkyl sulfonates
busulfan

Triazines
dacarbazine (DTIC)

Antimetabolites

Folic Acid analogs
methotrexate
Trimetrexate
Pemetrexed (Multi-targeted antifolate)

Pyrimidine analogs
5-fluorouracil
fluorodeoxyuridine
gemcitabine
cytosine arabinoside (AraC, cytarabine)
5-azacytidine
2,2'- difluorodeoxy-cytidine

Purine analogs
6-mercaptopurine
6-thioguanine
azathioprine
2'-deoxycoformycin (pentostatin)
erythrohydroxynonyl-adenine (EHNA)
fludarabine phosphate

Natural products

Antimitotic drugs

Taxanes
paclitaxel
Vinca alkaloids
vinblastine (VLB)
vincristine
vinorelbine
Taxotere® (docetaxel)
estramustine
estramustine phosphate

Epipodophylotoxins
etoposide
teniposide

Antibiotics
actimomycin D
daunomycin (rubido-mycin)
doxorubicin (adria-mycin)
mitoxantroneidarubicin
bleomycin
splicamycin (mithramycin)
mitomycinC
dactinomycin
aphidicolin

Enzymes
L-asparaginase
L-arginase

Radiosensitizers

metronidazole
misonidazole
desmethylmisonidazole
pimonidazole
etanidazole
nimorazole
RSU 1069
EO9
RB 6145
SR4233
nicotinamide
5-bromodeozyuridine
5-iododeoxyuridine
bromodeoxycytidine

2-chlorodeoxyadenosine
(cladribine, 2-CdA)

Type I Topoisomerase Inhibitors
camptothecin
topotecan
irinotecan

Biological response modifiers
G-CSF
GM-CSF

Differentiation Agents
retinoic acid derivatives

Hormones and antagonists
Adrenocorticosteroids/ antagonists
prednisone and equivalents
dexamethasone
ainoglutethimide

Progestins
hydroxyprogesterone caproate
medroxyprogesterone acetate
megestrol acetate

Estrogens
diethylstilbestrol
ethynyl estradiol/ equivalents

Antiestrogen
tamoxifen

Androgens
testosterone propionate
fluoxymesterone/equivalents

Antiandrogens
flutamide
gonadotropin-releasing
hormone analogs
leuprolide

Nonsteroidal antiandrogens
Flutamide

Miscellaneous agents
Platinum coordination complexes
cisplatin
Carboplatin
oxaliplatin
Anthracenedione
mitoxantrone

Substituted urea
hydroxyurea

Methylhydrazine derivatives
N-methylhydrazine (MIH)
procarbazine

Adrenocortical suppressant
mitotane (*o,p'*- DDD)
ainoglutethimide

Cytokines
interferon (α, β, γ)
interleukin-2

Photosensitizers
hematoporphyrin derivatives
Photofrin®
benzoporphyrin derivatives
Npe6
tin etioporphyrin (SnET2)
pheoboride-a
bacteriochlorophyll-a
naphthalocyanines
phthalocyanines
zinc phthalocyanines

Radiation
X-ray
ultraviolet light
gamma radiation
visible light
infrared radiation
microwave radiation

[0151] Second agents contemplated by the invention for treatment of autoimmune diseases may also include immunosuppressive agents, which act to suppress or mask the immune system of the individual being treated. Immunosuppressive agents include, for example, non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), analgesiscs, glucocorticoids, disease-modifying

antirheumatic drugs (DMARDs) for the treatment of arthritis, or biologic response modifiers. Compositions in the DMARD description are also useful in the treatment of many other autoimmune diseases aside from RA.

[0152] Exemplary NSAIDs are chosen from the group consisting of ibuprofen, naproxen, naproxen sodium, Cox-2 inhibitors such as VIOXX® and CELEBREX®, and sialylates. Exemplary analgesics are chosen from the group consisting of acetaminophen, oxycodone, tramadol of proporxyphene hygrochloride. Exemplary glucocorticoids are chosen from the group consisting of cortisone, dexamethosone, hydrocortisone, methylprednisolone, prednisolone, or prednisone. Exemplary biological response modifiers include, but are not limited to, molecules directed against cell surface markers (e.g., CD4, CD5, CTLA4, etc.), abatacept, cytokine inhibitors, such as the TNF antagonists (e.g. etanercept (ENBREL®), adalimumab (HUMIRA®), and infliximab (REMICADE®)), chemokine inhibitors and adhesion molecule inhibitors. The biological response modifiers include monoclonal antibodies as well as recombinant forms of molecules. Exemplary DMARDs include, but are not limited to, azathioprine, cyclophosphamide, cyclosporine, methotrexate, penicillamine, leflunomide, sulfasalazine, hydroxychloroquine, Gold [oral (auranofin) and intramuscular] and minocycline. Thus, for example, the present inventive binding proteins can be used for treatment of RA in combination with DMARDs such as methotrexate (MTX), sulfasalazine (SSZ) or leflunomide (LEF); for treatment of lupus (SLE) with DMARDs, steroids, cyclophosphamide or CELLCEPT®; and for treatment of MS with various disease-modifying agents such as interferons (interferon beta-1a (AVONEX® and REBIF®) or interferon beta-1b (BETASERON® or BETAFERON®)), glatiramer acetate (COPAXONE®), mitoxantrone, or natalizumab (TYSABRI®).

[0153] It is contemplated that the CD20-specific binding molecule composition and the second agent may be given simultaneously in the same formulation. Alternatively, the agents are administered in a separate formulation and administered concurrently, with concurrently referring to agents given within 30 minutes of each other.

[0154] In another aspect, the second agent is administered prior to administration of the CD20-specific binding molecule composition. Prior administration refers to administration of the second agent within the range of one week prior to treatment with the antibody, up to 30 minutes before administration of the antibody. It is further contemplated that the second agent is administered subsequent to administration of the CD20-specific binding molecule composition. Subsequent administration is meant to describe

administration from 30 minutes after antibody treatment up to one week after antibody administration.

[0155] It is further contemplated that when the CD20-specific binding molecule is administered in combination with a second agent, wherein the second agent is a cytokine or growth factor, or a chemotherapeutic agent, the administration also includes use of a radiotherapeutic agent or radiation therapy. The need for a radiation therapy, in combination with the administration of a CD20-specific binding molecule composition and the second agent, may be determined by the treating physician.

[0156] The amounts of CD20-specific binding molecule composition in a given dosage will vary according to the size of the individual to whom the therapy is being administered as well as the characteristics of the disorder being treated. In exemplary treatments, it may be necessary to administer about 1 mg/day, about 5 mg/day, about 10 mg/day, about 20 mg/day, about 50 mg/day, about 75 mg/day, about 100 mg/day, about 150 mg/day, about 200 mg/day, about 250 mg/day, about 400 mg/day, about 500 mg/day, about 800 mg/day, about 1000 mg/day, about 1600 mg/day or about 2000 mg/day. The doses may also be administered based on weight of the patient, at a dose of 0.01 to 50 mg/kg. In a related embodiment, the CD20-specific binding molecule may be administered in a dose range of 0.015 to 30 mg/kg. In an additional embodiment, the CD20-specific binding molecule is administered in a dose of about 0.015, about 0.05, about 0.15, about 0.5, about 1.5, about 5, about 15 or about 30 mg/kg.

[0157] Standard dose-response studies, first in animal models and then in clinical testing, can reveal optimal dosages for particular diseases and patient populations.

[0158] In certain embodiments, the administration of the CD20-specific binding molecule composition decreases or reduces the B-cell population by at least about 20% after treatment. In one embodiment, the B-cell population is decreased or reduced by at least about 20, about 30, about 40, about 50, about 60, about 70, about 80, about 90 or about 100%. B-cell depletion is defined as a decrease in absolute B-cell count below the lower limit of the normal range. B-cell recovery is defined as a return of absolute B-cell count to either of the following: 1) 70% of subject's baseline value; or 2) normal range.

[0159] In certain embodiments, the administration of the CD20-specific binding molecule composition also results in enhanced apoptosis in particular B-cell subsets. Apoptosis refers to the induction of programmed cell death of a cell, manifested and assessed

by DNA fragmentation, cell shrinkage, cell fragmentation, formation of membrane vesicles, or alteration of membrane lipid composition as assessed by annexin V staining.

[0160] In certain embodiments, the administration of the CD20-specific binding molecule composition results in desired clinical effects in the disease or disorder being treated. For example, in patients affected by rheumatoid arthritis, administration of a CD20 molecule of the invention improves the patient's condition by a clinically significant amount [e.g., achieves the American College of Rheumatology Preliminary Detection of Improvement (ACR20)], and/or an improvement of 20% in tender and swollen joint and 20% improvement in 3/5 remaining ACR measures (Felson et al., *Arthritis Rheum.* 1995, 38:727-35). Biological measures for improvement in an RA patient after administration of a CD20-specific binding molecule include measurement of changes in cytokine levels, measured via protein or RNA levels. Cytokines of interest include, but are not limited to, TNF-α, IL-1, interferons, Blys, and APRIL. Cytokine changes may be due to reduced B cell numbers or decreased activated T cells. In RA patients, markers relevant to bone turnover (bone resorption or erosion) are measured before and after administration of CD20-specific binding molecules. Relevant markers include, but are not limited to, alkaline phosphatase, osteocalcin, collagen breakdown fragments, hydroxyproline, tartrate-resistant acid phosphotase, and RANK ligand (RANKL). Other readouts relevant to the improvement of RA include measurement of C reactive protein (CRP) levels, erythrocyte sedimentation rate (ESR), rheumatoid factor, CCP (cyclic citrullinated peptide) antibodies and assessment of systemic B cell levels and lymphocyte count via flow cytometry. Specific factors can also be measured from the synovium of RA patients, including assessment of B cell levels in synovium from synovium biopsy, levels of RANKL and other bone factors and cytokines set out above. Additional biomarkers for RA include CRP and SAA.

[0161] In a related aspect, the effects of CD20-specific binding molecule treatment on other diseases is measured according to standards known in the art. For example, it is contemplated that Crohn's disease patients receiving treatment with a CD20-specific binding molecule achieve an improvement in Crohn's Disease Activity Index (CDAI) in the range of about 50 to about 70 units, wherein remission is at 150 units (Simonis et al, *Scand. J Gastroent.* 1998, 33:283-8). A score of 150 or 200 is considered normal, while a score of 450 is considered a severe disease score. It is further desired that administration of the CD20-specific binding molecule results in a reduction in perinuclear anti-neutrophil antibody

(pANCA) and anti-Saccharomyces cervisiae antibody (ASCA) in individuals affected by inflammatory bowel disease.

[0162] It is further contemplated that adult and juvenile myositis patients receiving treatment with a CD20-specific binding molecule of the invention achieve an improvement in core set of evaluations, such as 3 out of 6 of the core set measured improved by approximately 20%, with not more than 2 of the core measurements worse by approximately 25% (see Rider et al., *Arthritis Rheum.* 2004, 50:2281-90).

[0163] It is further contemplated that SLE patients receiving treatment with a CD20-specific binding molecule of the invention achieve an improvement in Systemic Lupus Activity Measure (SLAM) or SLE Disease Activity Index (SLEDAI) score of at least 1 point (Gladman et al, *J Rheumatol* 1994, 21:1468-71) (Tan et al., Arthritis Rheum. 1982, 25:1271-7). A SLAM score of >5, or SLEDAI score >2, is considered clinically active disease. A response to treatment may be defined as improvement or stabilization over the in 2 disease activity measures (the SLE Disease Activity Index [SLEDAI] and the Systemic Lupus Activity Measure) and 2 quality of life measures (patient's global assessment and the Krupp Fatigue Severity Scale) (Petri et al., *Arthritis Rheum.* 2004, 50:2858-68.) It is further desired that administration of the CD20-specific binding molecule to SLE patients results in a reduction in anti-double-stranded DNA antibodies. Alternatively, improvement may be gauged using the British Isles Lupus Assessment Group Criteria (BILAG). Additional biomarkers for SLE include B cell subsets (naive, memory, transitional); CD40L; complement, anti ds-DNA, C1Q; urinary biomarkers (TWEAK, MIF). In addition, with respect to differentiation markers, FcgammaRIII status (high or low affinity) can be used to correlate B cell depletion and efficacy. Reduced complement activation may also confer a safety advantage (based on C3a, C4a, Bb binding).

[0164] It is further contemplated that multiple sclerosis patients receiving treatment with a CD20-specific binding molecule of the invention achieve an improvement in clinical score on the Kurtzke Expanded Disability status scale (EDSS) (Kurtzke, F., *Neurology* 1983, 33:1444-52) of at least 0.5, or a delay in worsening of clinical disease of at least 1.0 on the Kurtzke scale (Rudick et al., *Neurology* 1997, 49:358-63).

[0165] It is further contemplated that patients suffering from IIM receiving treatment of a CD20-specific binding molecule of the invention achieve a reduction in at least one of five criteria set out in the Idiopathic Inflammatory Myopathy Criteria (IIMC)

assessment (Miller, F., *supra*). It is further contemplated that administration of a CD20-specific binding molecule of the invention to IIM patients results in a reduction in IIM-associated factors selected from the group consisting of creatine kinase (CK), lactate dehydrogenase, aldolase, C-reactive protein, aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), and antinuclear autoantibody (ANA), myositis-specific antibodies (MSA), and antibody to extractable nuclear antigens. Alternatively, patients meeting 3 out of 6 of the criteria set out in Rider et al., *Arthritis Rheum.* 2004, 50:2281-90, may be the subject of treatment according to the invention, with worsening in no more than 2 criteria.

[0166] In a still further embodiment, patients suffering from a B cell cancer receive treatment with a CD20-specific binding molecule of the invention and demonstrate an overall beneficial response to the CD20-specific binding molecule, based on clinical criteria well-known and commonly used in the art, and as described below, such as a decrease in tumor size, decrease in tumor number and/or an improvement in disease symptoms.

[0167] For example, the U.S. National Cancer Institute (NCI) has divided some of the classes of cancers into the clinical categories of "indolent" and "aggressive" lymphomas. Indolent lymphomas include follicular cell lymphomas, separated into cytology "grades," diffuse small lymphocytic lymphoma/chronic lymphocytic leukemia (CLL), lymphoplasmacytoid/Waldenstrom's Macroglobulinemia, Marginal zone lymphoma and Hairy cell leukemia. Aggressive lymphomas include diffuse mixed and large cell lymphoma, Burkitt's lymphoma/diffuse small non-cleaved cell lymphoma, Lymphoblastic lymphoma, Mantle cell lymphoma and AIDS-related lymphoma. In some cases, the International Prognostic Index (IPI) is used in cases of aggressive and follicular lymphoma. Factors to consider in the IPI include Age (<60 years of age versus >60 years of age), serum lactate dehydrogenase (levels normal versus elevated), performance status (0 or 1 versus 2-4) (see definition below), disease stage (I or II versus III or IV), and extranodal site involvement (0 or 1 versus 2-4). Patients with 2 or more risk factors have less than a 50% chance of relapse-free and overall survival at 5 years.

[0168] Performance status in the aggressive IPI is defined as follows: Grade Description: 0 Fully active, able to carry on all pre-disease performance without restriction; 1 Restricted in physically strenuous activity but ambulatory and able to carry out work of a light or sedentary nature, e.g., light house work, office work; 2 Ambulatory and capable of all selfcare but unable to carry out any work activities, up to and about more than 50% of waking hours; 3 Capable of only limited selfcare, confined to bed or chair more than 50% of

waking hours; 4 Completely disabled, unable to carry on any selfcare, totally confined to bed or chair; and, 5 Dead. (See., The International Non-Hodgkin's Lymphoma Prognostic Factors Project. A predictive model for aggressive non-Hodgkin's lymphoma. N Engl J Med. 329:987–94, 1993)

[0169] Typically, the grade of lymphoma is clinically assessed using the criterion that low-grade lymphoma usually presents as a nodal disease and is often indolent or slow-growing. Intermediate- and high-grade disease usually presents as a much more aggressive disease with large extranodal bulky tumors.

[0170] The Ann Arbor classification system is also used to measure progression of tumors, especially non-Hodgkins lymphomas. In this system, stages I, II, III, and IV of adult NHL can be classified into A and B categories depending on whether the patient has well-defined generalized symptoms (B) or not (A). The B designation is given to patients with the following symptoms: unexplained loss of more than 10% body weight in the 6 months prior to diagnosis, unexplained fever with temperatures above 38° C. and drenching night sweats. Definitions of the stages are as follows: Stage I-involvement of a single lymph node region or localized involvement of a single extralymphatic organ or site. Stage II-involvement of two or more lymph node regions on the same side of the diaphragm or localized involvement of a single associated extralymphatic organ or site and its regional lymph nodes with or without other lymph node regions on the same side of the diaphragm. Stage III-involvement of lymph node regions on both sides of the diaphragm, possibly accompanying localized involvement of an extralymphatic organ or site, involvement of the spleen, or both. Stage IV-disseminated (multifocal) involvement of one or more extralymphatic sites with or without associated lymph node involvement or isolated extralymphatic organ involvement with distant (non-regional) nodal involvement. For further details, see The International Non-Hodgkin's Lymphoma Prognostic Factors Project: A predictive model for aggressive non-Hodgkin's lymphoma, New England J. Med. (1993) 329:987-994.

[0171] In one aspect, a therapeutic effect of the CD20-specific binding molecule is determined by the level of response, for example a partial response is defined as tumor reduction to less than one-half of its original size. A complete response is defined as total elimination of disease confirmed by clinical or radiological evaluation. In one embodiment, individuals receiving treatment with a CD20-specific binding molecule of the invention demonstrate at least a partial response to the treatment.

[0172] According to the Cheson criteria for assessing NHL developed in collaboration with the National Cancer Institute (Cheson et al., *J Clin Oncol.* 1999, 17:1244; Grillo-Lopez et al., *Ann Oncol.* 2000, 11:399-408), a complete response is obtained when there is a complete disappearance of all detectable clinical and radiographic evidence of disease and disease-related symptoms, all lymph nodes have returned to normal size, the spleen has regressed in size, and the bone marrow is cleared of lymphoma.

[0173] An unconfirmed complete response is obtained when a patient shows complete disappearance of the disease and the spleen regresses in size, but lymph nodes have regressed by more than 75% and the bone marrow is indeterminate. An unconfirmed complete response meets and exceeds the criteria for partial response. An overall response is defined as a reduction of at least 50 percent in overall tumor burden.

[0174] Similar criteria have been developed for various other forms of cancers or hyperproliferative diseases and are readily available to a person of skill in the art. See, e.g., Cheson et al., *Clin Adv Hematol Oncol.* 2006, 4:4-5, which describes criteria for assessing CLL; Cheson et al., *J Clin Oncol.* 2003, 21:4642-9, which describes criteria for AML; Cheson et al., *Blood* 2000, 96:3671-4, which describes criteria for myelodysplastic syndromes.

[0175] In another aspect, a therapeutic response to a CD20-binding molecule in patients having a B cell cancer is manifest as a slowing of disease progression compared to patients not receiving therapy. Measurement of slowed disease progression or any of the above factors may be carried out using techniques well-known in the art, including bone scan, CT scan, gallium scan, lymphangiogram, MRI, PET scans, ultrasound, and the like.

[0176] In a related aspect, to determine the efficacy of CD20-binding molecule treatment, the number of B cells in a biological sample of the individual is measured. In one embodiment, the biological sample is selected from blood, tumor biopsy, lymph nodes, tonsils, bone marrow, thymus and other lymphocyte-rich tissue. Lymphocyte-rich tissue is tissue particularly rich in lymphocyte cells, including but not limited to, lymph nodes and related organs (spleen, bone marrow, tonsils, thymus, mucosal lymph tissue), tumors and areas of inflammation.

[0177] It will also be apparent that dosing may be modified if traditional therapeutics are administered in combination with therapeutics of the invention.

[0178] It is further contemplated that an individual being treated by a method of the invention may be re-treated, for example, if symptoms of disease reappear or the pharmacokinetics and/or pharmodynamics of the therapeutic make such re-treatment advisable. In one embodiment, the individual treated with a CD20-specific binding molecule of the invention is administered another CD20-specific binding molecule. Based upon ordinary skill in the art, a clinician would be able to identify when re-treatment is indicated based upon, for example, reappearance of disease symptoms or recovery of the individual's B cells to a level requiring re-treatment. Examples of other measurements or markers of clinical criteria and outcome are described further herein. An individual treated by a method of the invention may be placed on a maintenance schedule of treatment, wherein the individual is re-treated with the CD20-specific binding molecule based on pharmacokinetic/pharmacodynamic properties of the CD20-specific binding molecule. Such a maintenance treatment is typically administered anywhere from about three months to about two years after the initial treatment. Exemplary pharmacodynamic data include, but are not limited to, biological measures for improvement of disease as described herein, such as levels of the CD20-specific binding molecule in serum, improvement in disease assessment (e.g., by ACR, SLAM or IPI), change in cytokine or surface marker expression, levels of autoantibodies, and change in tumor size. It is further understood in the art that differences in individual responses to treatment by methods of the invention may necessitate differences in timing of re-treatment with the CD20-specific binding molecule.

[0179] As an additional aspect, the invention includes kits which comprise one or more compounds or compositions packaged in a manner which facilitates their use to practice methods of the invention. In one embodiment, such a kit includes a CD20-specific binding molecule compound or composition described herein (e.g., a composition comprising a CD20-specific binding molecule alone or in combination with a second agent), packaged in a container such as a sealed bottle or vessel, with a label affixed to the container or included in the package that describes use of the compound or composition in practicing the method. Preferably, the compound or composition is packaged in a unit dosage form. The kit may further include a device suitable for administering the composition according to a specific route of administration or for practicing a screening assay. Preferably, the kit contains a label that describes use of the antibody composition.

[0180] The present invention also comprises articles of manufacture. Such articles comprise at least one CD20-specific binding molecule, optionally together with a

pharmaceutical carrier or diluent, and at least one label describing a method of use of the CD20-specific binding molecuel according to the invention. Such articles of manufacture may also optionally comprise at least one second agent for administration in connection with the CD20-specific binding molecule.

EXAMPLES

Example 1: Binding of Anti-CD20 SMIPs to Primary B cells

Primary Human B Cells

[0181] To determine the binding of anti-CD20 SMIPs to primary B cells, we isolated primary B cells from buffy coats using negative selection B cell isolation kit (StemCell Technologies). We incubated the harvested cells with varying concentrations of anti-CD20 SMIP for 30 minutes on ice. Cells were then washed in 0.5% BSA/PBS, and stained with anti-human IgG-PE for 30 minutes and analyzed by flow cytometry (MFI) on FacsCalibur.

[0182] As demonstrated in Figure 1, all anti-CD20 SMIPs analyzed in this example (TRU-015, 018008 csc, 018008sccp, 2LM 19-3 csc, 2LM 19-3 sccp, 2LM 20-4 csc, 2LM 16 csc, 2LM 16 scc, 2LM 16 sccp, 2LM 20-4 sccp, 009csc, 009 scc, 009 sccp, 018011 csc, 018011 scc, 018011 sccp) had comparable binding affinities to CD20 on human B cells.

Table 2- Binding on Primary B cells with P/S mutation SMIPS

10 ug/ml		1.1ug/ml		0.37 ug/ml		0.12 ug/ml	
	MFI		MFI		MFI		MFI
Rituxan	198.7	Rituxan	172.9	Rituxan	137.3	Rituxan	105.7
TRU-015	149.3	TRU-015	88.0	TRU-015	64.8	TRU-015	42.8
2Lm 20-4 sccp	80.1	2Lm 20-4 sccp	66.0	2Lm 20-4 sccp	43.2	2Lm 20-4 sccp	25.6
18008 sccp	79.5	2LM 20-4 sccp p/s	48.8	2LM 20-4 sccp p/s	33.4	2Lm 19-3 sccp	17.7
2Lm 19-3 sccp	61.4	2Lm 19-3 sccp	48.7	2Lm 19-3 sccp	31.0	2LM 20-4 sccp p/s	17.6
2Lm 16 sccp p/s	54.3	18008 sccp	44.8	009 sccp	28.4	009 sccp	17.0
2Lm 16 csc p/s	52.2	2Lm 16 sccp p/s	42.8	2Lm 16 sccp p/s	25.0	2Lm 16 sccp p/s	13.5
009 sccp	51.9	2Lm 19-3 sccp p/s	41.8	18008 sccp	24.8	18008 sccp	13.0
2LM 20-4 sccp p/s	50.6	009 sccp	39.8	2Lm 19-3 sccp p/s	22.4	2Lm 19-3 sccp p/s	12.7
2Lm 19-3 sccp p/s	43.5	009 sccp p/s	32.7	009 sccp p/s	20.2	009 sccp p/s	10.4
009 csc p/s	42.2	009 csc p/s	31.6	009 csc p/s	19.0	009 csc p/s	9.8
009 sccp p/s	40.4	2Lm 16 csc p/s	30.5	2Lm 16 csc p/s	15.2	2Lm 16 csc p/s	9.3

10 ug/ml		1.1 ug/ml		0.12 ug/ml		0.04 ug/ml	
Rituxan	171.6	Rituxan	93.0	Rituxan	82.3	Rituxan	43.1
TRU-015	123.6	TRU-015	53.4	2LM 20-4 sccp p/s	38.3	TRU-015	19.9
2Lm 20-4 sccp	67.8	2LM 20-4 sccp p/s	39.2	TRU-015	31.4	2LM 20-4 sccp p/s	16.2
2LM 20-4 sccp p/s	66.8	2Lm 19-3 sccp p/s	35.9	2Lm 19-3 sccp p/s	31.0	2Lm 20-4 sccp	14.4
18008 sccp	64.7	2Lm 19-3 sccp	35.2	2Lm 20-4 sccp	27.8	2Lm 16 sccp p/s	14.0
2Lm 19-3 sccp	60.7	2Lm 16 sccp p/s	34.9	2Lm 16 sccp p/s	26.4	2Lm 19-3 sccp	13.4
2Lm 16 csc p/s	59.6	2Lm 20-4 sccp	34.1	2Lm 19-3 sccp	23.4	2Lm 19-3 sccp p/s	13.0
009 csc p/s	56.8	009 csc p/s	31.0	009 csc p/s	21.5	009 csc p/s	11.7
2Lm 19-3 sccp p/s	56.1	009 sccp p/s	28.1	009 sccp p/s	21.4	009 sccp p/s	10.2
009 sccp	50.7	2Lm 16 csc p/s	26.1	009 sccp	16.8	2Lm 16 csc p/s	8.8
2Lm 16 sccp p/s	48.2	009 sccp	25.1	2Lm 16 csc p/s	16.0	009 sccp	8.5
009 sccp p/s	46.9	18008 sccp	20.7	18008 sccp	12.9	18008 sccp	6.1

Malignant B Lymphoid Cells

[0183] Binding of anti-CD20 018011, TRU-015 and RITUXAN® was examined using a panel of 5 human B-lymphoma cell lines (BCL): NU-DHL1, Ramos, SU-DHL4, SU-DHL5, and WSU-DLCL2. Each of these cell lines was derived from a distinct non-Hodgkin's B-cell lymphoma patient. Briefly, increasing concentrations of CD20-binders were incubated with 100,000 BCL for 30 min at 4°C. Cells were then washed twice with PBS containing 1 % BSA to remove unbound antibody and then a FITC labeled goat anti-human (H+L) secondary antibody (100 fold diluted) was added for 30 min at 4°C. The cells were again washed twice to remove unbound secondary antibody and then resuspended in 1% formaldehyde (in PBS) with 1% BSA. Fluorescence intensity of each sample was measured using a Becton Dickinson FACSORT flow cytometer. Results are expressed as the geometric mean (GeoMean) of the fluorescent intensity.

[0184] Figure 2 shows the results in the five cell lines. 018011 demonstrated dose-dependent binding to each of these cell lines. 018008 and 2Lm20-4 also bound to the five cell lines (data not shown). Binding of 018011 to Ramos and SWU-DLCL2 cells was confirmed by immunofluorescence (IFA) according to the protocol in Example 5.

Example 2: Complement Dependent Cytotoxicity Assay of anti-CD20 SMIPs

Ramos Cells

[0185] To determine the level of complement dependent cytotoxicity (CDC) of the human anti-CD20 SMIPs, we incubated Ramos cells with anti-CD20 SMIPs in the presence of 10% human sera (Quidel) for 3.5 hours at 37°C. We assessed cell death by measuring LDH release from cells (Promega kit).

[0186] As shown in Figure 3A, RITUXAN®, TRU-015, 2LM 20-4, 018008, and 018011 had comparable CDC activity against human Ramos B-cells.

Table 3- CDC on Ramos cells with P/S mutation SMIPS

10 ug/ml		1.1ug/ml		0.37 ug/ml		0.12 ug/ml	
	% lysis		% lysis		% lysis		% lysis
2Lm 16 sccp p/s	85.7	2Lm 19-3 sccp	58.1	Rituxan	60.2	Rituxan	56.5
009 sccp p/s	83.0	18008 sccp	57.1	18008 sccp	47.9	18008 sccp	32.2
Rituxan	82.5	Rituxan	57.1	2Lm 20-4 sccp	45.4	2Lm 19-3 sccp	30.5
2Lm 19-3 sccp p/s	80.3	TRU-015	56.1	2Lm 19-3 sccp	40.8	2Lm 20-4 sccp	20.0
18008 sccp	72.5	2Lm 20-4 sccp	52.9	TRU-015	38.8	TRU-015	16.3
TRU-015	67.7	009 sccp	50.3	009 sccp	26.1	009 sccp p/s	11.4
2Lm 20-4 sccp p/s	66.3	2Lm 20-4 sccp p/s	28.3	009 csc p/s	18.8	009 sccp	11.2
2Lm 20-4 sccp	63.2	009 sccp p/s	23.4	009 sccp p/s	12.7	2Lm 16 sccp p/s	9.5
2Lm 19-3 sccp	60.1	2Lm 19-3 sccp p/s	21.3	2Lm 19-3 sccp p/s	12.4	009 csc p/s	9.3
2Lm 16 csc p/s	56.6	2Lm 16 sccp p/s	18.3	2Lm 20-4 sccp p/s	12.3	2Lm 20-4 sccp p/s	8.9
009 sccp	56.4	2Lm 16 csc p/s	16.5	2Lm 16 sccp p/s	11.5	2Lm 16 csc p/s	8.9
009 csc p/s	40.9	009 csc p/s	16.2	2Lm 16 csc p/s	9.2	2Lm 19-3 sccp p/s	8.8

100 nm		11 nm		4 nm		1 nm	
	% lysis		% lysis		% lysis		% lysis
2Lm 16 sccp p/s	107.1	18008 sccp	66.7	Rituxan	65.1	Rituxan	67.6
009 sccp p/s	98.5	Rituxan	66.3	18008 sccp	61.4	18008 sccp	50.0
2Lm 19-3 sccp p/s	92.7	2Lm 20-4 sccp	65.5	2Lm 20-4 sccp	56.9	2Lm 20-4 sccp	36.1
009 sccp	88.3	2Lm 19-3 sccp	61.3	2Lm 19-3 sccp	51.7	2Lm 19-3 sccp	29.7
2Lm 20-4 sccp p/s	87.2	009 sccp	55.7	009 sccp	38.0	009 sccp p/s	27.0
TRU-015	86.1	TRU-015	49.7	TRU-015	26.2	2Lm 16 sccp p/s	22.9
2Lm 20-4 sccp	82.0	2Lm 20-4 sccp p/s	27.1	009 sccp p/s	21.3	2Lm 16 csc p/s	22.5
Rituxan	81.9	2Lm 16 sccp p/s	24.7	2Lm 16 sccp p/s	19.6	009 sccp	20.9
2Lm 19-3 sccp	79.7	009 sccp p/s	23.8	2Lm 19-3 sccp p/s	18.5	2Lm 19-3 sccp p/s	20.5
18008 sccp	73.9	2Lm 19-3 sccp p/s	22.2	2Lm 20-4 sccp p/s	17.4	TRU-015	19.8
2Lm 16 csc p/s	69.2	2Lm 16 csc p/s	17.0	009 csc p/s	16.4	009 csc p/s	18.7
009 csc p/s	64.3	009 csc p/s	16.0	2Lm 16 csc p/s	14.3	2Lm 20-4 sccp p/s	15.1

Primary B cells

[0187] We also isolated primary B cells from buffy coats using negative selection B cell isolation kit (StemCell Technologies). We pre-incubated $5x10^5$ B cells with anti-hCD55 antibody (2ug/ml) for 10 min at 37°C. We then added anti-CD20 SMIPs and serum (10%: Quidel). After 3.5 hours incubation, we assessed cell death by 7-AAD staining and FACs analysis.

[0188] As shown in Figure 3B, TRU-015, RITUXAN®, and 2LM 20-4 had comparable CDC activity against primary B-cells. No CDC activity against primary B cells were detected when the IgG control was added.

SU-DHL4 B cells and BJAB cells

[0189] We also investigated the ability of humanized anti-CD20 SMIPs to mediate CDC against SU-DHL4 B-cell lymphoma cells. using fresh human serum as a source of complement. Human whole blood was collected and allowed to clot for 60 min at room temperature after which the tubes were centrifuged to collect serum for CDC analysis.

CD20-specific TRU-015 and RITUXAN® were used as positive controls and HER2-specific trastuzumab was used as an isotype-matched nonbinding control in this study.

[0190] SU-DHL4B cells were plated in 96 well plates with varying amounts of CD20-binders. Diluted human complement (1:100), prepared from the blood of healthy volunteers, was added to each well. Tests were conducted in triplicate in a final volume of 100 µl/well with medium alone, cells alone, CD20-binders alone and complement alone, all used as controls. After 4 h incubation at 37 ° C, plates were removed from the incubator and equilibrated to 22 ° C (approximately 20-30 minutes).

LDH Release Assay

[0191] The CYTOTOX-ONE™ fluorometric method estimates the number of non-viable cells in a cytotoxicity assay. It allows for the rapid fluorescence measurement of the release of lactate dehydrogenase (LDH) from cells with damaged cell membranes. LDH released into the culture medium is measured with a 10-minute coupled enzymatic assay that results in the conversion of Resazurin into Resorufin. The generation of the fluorescent Resorufin product is proportional to the amount of LDH.

Briefly, an equal volume of CYTOTOX-ONE ™ was added to each well, shaken gently for 30 seconds, and incubated further at 22 ° C for 10 minutes. As a positive control, 2 µl of lysis buffer per well (in triplicates) was added to generate a maximum LDH release from cells. After 10 minutes of incubation, the enzymatic reaction was stopped by adding 50 µl of stop solution and the plates shaken gently for 10 seconds. Fluorescence was measured with a fluorimeter at an excitation wavelength of 560 nm and an emission wavelength of 590 nm.

The percent cytotoxicity was calculated by the following equation:

$$\% \text{ Lysis} = 100 \times \frac{\text{(Experimental release - Background release)}}{\textbf{(Maximum release - Background release)}}$$

[0192] As shown in Figure 4, 018011 was capable of mediating CDC with human complement from two separate donors and SU-DHL4 B cells. This CDC effect was proportional to concentrations of 018011, TRU-015 and RITUXAN®. Complement from

one of the two donors was less supportive of the CDC activity of 018011, which appeared lower than that of RITUXAN®. The significance of this observation with 018011 is unclear.

[0193] In a similar study using BJAB cells as the target cell population, 018011 and TRU-015 both produced equivalent concentration-dependent complement-mediated cytotoxicity against BJAB cells (Figure 4).

Example 3: Antibody Dependent Cytotoxicity (ADCC) Assays of anti-CD20 SMIPs

[0194] We determined the level of antibody dependent cytotoxicity (ADCC) (also referred to as FcCC) of the anti-CD20 SMIPs using a number of different target cells.

BJAB lymphoma cells

[0195] In one experiment, we labeled BJAB lymphoma cells with 0.5uM CFSE. Labeled cells were then incubated with anti-CD20 binders for 15 minutes, followed by the addition of activated PBMC (which were previously stimulated with IL-2 and IL-12 overnight). After 6 hours of incubation, we stained CFSE target cells ($CFSE^+$) with PI and assessed cell death using flow cytometry.

[0196] As demonstrated in Figure 5, RITUXAN®, TRU-015 and 2LM20-4 mediated comparable ADCC activity. Additional experiments using ^{51}Cr labeled BJAB cells demonstrated ADCC activity of 018008 and 018011 (data not shown).

Ramos B-cells and SU-DHL4

Preparation of Effector Cells

[0197] PBMNC were isolated by density-gradient centrifugation using (Lymphoprep™ Axis-Shield PoC AS, Norway). Whole blood was collected in a tube containing anticoagulant (heparin). The blood was diluted by addition of an equal volume of 0.9% NaCl and then 6 ml of diluted blood was layered over 3 ml of Lymphoprep solution in a 15 ml conical tube and centrifuged at 800 x g for 20 minutes at room temperature. The mononucleocytes recovered from the interface were washed and used in the ADCC and FcCC assays.

ADCC protocol

[0198] Effector and target cells were plated at a ratio of 50:1 in 96 well plates with varying concentrations of CD20-binder added to appropriate wells. Tests were conducted in triplicate at a final volume of 100 µl/well with medium alone, effector cells alone, target cells alone

and CD20-binder alone as controls. Fluorescent signal was measured as described above in the CDC assay.

Results

[0199] The ability of 018011 to facilitate Fc-mediated cellular cytotoxicity (FcCC) was assessed against CD20+ SU-DHL4 and Ramos BCL. In addition, TRU-015, RITUXAN® and anti-HER2 trastuzumab (used as an isotype-matched nonbinding control Fc) were used in this evaluation. Freshly isolated PBMNC from normal healthy donors were used as a source of effector cells in this assessment. PBMNC include FcγR3/CD16+ NK cells capable of mediating FcCC. In addition to NK cells, monocytes in the PBMNC also express FcγR and have the capability to bring about FcCC. Figure 6 present the results from experiments using CD20+ SU-DHL4 and Ramos B-lymphoma cells. Each of the CD20 binding agents was able to mediate FcCC in a dose-dependent manner using human effector cells.

[0200] Similar experiments with additional humanized CD20 binding molecules showed ADCC activity on Ramos B cells [Figure 11].

Table 4 - Rank of humanized anti-CD20 SMIPs

Ramos ADCC	Farage ADCC
TRU-015	2 LM 16 SCCP
2LM 19-3 SCCP	018008 SCCP
018008 SCCP	**TRU-015**
2LM 19-3 CSCS	2 LM 19-3 CSCS
2 LM 16 SCCS	2 LM 19-3 SCCP
2 LM 20-4 CSCS	2 LM 20-4 CSCS
2 LM 16 CSCS	2 LM 16 CSCS
RITUXIMAB	2 LM 16 SCCS
018009 SCCS	**RITUXIMAB**
018009 CSCS	018011 CSCS
018009 SCCP	2 LM 20-4 SCCP
018011 SCCS	018011 SCCS
018011 CSCS	018011 SCCP
2 LM 16 SCCP	018009 CSCS
018011 SCCP	018009 SCCS
2 LM 20-4 SCCP	018009 SCCP
018008 CSCS	018008 CSCS

Example 4 Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Study of anti-CD20 SMIPs.

[0201] To investigate the pharmacokinetics and pharmacodynamics of anti-CD20 SMIPs, we conducted a 26-week IV bolus pharmacokinetic study in cynomolgus monkeys. We treated adult female cynomolgus monkeys according to the following:

TABLE 5

Treatment Group	Test article	Dose Level (mg/kg)
1	Rituxan	1
2		10 (animals undergoing BM aspirates, LN biopsies)
3		10
4	2LM 20-4	1
5		10 (animals undergoing BM aspirates, LN biopsies)
6		10
7	2LM 20-4 mut Fc (attenuated CDC)	1
8		10 (animals undergoing BM aspirates, LN biopsies)
9		10

[0202] We obtained blood samples, lymph mode biopsies, and bone marrow aspirates from the animal groups to study the test article pharmacokinetics. Whole blood and serum samples were subject to hematology, flow cytometry, and PK analysis; lymph node biopsies were subject to flow cytometry and immunohistochemistry analysis; bone marrow aspirates was analyzed by flow cytometry.

[0203] Clinical observations of the animals were normal, none of the test articles was associated with adverse signs. In addition, we noted that hemoglobin levels, and platelet, monocyte, eosinophil and basophil counts were not affected by the test articles.

[0204] Flow cytometry analysis of peripheral blood showed that those groups treated with 10 mg/kg of 2LM 20-4 (wild type) or 2LM 20-4 mut Fc showed strong and long lasting elimination of $CD19^+$ B cells (Figure 8). Groups treated with 2LM 20-4, 2LM 20-4 mut Fc, and Rituxan showed comparable depletion of peripheral $CD19^+$ B cells.

[0205] Flow cytometry analysis of bone marrow revealed that groups treated with 2LM 20-4, 2LM 20-4 mut Fc, and Rituxan demonstrated comparable depletion of bone marrow CD19+ B cells on Day 8 (Figure 9). On day 22, however, the Rituxan-treated group had significantly higher number of CD19+ B cells, as compared to groups treated with 2LM 20-4 and 2LM 20-4 mut Fc (Figure 9).

[0206] Flow cytometry analysis of lymph nodes revealed that 2LM 20-4 demonstrated better efficacy compared to 2LM 20-4 mut Fc, both on Day 8 and Day 22

(Figure 10). 2LM 20-4 significantly reduced the relative percentage of lymph node $CD19^+$ B cells.

[0207] We also obtained pharmacokinetic (PK) data of 2LM 20-4 and 2LM 20-4 mut Fc in cynomolgus monkeys after IV administration. Both 2LM 20-4 and 2LM 20-4 showed slow elimination rate when adminstered at 10mg/kg, with a half-life of 7.2 ± 0.6 days for 2LM 20-4, and 5.5 ± 2.4 days for 2LM 20-4 mut Fc (Figure 11). The volume of distributing was small, about 40-70 ml/kg. There was some evidence of non-linear PK for the 1-20 mg/kg does rage. The PK profiles of 2LM 20-4 and 2LM 20-4 mut Fc were comparable to that of Rituxan and TRU-015.

[0208] In conclusion, we demonstrated that humanized anti-CD20 SMIPs, in particular 2LM 20-4, showed B-cell deletion efficacy that is comparable, if not better, than Rituxan.

Example 5. *In Vivo* Studies

A. *In Vivo* Evaluation of CD20-specific 018011, Against Subcutaneous or Systemically Disseminated Human B-cell Lymphoma Xenografts

[0209] Preclinical anti-tumor efficacy of 018011 against human B-cell lymphoma xenografts grown in nude mice was examined. 018011 inhibited growth of established subcutaneous B lymphoma xenografts and caused regression of established B-cell lymphoma xenografts in mice. There was no clear dose-response relationship in the anti-tumor activity of 018011. In a mouse model of disseminated B-cell lymphoma, when administered early in the disease process, 018011 protected scid mice with systemically disseminated B-cell lymphoma from hind limb paralysis and death.

Test and Control Molecules

CD-20 Binding Molecules

[0210] 018011 (3.1 mg/ml dissolved in 20 mM sodium phosphate, 240 mM sucrose, pH 6.0 or 4.09 mg/ml, dissolved in 10 mM histidine, 5 % sucrose, pH 6.0) and TRU-015 was stored at–80 °C. Rituximab (RITUXAN®) was obtained from MedWorld Pharmacy (Chestnut Ridge, NY). Drugs were diluted in phosphate buffered saline before use.

Cell Lines

[0211] The B-cell lymphoma (BCL) line Ramos (CRL-1596) was obtained from the American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA). The diffuse large B-cell lymphoma line WSU-DLCL2 (ACC-575) was obtained from Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ Braunschweig, Germany). Cells were determined to be mycoplasma free by a DNA fluorochrome staining assay (Bionique Testing Laboratories, Saranac Lake, NY). Cells were maintained in RPMI 1640 medium supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 10 mM HEPES (N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid), 1 mM sodium pyruvate, 0.2% glucose, penicillin G sodium (100 U/ml), streptomycin sulfate (100 μg/m), and L-glutamine (2mM). Before use, viable cells were isolated by centrifugation (30 min at 1000 x g) using a Lymphoprep (Axis Shield PoC AS, Oslo, Norway) density gradient.

Animals

[0212] Female, BALB/c and nu/nu (nude) mice (18-23 g) and CB17 scid male mice (18-23 g) were obtained from Charles River Laboratories, Wilmington, MA. All mice were housed in micro isolator units and provided with sterile food and water ad libitum throughout the studies.

Subcutaneous BCL Xenografts

[0213] Female, athymic (nude) mice were implanted with Ramos or WSU-DLCL2 subcutaneous xenografts. An additional group of mice were exposed to total body irradiation (400 rads) to further suppress their residual immune system before tumor implantation of Ramos BCL. Mice were injected with $1x10^7$ Ramos cells or $5x\ 10^6$ WSU-DLCL2 cells suspended in Matrigel (Collaborative Biomedical Products, Belford, MA, diluted 1:1 in RPMI 1640 medium) in the dorsal, right flank. When the tumors reached an appropriate mass (usually >100 mg), they were staged to maximize uniformity of the tumor mass prior to the administration of therapy (n=8 to 10 mice/treatment group). Compounds were administered either iv or ip in sterile saline (0.2 ml/mouse). To account for the difference in molecular weight between 018011 and RITUXAN®, the dosage of each drug administered to mice was adjusted to allow for molar equivalence of each protein. Accordingly, the amount of RITUXAN® administered was approximately 137% of the amount of 018011 administered. Tumor length and width (in cm) was measured at least once a week and tumor

mass was calculated by the following: tumor mass (g) = [0.5 x (tumor width2) (tumor length)]. Mean (± sem) tumor mass for each treatment group was calculated and compared to the vehicle-treated group for statistical significance using ANOVA and subsequent pairwise comparison to the vehicle-treated group by a one-tailed t-test with the error term for the t-test based on the pooled variance across all treatment groups. Tumor mass values for each treatment group were recorded up to 100 days after the initiation of treatment or until the tumors grew to 15% of the body weight at which time these mice were euthanized according to institutional regulations. The number of tumor-free mice at the end of each study was recorded. Survival of mice was plotted and was determined by tumor mass; any mouse with a tumor mass ≥ 1.5 g was considered dead for the calculation of the survival plot even though mice were not killed until the tumor mass reached 15% of mouse body weight according to institutional guidelines.

Assessment of Anti-tumor Efficacy Against Disseminated BCL

[0214] Male scid mice were injected intravenously with $3x10^6$ Ramos cells or $5x10^6$ WSU-DLCL2 cells in a volume of 0.2 ml in the tail vein. Dissemination and growth of the cells was allowed to occur over a period of 3 days (designated as the developing model), 6 days (designated the intermediate model) or 9 days (designated as the established model) prior to the initiation of drug therapy. Mice with disseminated disease (9 to 13 mice/treatment group) were administered vehicle (PBS), 018011, TRU-015 or RITUXAN® iv on designated days. Mice with disseminated disease were monitored daily for the presence of hind-limb paralysis or death for up to 100 days. Mice exhibiting hind-limb paralysis were euthanized by CO_2 asphyxiation according to institutional regulations.

[0215] The average survival time (days ± SD) was calculated for each group. The difference in survival distribution between groups was determined by using nonparametric methods comparing the survival distribution of the diseased mice. Multiple comparisons were performed using the rank transformation procedure. The rank transformation procedure consists of replacing the survival times with their ranks and applying the usual parametric F-test to the ranks. Multiple comparisons were performed using Tukey's method on the ranks. Tukey's method indicates the difference in survival times among mice with significance reported at the 0.05 level. The survival curves were constructed using the Kaplan-Meier method (J Am Stat Assoc 1958;53:457-81).

[0216] Bone marrow cells from the femur were collected from some scid mice with disseminated Ramos BCL and evaluated for the expression of human CD19 or murine CD45 antigen by incubating with control FITC-labeled rat IgG2A, FITC-labeled mouse IgG1, FITC-labeled rat anti-mouse CD45 or FITC-labeled mouse anti-human CD19 (all FITC-labeled reagents from BD Pharmingen, San Diego, CA). Cells were pelleted, washed with PBS-1 % BSA and then fixed with 1% formaldehyde. Samples were analyzed on a FACSort flow cytometer for the presence or absence of human CD19 expressing cells. The number of human CD19+ cells was displayed as a percent of the total number of cell population gated based on the forward and side light scatter properties characteristic of lymphoid cells identified by the expression of CD45 common leukocyte antigen.

[0217] The animals used in this study are listed in Table 5.

Table 6: Specifications of Mice Used

Characteristics	Specifications
Species:	Mouse
Strain:	Balb/c, nu/nu, CB17 scid
Source:	Charlse River, Wilmington, MA
No. of Animals Per Group:	8 to13
Total No. of Animals:	492
Age and Sex:	6 to 8 week old, Balb/c and nu/nu (female), CB17 scid (male)
Weight:	18g – 25g
Date Received:	10 April 2006
Acclimation Period:	1 week minimum

Results

Effect of 018011 on Ramos Subcutaneous Xenografts

[0218] Vehicle, 018011 (4 mg/kg iv) or RITUXAN® (5.5 mg/kg iv) were administered at molar equivalent dosages to Balb/c mice with established Ramos xenografts. Individual mouse tumor mass over time is shown in Figure 12 (results plotted are pooled from 2 separate studies) and survival (based on tumor mass <1.5 g) shown in Figure 13. In another study conducted using nu/nu nude mice, vehicle, 018011 (8 mg/kg ip), TRU-015 (8 mg/kg ip) or RITUXAN® (11 mg/kg ip) were administered at molar equivalent dosages to nu/nu mice with established Ramos xenografts.

[0219] Dose responsive activity of 018011 and RITUXAN® was examined in the Ramos xenograft model established in Balb/c mice and of 018011, RITUXAN® and TRU-015 in the WSU-DLCL2 xenograft model established in nu/nu mice (Table 7). In both studies all compounds were administered as 5 doses every other day (excluding weekends) by the ip route of drug administration. The number of tumor free mice was recorded (day 50 for the Ramos study and day 100 for the WSU-DLCL2 study).

Table 7 Effect of 018011, TRU-015 and Rituximab on Ramos and WSU-DLCL2 Xenografts

Treatment	Ramos Day 50 Dose (mg/kg ip)	Ramos Day 50 Tumor Free Mice (tumor free/total mice)	WSU-DLCL2 Day 100 Dose (mg/kg ip)	WSU-DLCL2 Day 100 Tumor Free Mice (tumor free/total mice)
Vehicle		1/10		3/10
018011	2	3/10	1	7/9
	4	0/10	2	2/9
	8	5/10	4	7/8
	16	3/10	8	6/8
Rituximab	2.8	1/10	1.4	6/8
	5.5	3/10	2.5	4/8
	11	3/10	5	7/8
	22	3/10	11.6	5/8
TRU-015			1	4/8
			2	4/9
			4	6/8
			8	3/8

Effect of 018011, TRU-015 and Rituximab on Disseminated Lymphoma in Scid Mice

[0220] The ability of 018011, TRU-015 and RITUXAN® to prolong survival of CB17 scid mice with systemically disseminated B-lymphoma was evaluated. In this model, intravenous injection of CD19+ CD20+ Ramos B-lymphoma cells allows their rapid dissemination into various organs including the central nervous system, eventually causing hind-limb paralysis and death (Clin Can Res 2004;10:8620-9). Compounds were administered iv in scid mice with disseminated Ramos B-lymphoma either during the developing (early) phase (therapy initiated 3 days post-dissemination of Ramos cells), during the intermediate phase of the disease (therapy initiated day 6 after tumor cell dissemination) or the established (late) phase (therapy administered 10 days post-dissemination) of the disseminated disease. As shown in Figure 16 the administration of equimolar doses of 018011, TRU-015 or RITUXAN® (2 mg/kg, 2 mg/kg and 2.8 mg/kg, respectively) during the

developing phase (beginning day 3) of the disseminated disease resulted in a significant protection against the developing disseminated disease. Delaying the administration of 018011, TRU-015 or RITUXAN® to 10 days post-dissemination resulted in a significant loss of the protective activity of each protein. During the established phase of the disease, each compound was given for 5 doses (as opposed to 3 doses in the developing phase and 4 doses in the intermediate phase) and at 4 times the dosage (8 mg/kg, 8 mg/kg and 11.2 mg/kg for 018011, TRU-015 and RITUXAN®, respectively) as was administered in the developing phase. Even at these higher and more prolonged dosages, the activity of each of the compounds in the established disease was significantly less than that during the developing phase of the disseminated model. These results suggest that 018011, TRU-015 and RITUXAN® are more efficacious against the developing disease than the established disease in the Ramos disseminated disease model.

[0221] Bone marrow collected from mice with Ramos disseminated disease was examined for the presence of disseminated human CD19+ Ramos cells. Majority of the bone marrow-derived lymphoid cells from vehicle-treated mice with disseminated disease expressed human CD19 antigen indicative of the presence of human lymphoid cells in the bone marrow. Treatment with 018011, TRU-015 or RITUXAN® during the early phase (beginning 3 days post-BCL dissemination) of the disseminated disease process reduced the percentage of human CD19+ cells in the bone marrow to <10% (Figure 17). None of these mice in the early-treatment group presented with hind-limb paralysis. Close to 30% of lymphoid cells isolated from the bone marrow of mice treated during the established phase (beginning 10 days post-BCL dissemination) of the disease process expressed human CD19 antigen. Mice in this late treatment group experienced hind-limb paralysis. The expansion of human B-lymphoma cells in the bone marrow may be an indication of the degree of disease progression in these diseased mice.

[0222] The effect of 018011, RITUXAN®, and TRU-015 was investigated in the WSU-DLCL2 diffuse large B-cell lymphoma disseminated disease model. Therapeutic proteins were administered iv beginning on day 3 post-tumor cell injection for a total of 3 doses for the developing model and beginning day 10 for a total of 5 doses for the established model. Proteins were administered at equivalent molar dosages. 018011 significantly ($p<0.05$ vs vehicle-treated mice) protected mice against the tumor cell-induced hind-limb paralysis (Figure 18) while the effect of TRU-015 approached statistical significance ($p=0.073$ vs vehicle-treated mice) when administered early in the disease process (developing phase). The effect of RITUXAN® was not significant in the developing phase nor was the

effect of any of the 3 proteins significant when administered during the established phase of the disease. These results are similar to those observed in the Ramos disseminated model when compounds were administered during the established phase of the disease.

Effect of Intravenously and Intraperitoneally Administered 018011 on Ramos Subcutaneous Xenografts

[0223] The anti-tumor activity of 018011 (8 mg/kg) was compared after iv and ip drug administration. 018011 was given 5 times every other day after tumor staging (Balb/c mice) and its anti-tumor activity was monitored. Both routes of drug administration significantly ($p<0.05$) inhibited tumor growth (Figure 19). The anti-tumor activity of the 018011 administered ip was maintained for a greater length of time than that of 018011 administered iv. This study demonstrates that 018011 administered either ip or iv is efficacious in inhibiting the growth of human B-cell lymphoma xenografts.

Effect of 018011 and Rituximab on Subcutaneous Xenografts in Irradiated and Non-irradiated Nude Mice

[0224] Gamma-irradiation can suppress the innate immune system facilitating establishment of tumor xenografts in immunocompromised nude mice. In light of the possibility that irradiation may also impact the effector cells capable of mediating the anti-tumor activity of therapeutic antibodies, the anti-tumor activity of 018011 and RITUXAN® against Ramos B-lymphoma xenografts was assessed in irradiated (4 Gy equivalent to 400 rads) or nonirradiated Balb/c nude mice. Ramos xenografts were established in both irradiated and non-irradiated mice. 018011 (8 mg/kg ip) and RITUXAN® (11.2 mg/kg ip) were each able to significantly ($p<0.05$ vs vehicle-treated mice) inhibit the growth of Ramos B-lymphoma xenografts in both irradiated and non-irradiated mice (Figure 20). Tumors grew more rapidly and the inhibitory effect of each compound was not as robust in the irradiated mice as that observed in non-irradiated mice. These results suggest that irradiation of the host may negatively impact the therapeutic activity of immunotherapeutic agents such as 018011 or RITUXAN® that depend on the functional integrity of the effector cells of the immune system. The mechanism(s) by which irradiation effects the therapeutic activity of 018011 has not been investigated.

Conclusion

[0225] 018011 was active as an anti-tumor agent in preclinical models. It inhibited growth of established subcutaneous B lymphoma xenografts and protected mice with disseminated B-cell lymphoma when administered earlier rather than later in the disease process.

B. Efficacy of HuCD20 SMIPS in an Established Ramos Tumor Xenograft Model in Nude Mice

[0226] The following experiments tested the efficacy of humanized CD20-specific SMIPS (HuCD20 SMIPS) in a model of established Ramos tumor xenografts in nude mice. The experiments were carried out in triplicate (referred hereon as (A), (B) and (C)). 7.5-8 week old Athymic Nude-Foxn1^{nu} mice (Harlan Livermore, CA) were used.

Establishment of Ramos tumor xenografts and sorting into treatment groups

[0227] Ramos cells are a CD20^{+} human B-lymphoblastoid cell line derived from a Burkitt's lymphoma. Five million Ramos cells were injected subcutaneously into the flank of female athymic nu/nu mice. On day 6 post-tumor inoculation, palpable tumors were apparent in the majority of mice. The tumor-bearing mice were sorted into groups (n=8 per group; 2 cages of 4 mice for each group) with equivalent mean tumor volumes. The day of the sort was defined as Day 0 of the study. Tumors were measured with a calipers and tumor volumes were calculated using the formula: V=½[length x (width)^2]. The baseline mean tumor volume for this experiment was 228 mm^3, (A) and (B), or 227 mm^3(C); the median baseline tumor size was 228 mm^3 (A), 233 (B), or 225 mm3 (C); and the range was 180-281 mm3 (A), 168-300 mm3 (B) or 157-300 mm3(C).

Reagents for in vivo use.

Reagent	Source and Lot No.	Concentration and endotoxin	Preparation for injection
PBS	Gibco, 14190	1X concentration <0.03 EU/mL	NA

Human IgG (huIgG)	Sigma, I 4506	10 mg/mL endotoxin = 10 EU/mg	Each protein reagent listed at left was diluted to 0.5 mg/mL in PBS on day 0 of the study.
018008	In house	2.79 mg/mL endotoxin <0.25 EU/mg	
2Lm20-4	In house	2.79 mg/mL endotoxin <0.25 EU/mg	
018011	In house	3.1 mg/mL endotoxin <0.25 EU/mg	
TRU-015	In house	10.2 mg/mL endotoxin <0.05 EU/mg	

Blinding protocol

[0228] The PBS and protein (drug) solutions were prepared in similar volumes and the contents of the tubes were noted on removable labels. An investigator who was not treating or assessing the mice placed a color code on each tube and noted the code and identity of the tube contents in a laboratory notebook. The possibility of investigator bias is reduced, but not eliminated, with this design because investigators performing the study were only partially "blinded" in that they did not know which treatment a particular group of mice was receiving, but did know that all the mice within a group of 2 cages belonged to the same group. The code was revealed at the end of the study; however, the investigator who was aware of the code was able to monitor the study results on an interim basis.

***In vivo* treatment**

[0229] Mice were injected intravenously (IV) on days 0, 2, 4, 6, and 8 with 100 μg of human IgG, TRU-015, 018008, 018011, or 2Lm20-4 in a volume of 0.2 mL. PBS and drug solutions were color-coded as described above.

Monitoring and endpoints

[0230] Mice were monitored daily by visual inspection. Weights were determined, and tumors were measured with a pair of calipers at least 3 times per week (M, W, F) by an observer blinded (see above) to the treatment groups. Tumor volumes were calculated as described above. Tumor volumes on the last day that all mice in all groups were alive were also expressed in terms of tumor volumes relative to day 0, using the formula:

[0231]

Relative tumor volume on day of interest = $\frac{\text{(volume on day of interest – volume on day 0)}}{\text{volume on day 0}}$

[0232] Weight and tumor monitoring days were changed to once a week during times when the mice remaining in the study had no palpable tumors. Mice were sacrificed if the tumors reached more than 1500 mm^3. Note that death is not an endpoint in the tumor protocols, and unless noted otherwise, "survival" of a mouse was determined by the time of its sacrifice.

[0233] The study was ended at day 90.

Statistical analyses

[0234] All statistical analyses were performed using GraphPad Prism software. Significant differences in mean tumor volumes or mean relative tumor volumes on day 8 were determined using a using a one-way ANOVA with Dunnett's multiple comparison post-test (for comparison with huIgG control) and Tukey's multiple comparison post-test (for all other pairwise comparisons). Significant differences in survival of mice over time were determined using Kaplan-Meier survival analysis with a log-rank test for comparing survival curves. Significant differences in the incidence of tumor-free mice at the end of the observation period were determined using Fisher's exact test. p values <0.05 were considered significant.

Results

[0235] Treatment of mice with TRU-015 or with any of the three HuCD20 SMIPS (018008, 018011, and 2Lm20-4) resulted in a slowing of tumor growth relative to controls and/or reduction in tumor volume relative to the baseline measurements (Figures 21-23). The mean tumor volume and the mean relative tumor volume of the huIgG-treated group differed significantly from the TRU-015, 018008 and 2Lm20-4 ((C) only) treated groups at day 8, which was the last day at which all mice were alive (Figures 22A-22B). There were no significant differences in mean tumor volumes or relative tumor volumes between the huIgG treated group and any other HuCD20 SMIP treated group or between any two HuCD20 SMIP

treated groups. Mice were sacrificed starting on day 8; therefore comparisons of tumor volumes were not made at the later time points.

[0236] Mice were sacrificed when the tumor volume reached the limits mentioned above. No mice were found dead and none were sacrificed due to extreme weight loss, tumor ulceration or impaired mobility, thus the "survival" time was another measure of the rate of tumor growth. As shown in Figures 23 and summarized in Table 8, the median survival time in the huIgG control group was 10 days. In contrast, median survival times were increased significantly relative to the control group in each of the other groups of mice. The median survival times of the mice in the TRU-015, 018008, 018011, and 2Lm20-4 treatment groups were 24.0, 88.5, 20.5 and 20.5 days (A), 22.0, 50.0, 11.5 and 13.5 days (B), or 40.5, 52, 16 and 83 days (C), respectively. There was no significant difference in the median survival times between any two of these groups (Table 8).

[0237] None of the 8 huIgG-treated mice were alive at the end of the 90 day observation period and thus the tumor-free incidence of this group at day 90 was 0/8 (Figure 24 and Table 8). The incidence of tumor-free mice at the end of the observation period was 2/8 (25%) (A) or 1/8 (12.5%) (B) and (C), in the TRU-015 treated group; 4/8 (50%) (A), 3/8 (37.5%) (B) and (C), in the 018008 treated group; 1/8 (12.5%) (A) and (B), or 2/8 (25%) (C), in the 018011 treated group; and 1/8 (12.5%) (A) and (B), or 4/8 (50%) (C), in the 2Lm20-4 treated group. There was no significant difference in the incidence of tumor-free mice between the huIgG control group and any of the treatment groups, or between any two other groups of mice (Table 8 and 9).

[0238] No overt signs of toxicity or weight loss were observed in any of the treatment groups (Figure 25).

Table 8 Median Survival Time and Incidence of Tumor-Free Mice at the end of the Observation Period

Treatment Group	Median Survival Time (days)[a]	*p Value From Log Rank Test*[b]	*Tumor-Free Mice at Day 90*[c]	p Value from Fisher's Exact Test[b]
HuIgG (200 μg)	10	---	0/8 (0%)	---
TRU-015 (200 μg)	**24 (A)** **22 (B)**[d] **40.5 (C)**	**0.0023 (A)** **0.0001 (B)** **0.0006(C)**	**2/8 (25%)(A)** **1/8 (12.5%) (B)** **1/8 (12.5%)(C)**	**0.4667(A)** **1.0000(B, C)**
018008 (200 μg)	**88.5 (A)** **50 (B)** **52 (C)**	**0.0007 (A)** **0.0079 (B)** **0.0090(C)**	**4/8 (50%) (A)** **3/8 (37.5%)(B,C)**	**0.0769(A)** **0.2000(B, C)**
018011 (200 μg)	**20.5 (A)** **11.5 (B)** **16(C)**	**0.0470 (A)** **0.0198 (B)** **0.0006(C)**	**1/8 (12.5%)(A,B)** **2/8(25%)(C)**	**1.0000 (A,B)** **0.4667(C)**
2Lm20-4 (200 μg)	**20.5 (A)** **13.5 (B)** **83 (C)**	**0.0061 A)** **0.0198 (B)** **0.0001(C)**	**1/8 (12.5%)(A,B)** **4/8(50%)(C)**	**1.0000 (A,B)** **0.0769(C)**

[a] "Survival" of a mouse was determined by the time of its sacrifice due to tumor growth. No mice were found dead or sacrificed for other reasons. The study ended at Day 90.
[b]Each group was compared with the HuIgG treated group. For other comparisons, see Table 9 below.
[c] "Tumor-free" mice had no palpable tumors. The absence of tumor cells was not confirmed by histology.
[d]Bold-faced values are significantly different from those of HuIgG control group.

Table 9 p Values for Comparison of Survival Curves and Tumor-Free Incidence Between the TRU-015 and HuCD20 SMIP Treated Groups

	p Values for Indicated Comparisons[a]	
HuCD20 SMIP Groups	**Log rank test (comparison of survival curves)**	**Fisher's exact test (comparison of tumor-free incidence) at day 90**
TRU-015 vs. 018008	**0.3594(A)** **0.4405(B)** **0.4452(C)**	**0.6084(A)** **0.5692(B)** **0.5692(C)**
TRU-015 vs. 018011	**0.6727(A)** **0.8367(B)** **0.9165(C)**	**1.0000(A,B,C)**
TRU-015 vs. 2Lm20-4	**0.4535(A)** **0.7089(B)** **0.1069(C)**	**1.0000(A,B)** **0.2821(C)**
018008 vs. 018011	**0.0806(A)** **0.2421(B)**	**0.2821(A)** **0.5692(B)**

	0.6302(C)	**1.0000(C)**
018008 vs. 2Lm20-4	**0.1225(A)** **0.2421(B)** **0.5243(C)**	**0.2821(A)** **0.5692(B)** **1.0000(C)**
018011 vs. 2Lm20-4	**0.7614(A)** **0.7766(B)** **0.1274(C)**	**1.0000(A,B)** **0.6084(C)**

[a]***See legend to Table 8 for information on groups.***

[0239] On study Day 0, nude mice bearing palpable Ramos tumors were sorted into treatment groups (n=8/group) such that the mean tumor volume for each group was equivalent. Mice were treated IV on days 0, 2, 4, 6, and 8 with 100 μg of human IgG, TRU-015, 018008, 018011, or 2Lm20-4. Tumors were measured on the indicated days with a caliper and tumor volume was calculated using the formula: V=½[length x (width)2]. Once an animal was taken out of the study due to tumor volume exceeding specified limits, the value for the last tumor volume was carried forward. Results are shown only through day 10, when the last control mice were sacrificed.

[0240] Results are shown in terms of tumor volume of individual mice on day 8 (the last time point in which all mice were alive) (A) or relative tumor volume of individual mice on day 8 relative to day 0 (B). Significant differences among groups were determined using a one-way ANOVA with Dunnett's multiple comparison post test (for comparison with huIgG treated controls) and Tukey's multiple comparison post test (for all other pairwise comparisons); p values for all pair wise comparisons are indicated.

[0241] Mice were treated and monitored, and tumor volumes were determined as described in the legend to Figure 21. Tumor volumes were determined at least 3 times a week (M W F) with the exception that monitoring was switched to once per week during time periods when all mice remaining in the study had no palpable tumors. Mice were sacrificed when tumor volumes reached more than 1500 mm3 (or 1200 mm3 on Fridays). No mice were found dead or sacrificed for other reasons.

C. **Intratumoral Accumulation of Humanized CD20 Binding Molecule**

[0242] Intratumoral accumulation of 018011 in subcutaneous human B-cell lymphoma xenografts established in nude mice was evaluated by indirect immunofluorescence analysis (IFA) and flow cytometry and compared with that of

RITUXAN®, a benchmark CD20-specific antibody therapeutic. Both agents were administered as a single intravenous dose. As assessed by flow cytometry, RITUXAN® bound to a greater degree to Ramos or WSDLCL2 cells in vitro. This difference was not apparent by IFA analysis. IFA analysis of WSU-DLCL2 subcutaneous xenografts (agents administered 0.5 mg iv) demonstrated that staining for 018011 tended to be more diffuse throughout the tumor while RITUXAN® staining appeared more punctuate and not as diffuse as that of 018011. Similar results were observed in Ramos xenografts when agents were administered at a dose of 1 mg/mouse and analyzed either 24h or 96h post administration. Flow cytometric analysis of lymphoma cells isolated from xenografts confirmed this observation.

Test and Control Articles

CD-20 Binding Molecules

[0243] 018011 (3.1 mg/ml dissolved in 20 mM sodium phosphate, 240 mM sucrose, pH 6.0 or L37852-001, 4.09 mg/ml, dissolved in 10 mM histidine, 5 % sucrose, pH 6.0) was stored at –80° C. Rituximab (RITUXAN®), trastuzumab (HERCEPTIN®), and cetuximab (ERBITUX®) were obtained from MedWorld Pharmacy (Chestnut Ridge, NY). Drugs were diluted in phosphate buffered saline before use.

Cell Lines

[0244] The B-cell lymphoma line Ramos (CRL-1596) was obtained from the American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA). A diffuse large B-cell lymphoma line WSU-DLCL2 (ACC-575) was obtained from Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ Braunschweig, Germany). All cell lines were determined to be mycoplasma free by a DNA fluorochrome staining assay (Bionique Testing Laboratories, Saranac Lake, NY). Each cell line was maintained in RPMI 1640 medium supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 10 mM HEPES (N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid), 1 mM sodium pyruvate, 0.2% glucose, penicillin G sodium (100 U/ml), streptomycin sulfate (100 μg/m), and L-glutamine (2mM). Before use, viable cells were isolated by centrifugation (30 min at 1000 x g) using a Lymphoprep (Axis Shield PoC AS, Oslo, Norway) density gradient.

Animals

[0245] Female, BALB/c, nu/nu (nude) mice (18-23 g) were obtained from Charles River Laboratories, Wilmington, MA. All mice were housed in micro isolator units and provided with sterile food and water ad libitum throughout the studies.

The animals used in this study are listed in Table 10.

Table 10: Specifications of Mice Used

Parameters	Specifics
Species:	Mouse
Strain:	Balb/c nudes
Source:	Charles River, Wilmington, MA
No. of Animals Per Group:	1-4
Total No. of Animals:	26
Age and Sex:	6 to 8 week old, Balb/c nudes (female)
Weight:	18g – 25g
Date Received:	05 February 2007
Acclimation Period:	1 week minimum

Immunofluorescence (IFA)

[0246] Ramos or WSU-DLCL2 cells were plated at 500,000 cells per well on Poly-D-Lysine 8 well culture slides (BD BioCoat cat # 354632) and grown overnight. The following day, cells were incubated with 100nM RITUXAN®, trastuzumab, or 018011 for 30 minutes at 37°C in the presence of 5% CO_2. Cells were then fixed with 3.75% formaldehyde and 0.2M sucrose in PBS. Cells were re-hydrated by washing with PBS (3x5 minutes) and then incubating in 0.1 M glycine in PBS for 10 minutes. Cells were blocked with 3% BSA/ PBS for 1 hour. All subsequent steps were conducted in the dark. Specific binding was analyzed using fluorescein (FITC) goat anti-human IgG, Fcγ fragment specific at 1:100 dilution in 1% BSA/ PBS for 30 minutes at 37°C (Jackson ImmunoResearch Labs cat# 109-095-008). Some slides were also stained with R-PE anti mouse CD31 (Caltag Laboratories). To separate the chamber and slide, chambers were soaked in 70% MEOH for 2 min taking care not to expose the cells. A drop of mounting media with DAPI counterstain (ProLong anti-fade reagent with DAPI, Invitrogen cat # P36931) was added to each chamber with a cover slip. Immunofluorescence was evaluated using a fluorescent microscope (Nikon Eclipse E400). To allow direct comparisons, all images were obtained using the same

parameters (brightness, contrast, 40 x magnification, etc.). Images were acquired with a Spot RT Slider (Diagnostics Instruments, Sterling heights, MI) digital camera and processed using Spot Advanced (version 4.0.9) digital software

Intratumoral Accumulation into Subcutaneous Xenografts

[0247] Female, athymic (nude) mice were injected with $1x10^7$ Ramos cells suspended in Matrigel (Collaborative Biomedical Products, Belford, MA, diluted 1:1 in RPMI 1640 medium) in the dorsal, right flank. When the tumors reached an appropriate size, vehicle (PBS), 018011, RITUXAN®, trastuzumab (used as an isotope matched, non-binding control) or cetuximab (used as an isotope matched, non-binding control) were administered iv (0.2 ml/mouse) into the tail vein of the mouse. Tumors were excised after 24 or 96 h for analysis. Tumors were weighed at time of necropsy. Excised tumors were snap frozen in embedding medium (O.T.C. compound, Tissue-Tek cat# 4583, Sakura Fintec Torrance, CA) and stored at –80°C. Four micron frozen sections were cut with a microtome (Tissue-Tek Cryo 2000). Sections were air dried for thirty minutes and stored at –80°C. Sections were then fixed and processed as described according to the IFA protocol (3.1).

Tumor Tissue Digestion and Flow Cytometry

[0248] Tumors were excised and minced into 1-2 mm pieces. Tumor pieces were digested with Type 4 collagenase treatment (Worthington, Lakewood, NJ) by adding 2 ml of a 2 mg/ml stock to the tumor pieces for 30 min at 37°C. Cells were titerated, spun down to collect the cells, and then resuspended in fresh culture media. Binding to the dispersed tumor cells by 018011, RITUXAN® or trastuzumab was then assessed by flow cytometry as described in Example 1.

Results

Intratumoral Accumulation into Subcutaneous Xenografts

[0249] Mice with WSU-DLCL2 subcutaneous xenografts (tumor mass between 130 mg to 270 mg) were administered 018011, RITUXAN®, or trastuzumab (0.5 mg/ mouse iv) and tumors were excised for IFA 24 h later. Staining for 018011 tended to be more diffuse than that of RITUXAN®. RITUXAN® staining appeared more punctuate and intense and not as diffuse as that of 018011. Sections were also stained for blood vessels (CD31).

Neither agent appeared to accumulate around the vessels, both were able to diffuse deep into the tumor. Mice were also treated with a dose of 0.2 mg/mouse iv of 018011 and RITUXAN®. IFA of the tumors taken from the 0.2 mg treatment group demonstrated staining of both 018011 and RITUXAN® (data not presented) though neither agent was as intense or diffuse in its staining as was observed in the 0.5 mg treatment groups.

[0250] Mice with Ramos subcutaneous tumors (tumor mass between 100 mg and 400 mg) were treated with 018011, RITUXAN® or trastuzumab (all human IgG1) at 1 mg/mouse iv and tumors were excised at 24 and 96 h after the injection of the agents. Both 018011 staining intensity and RITUXAN® staining intensity appeared to be the same after either 24 or 96 h. Similar to the observations made using WSU-DLCL2 xenografts, 018011 staining appeared to be more diffuse than that of RITUXAN®, which was more punctuate and intense. Trastuzumab produced very minimal background staining. Part of each xenograft tissue used for IFA was digested at the time of excision and then the presence of 018011, RITUXAN®, or trastuzumab bound to xenografts-derived cells was analyzed by flow cytometry (Figure 26). The flow cytometric profile suggested that both 018011 and RITUXAN® were detected bound on the cell surface of the xenograft-derived cells. Binding of 018011 and RITUXAN® was quantitatively similar. Cells from the xenografts isolated 96 hr after the iv injection of 018011 or RITUXAN® had higher levels of the CD20-binder than those isolated 24 hr after the same treatment. There was no detectable 018011 or RITUXAN® bound to xenografts-derived cells isolated 2 hr after the iv injection of either agent (data not presented). When the dose of each agent was reduced to 0.5 mg/mouse iv, it appeared that the staining intensity of 018011 was slightly enhanced in 2 separate studies (assessed at 24 h post dose) relative to RITUXAN®, though this was not quantifiable under the conditions of the study. Tumor mass was between 290 mg and 420 mg for mice used for generating results in and between 820 mg and 3000 mg for mice used in generating the results in. It appears, therefore, that tumor size did not significantly affect the tumor accumulation of either agent since results observed in were comparable while tumor masses were considerably larger in the second of the studies. When mice were treated with lower doses of either CD20 targeting agent (0.05, 0.1, or 0.2 mg/mouse iv), no 018011 was detectable while minimal staining of RITUXAN® was observed at the 0.1 and 0.2 mg dose groups (data not presented).

Example 6. Growth Inhibition

Growth Inhibition Assay

[0251] In vitro growth of BCL was assessed using MTS, a vital dye (Promega, Madison, WI). This test depends on the conversion of MTS into a colored product by intact mitochondria from viable cells and is a reliable indicator of viable cells in culture. For each of the 6 BCL a calibration curve (cell number versus optical density of the colored product derived after approximately 2h incubation time with MTS) was established to estimate an appropriate initial seeding density. Cells were then seeded in 96-multiwell dishes at a density of 10,000 to 50,000 cells per well depending on the cell line. After seeding, the cells were exposed to various concentrations of 018011, TRU-015 or RITUXAN® and, after a 96 hr incubation period, the viable cell number in each culture was determined.

[0252] The effect of crosslinking 018011 or RITUXAN® with anti-human IgG Fc antibody was assessed using propidium iodide (PI) exclusion measured by flow cytometry. Cell membranes of damaged cells allow PI to enter the cells and stain nuclear DNA whereas cell membranes of viable cells are impermeable to PI and thus PI cannot stain their nuclear DNA. To this end, thirty thousand BCL were plated in 96 well microtiter plates with increasing concentrations of 018011 or RITUXAN® followed by the addition of goat anti-human IgG Fc antibody (Jackson Immunoresearch) at either 1 or 10 μg/ml and incubation at 37° C for 24 h. After the incubation, cell viability was measured flow cytometrically by PI exclusion. Data analysis was conducted using the CellQuest program (Becton-Dickinson).

Growth Inhibitory Effect of 018011 Against Human B-Lymphoma Cells

[0253] The ability of 018011 to inhibit the growth of various B-lymphoma cell lines was evaluated in vitro and was compared to that of RITUXAN® and TRU-015. Six human CD20+ B-cell lines were cultured for 96 hr with increasing concentrations of individual CD20-binders after which the viable cell number in each culture was enumerated. As shown in Figure 27, neither 018011, TRU-015, nor RITUXAN® directly caused biologically meaningful growth inhibition in 5 out of the 6 B-lymphoma cell lines studied. The exception was the SU-DHL4 B-cell line whose growth was inhibited in a dose-dependent manner by TRU-015 and RITUXAN® but not significantly by 018011. Thus, the expression of CD20 is necessary but not sufficient to ensure the direct inhibition of BCL by any of the CD20-binders. Factors other than the degree of surface expression of CD20 govern the susceptibility of B-lymphoma cells to these anti-CD20 agents. Cross-linking 018011 or

RITUXAN® on the surface of Ramos cells with anti-human IgG Fc enhanced the cytotoxic activity of both agents (Figure 28).

[0254] All publications, patents and patent applications are herein incorporated by reference in their entirety to the same extent as if each individual publication, patent or patent application was specifically and individually indicated to be incorporated by reference in its entirety.

SEQUENCES

***Italics*: Linker sequence**
<u>Underline</u>: CDR sequences

Construct Name	VK3	VH5	
18011	**2Lm19-3**	**2H5m3**	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC**<u>RASQSVSYI</u>**V WYQQKPGQAPRLLIY**<u>APSNLAS</u>**GIPARFSGS GSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYC**<u>QQWSFNPPT</u>** FGQGTKVEIK*DGGGSGGGGSGGGGTG*EVQLV QSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFT**<u>SYNMH</u>**W VRQMPGKGLEWMG**<u>AIYPGNGDTSYNQKFKG</u>** QVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCAR **<u>SYYSNSYWYFDL</u>**WGRGTLVTVSS (SEQ ID NO:1)
18008	**2Lm5**	**2H5**	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC**<u>RASQSVSYMH</u>** WYQQKPGQAPRLLIY**<u>APSNLAS</u>**GIPARFSGSGS GTDFTLTISSLEPEDFAVYYC**<u>QQWSFNPPT</u>**FGQ GTKVEIK*DGGGSGGGGSGGGGTG*EVQLVQSGA EVKKPGESLKISCKGSGYSFT**<u>SYNMH</u>**WVRQMP GKGLEWMG**<u>AIYPGNGDTSYNQKFKG</u>**QVTISA DKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCAR **<u>VVYYSNSYWYFDL</u>**WGRGTLVTVSS (SEQ ID NO:2)
18010	**2Lm19-3**	**2H5**	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC**<u>RASQSVSYIV</u>** WYQQKPGQAPRLLIY**<u>APSNLAS</u>**GIPARFSGSG SGTDFTLTISSLEPEDFAVYYC**<u>QQWSFNPPT</u>**F GQGTKVEIK*DGGGSGGGGSGGGGTG*EVQLV QSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFT**<u>SYNMH</u>**W VRQMPGKGLEWMG**<u>AIYPGNGDTSYNQKFKG</u>** QVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCAR **<u>VVYYSNSYWYFDL</u>**WGRGTLVTVSS (SEQ ID NO:3)

18009	**2Lm5**	**2H5m3**	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC**RASQSVSYIV** WYQQKPGQAPRLLIY**APSNLAS**GIPARFSGS GSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYC**QQWSFNPPT** FGQGTKVEIK*DGGGSGGGGSGGGGTG*EVQLV QSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFT**SYNMH**W VRQMPGKGLEWMG**AIYPGNGDTSYNQKFKG** QVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCA R**VVYYSNSYWYFDL**WGRGTLVTVSS (SEQ ID NO:4)
2Lm5 2H3m3	**2Lm5**	**2H3m3**	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC**RASQSVSSYMH** WYQQKPGQAPRLLIY**APSNLAS**GIPARFSGSGS GTDFTLTISSLEPEDFAVYYC**QQWSFNPPT**FG QGTKVEIK*DGGGSGGGGSGGGGTG*EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS**SYNMH**WVR QAPGKGLEWVS**AIYPGNGDTSYNQKFKG**RFT ISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA K**SYYSNSYWYFDL**WGRGTLVTVSS (SEQ ID NO:5)

Construct Name

VK3	**VH1**	
2L	**2Hm**	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSVSSYMHW YQQKPGQAPRLLIYAPSNLASGIPARFSGSGSGTD FTLTISSLEPEDFAVYYCQQWSFNPPTFGQGTKV EIK*DGGGSGGGGSGGGGSS*QVQLVQSGAEVKKP GASVKVSCKASGYTFTSYNMHWVRQAPGQGLE WMGAIYPGNGDTSYNQKFKGRVTMTRDTSTST VYMELSSLRSEDTAVYYCARSVYYSN.YWYFDL WGRGTLVTVSS (SEQ ID NO:6)
2Lm	**2Hm**	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSVSYMIW YQQKPGQAPRLLIYAISNLASGIPARFSGSGSGT DFTLTISSLEPEDFAVYYCQQWISNPPTFGQGTK VEIK*DGGGSGGGGSGGGGSS*QVQLVQSGAEVK KPGASVKVSCKASGYTFTSYNMHWVRQAPGQ GLEWMGAIYPGNGDTSYNQKFKGRVTMTRDT STSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAR SVYYSN.YWYFDLWGRGTLVTVSS (SEQ ID NO:7)

2Lm	2H	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSVSYMIW YQQKPGQAPRLLIYAISNLASGIPARFSGSGSGT DFTLTISSLEPEDFAVYYCQQWISNPPTFGQGTK VEIK*DGGGSGGGGSGGGGSS*QVQLVQSGAEVK KPGASVKVSCKASGYTFTSYNMHWVRQAPGQ GLEWMGAIYPGNGDTSYNQKFKGRVTMTRDT STSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAR VVYYSNSYWYFDLWGRGTLVTVSS

(SEQ ID NO:8)

2Lm1	2Hm	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSSVSYMH WYQQKPGQAPRLLIYAPSNLASGIPARFSGSGS GTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQWISNPPTFGQG TKVEIK*DGGGSGGGGSGGGGSS*QVQLVQSGAE VKKPGASVKVSCKASGYTFTSYNMHWVRQAP GQGLEWMGAIYPGNGDTSYNQKFKGRVTMTRD TSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAR SVYYSN.YWYFDLWGRGTLVTVSS

(SEQ ID NO:9)

2Lm1	2H	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSSVSYMH WYQQKPGQAPRLLIYAPSNLASGIPARFSGSGSG TDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQWISNPPTFGQGTK VEIK*DGGGSGGGGSGGGGSS*QVQLVQSGAEVKKP GASVKVSCKASGYTFTSYNMHWVRQAPGQGLEW MGAIYPGNGDTSYNQKFKGRVTMTRDTSTSTVY MELSSLRSEDTAVYYCARVVYYSNSYWYFDLW GRGTLVTVSS

(SEQ ID NO:10)

2Lm2	2Hm	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSYMIW YQQKPGQAPRLLIYAISNLASGIPARFSGSGSGT DFTLTISSLEPEDFAVYYCQQWSFNPPTFGQGTK VEIK*DGGGSGGGGSGGGGSS*QVQLVQSGAEVK KPGASVKVSCKASGYTFTSYNMHWVRQA PGQGLEWMGAIYPGNGDTSYNQKFKGRV TMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCA RSVYYSN.YWYFDLWGRGTLVTVSS

(SEQ ID NO:11)

2Lm3	2Hm	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSVSYMI WYQQKPGQAPRLLIYAISNLASGIPARFSGSG SGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQWTSNPPTF GQGTKVEIK*DGGGSGGGGSGGGGSS*QVQLV QSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYNMH WVRQAPGQGLEWMGAIYPGNGDTSYNQKFKG

RVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCA
RSVYYSN.YWYFDLWGRGTLVTVSS

(SEQ ID NO:12)

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYMH
WYQQKPGQAPRLLIYAPSNLASGIPARFSGSGS
GTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQWTSNPPTFGQ
GTKVEIK*DGGGSGGGGSGGGGSS*QVQLVQSGA
EVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYNMHWVRQA
2Lm4 **2Hm** PGQGLEWMGAIYPGNGDTSYNQKFKGRVTMT
RDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAR
SVYYSN.YWYFDLWGRGTLVTVSS

(SEQ ID NO:13)

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSYMH
WYQQKPGQAPRLLIYAPSNLASGIPARFSGSG
SGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQWSFNPPTFG
QGTKVEIK*DGGGSGGGGSGGGGSS*QVQLVQS
GAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYNMHWV
2Lm5 **2Hm** RQAPGQGLEWMGAIYPGNGDTSYNQKFKGRV
TMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCA
RSVYYSN.YWYFDLWGRGTLVTVSS

(SEQ ID NO:14)

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSYMH
WYQQKPGQAPRLLIYAPSNLASGIPARFSGSGS
GTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQWSFNPPTFGQ
GTKVEIK*DGGGSGGGGSGGGGSS*QVQLVQSGA
EVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYNMHWVRQA
2Lm5-1 **2Hm3** PGQGLEWMGAIYPGNGDTSYNQKFKGRVTMT
RDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAR
S.YYSNSYWYFDLWGRGTLVTVSS

(SEQ ID NO:15)

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSYMH
WYQQKPGQAPRLLIYAPSNLASGIPARFSGSGS
GTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQWSFNPPTFGQ
GTKVEIK*DGGGSGGGGSGGGGSS*QVQLVQSGA
EVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYNMHWVRQA
2Lm5-2 **2Hm4** PGQGLEWMGAIYPGNGDTSYNQKFKGRVTMT
RDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAR
V.YYSNSYWYFDLWGRGTLVTVSS

(SEQ ID NO:16)

2Lm5-3	**2Hm5**	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSYMH WYQQKPGQAPRLLIYAPSNLASGIPARFSGSGS GTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQWSFNPPTFGQ GTKVEIK*DGGGSGGGGSGGGGSS*QVQLVQSGA EVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYNMHWVRQA PGQGLEWMGAIYPGNGDTSYNQKFKGRVTMT RDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAR SVYY.NSYWYFDLWGRGTLVTVSS

(SEQ ID NO:17)

2Lm6	**2Hm**	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSYMH WYQQKPGQAPRLLIYAPSNLASGIPARFSGSG SGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQWTSNPPTF GQGTKVEIK*DGGGSGGGGSGGGGSS*QVQLV QSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYNMH WVRQAPGQGLEWMGAIYPGNGDTSYNQKFKG RVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAR SVYYSN.YWYFDLWGRGTLVTVSS

(SEQ ID NO:18)

2Lm6-1	**2Hm3**	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSYMH WYQQKPGQAPRLLIYAPSNLASGIPARFSGSGS GTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQWTSNPPTFGQ GTKVEIK*DGGGSGGGGSGGGGSS*QVQLVQSGA EVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYNMHWVRQA PGQGLEWMGAIYPGNGDTSYNQKFKGRVTMT RDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAR S.YYSNSYWYFDLWGRGTLVTVSS

(SEQ ID NO:19)

2Lm6-2	**2Hm4**	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSYMH WYQQKPGQAPRLLIYAPSNLASGIPARFSGSGS GTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQWTSNPPTFGQ GTKVEIK*DGGGSGGGGSGGGGSS*QVQLVQSGA EVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYNMHWVRQA PGQGLEWMGAIYPGNGDTSYNQKFKGRVTMT RDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAR V.YYSNSYWYFDLWGRGTLVTVSS

(SEQ ID NO:20)

2Lm6-3	**2Hm5**	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSYMH WYQQKPGQAPRLLIYAPSNLASGIPARFSGSG SGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQWTSNPPTFG QGTKVEIK*DGGGSGGGGSGGGGSS*QVQLVQS GAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYNMHWV RQAPGQGLEWMGAIYPGNGDTSYNQKFKGR

VTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAR
SVYY.NSYWYFDLWGRGTLVTVSS

(SEQ ID NO:21)

		EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSVSYMH
		WYQQKPGQAPRLLIYATSNLASGIPARFSGSG
		SGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQWTSNPPTFG
		QGTKVEIK*DGGGSGGGGSGGGGSS*QVQLVQS
		GAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYNMHWV
2Lm7	**2Hm**	RQAPGQGLEWMGAIYPGNGDTSYNQKFKGR
		VTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAR
		SVYYSN.YWYFDLWGRGTLVTVSS

(SEQ ID NO:22)

		EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSVSYMI
		WYQQKPGQAPRLLIYAISNLASGIPARFSGSG
		SGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQWISNPYTF
		GQGTKVEIK*DGGGSGGGGSGGGGSS*QVQLV
		QSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYNMH
2Lm8	**2Hm**	WVRQAPGQGLEWMGAIYPGNGDTSYNQKFKG
		RVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCA
		RSVYYSN.YWYFDLWGRGTLVTVSS

(SEQ ID NO:23)

		EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSVSYMI
		WYQQKPGQAPRLLIYAISNLASGIPARFSGSG
		SGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQWISNPFTFG
		QGTKVEIK*DGGGSGGGGSGGGGSS*QVQLVQS
		GAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYNMHWV
2Lm9	**2Hm**	RQAPGQGLEWMGAIYPGNGDTSYNQKFKGR
		VTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAR
		SVYYSN.YWYFDLWGRGTLVTVSS

(SEQ ID NO:24)

		EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSVSYMI
		WYQQKPGQAPRLLIYAISNLASGIPARFSGSG
		SGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQWISNPLTFG
		QGTKVEIK*DGGGSGGGGSGGGGSS*QVQLVQS
		GAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYNMHWV
2Lm10	**2Hm**	RQAPGQGLEWMGAIYPGNGDTSYNQKFKGR
		VTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCA
		RSVYYSN.YWYFDLWGRGTLVTVSS

(SEQ ID NO:25)

2Lm11	**2Hm**	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSVSYMI WYQQKPGQAPRLLIYAISNLASGIPARFSGSG SGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQWISNPITFG QGTKVEIK*DGGGSGGGGSGGGGSS*QVQLVQS GAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYNMHWV RQAPGQGLEWMGAIYPGNGDTSYNQKFKGR VTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAR SVYYSN.YWYFDLWGRGTLVTVSS

(SEQ ID NO:26)

2Lm12	**2Hm**	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSYMH WYQQKPGQAPRLLIYATSNLASGIPARFSGSG SGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQWSFNPPTFG QGTKVEIK*DGGGSGGGGSGGGGSS*QVQLVQS GAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYNMHWV RQAPGQGLEWMGAIYPGNGDTSYNQKFKGR VTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAR SVYYSN.YWYFDLWGRGTLVTVSS

(SEQ ID NO:27)

2Lm13	**2Hm**	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSYMH WYQQKPGQAPRLLIYAPSNLASGIPARFSGSGS GTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQWISNPPTFGQG TKVEIK*DGGGSGGGGSGGGGSS*QVQLVQSGAE VKKPGASVKVSCKASGYTFTSYNMHWVRQAP GQGLEWMGAIYPGNGDTSYNQKFKGRVTMTR DTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAR SVYYSN.YWYFDLWGRGTLVTVSS

(SEQ ID NO:28)

2Lm14	**2Hm**	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSYMH WYQQKPGQAPRLLIYATSNLASGIPARFSGSGS GTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQWISNPPTFGQ GTKVEIK*DGGGSGGGGSGGGGSS*QVQLVQSGA EVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYNMHWVRQA PGQGLEWMGAIYPGNGDTSYNQKFKGRVTMT RDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAR SVYYSN.YWYFDLWGRGTLVTVSS

(SEQ ID NO:29)

2Lm15	**2Hm**	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSYIHW YQQKPGQAPRLLIYAPSNLASGIPARFSGSGSG TDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQWISNPPTFGQG TKVEIK*DGGGSGGGGSGGGGSS*QVQLVQSGA EVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYNMHWVRQ APGQGLEWMGAIYPGNGDTSYNQKFKGRVT

MTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAR
SVYYSN.YWYFDLWGRGTLVTVSS

(SEQ ID NO:30)

		EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSVSYMH WYQQKPGQAPRLLIYAPSNLASGIPARFSGSG SGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQWSFNPPTFG QGTKVEIK*DGGGSGGGGSGGGGSS*QVQLVQS GAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYNMHWV
2Lm16	**2Hm3**	RQAPGQGLEWMGAIYPGNGDTSYNQKFKGR VTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAR S.YYSNSYWYFDLWGRGTLVTVSS

(SEQ ID NO:31)

		EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSYLS WYQQKPGQAPRLLIYAPSNLASGIPARFSGSG SGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQWSFNPPTFG QGTKVEIK*DGGGSGGGGSGGGGSS*QVQLVQS GAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYNMHWV
2Lm17-3	**2Hm3**	RQAPGQGLEWMGAIYPGNGDTSYNQKFKGR VTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCA S,YYSNSYWYFDLWGRGTLVTVSS

(SEQ ID NO:32)

		EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSYLT WYQQKPGQAPRLLIYAPSNLASGIPARFSGSG SGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQWSFNPPTFG QGTKVEIK*DGGGSGGGGSGGGGSS*QVQLVQS GAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYNMHWV
2Lm17-4	**2Hm3**	RQAPGQGLEWMGAIYPGNGDTSYNQKFKGR VTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAR S.YYSNSYWYFDLWGRGTLVTVSS

(SEQ ID NO:33)

		EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSYLY WYQQKPGQAPRLLIYAPSNLASGIPARFSGSGS GTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQWSFNPPTFGQ GTKVEIK*DGGGSGGGGSGGGGSS*QVQLVQSGA EVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYNMHWVRQA
2Lm17-6	**2Hm3**	PGQGLEWMGAIYPGNGDTSYNQKFKGRVTMT RDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAR S.YYSNSYWYFDLWGRGTLVTVSS

(SEQ ID NO:34)

2Lm17-8	**2Hm3**	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSYLH WYQQKPGQAPRLLIYAPSNLASGIPARFSGSG SGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQWSFNPPTFG QGTKVEIK*DGGGSGGGGSGGGGSS*QVQLVQS GAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYNMHWV RQAPGQGLEWMGAIYPGNGDTSYNQKFKGR VTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAR S.YYSNSYWYFDLWGRGTLVTVSS (SEQ ID NO:35)
2Lm17-12	**2Hm3**	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSYLN WYQQKPGQAPRLLIYAPSNLASGIPARFSGSG SGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQWSFNPPTF GQGTKVEIK*DGGGSGGGGSGGGGSS*QVQLV QSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYNMH WVRQAPGQGLEWMGAIYPGNGDTSYNQKFK GRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCA RS.YYSNSYWYFDLWGRGTLVTVSS (SEQ ID NO:36)
2Lm17-14	**2Hm3**	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSYLA WYQQKPGQAPRLLIYAPSNLASGIPARFSGSG SGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQWSFNPPTFG QGTKVEIK*DGGGSGGGGSGGGGSS*QVQLVQS GAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYNMHWVR QAPGQGLEWMGAIYPGNGDTSYNQKFKGRVT MTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAR S.YYSNSYWYFDLWGRGTLVTVSS (SEQ ID NO:37)
2Lm18-2	**2Hm3**	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSVSYLA WYQQKPGQAPRLLIYAPSNLASGIPARFSGSG SGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQWSFNPPTFG QGTKVEIK*DGGGSGGGGSGGGGSS*QVQLVQS GAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYNMHWV RQAPGQGLEWMGAIYPGNGDTSYNQKFKGR VTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAR S.YYSNSYWYFDLWGRGTLVTVSS (SEQ ID NO:38)
2Lm18-3	**2Hm3**	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSVSYLN WYQQKPGQAPRLLIYAPSNLASGIPARFSGS GSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQWSFNPPT FGQGTKVEIK*DGGGSGGGGSGGGGSS*QVQLV QSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYNMH WVRQAPGQGLEWMGAIYPGNGDTSYNQKFKG

RVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAR
S.YYSNSYWYFDLWGRGTLVTVSS

(SEQ ID NO:39)

2Lm18-4	2Hm3	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSVSYLD WYQQKPGQAPRLLIYAPSNLASGIPARFSGSG SGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQWSFNPPTFG QGTKVEIK*DGGGSGGGGSGGGGSS*QVQLVQS GAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYNMHWV RQAPGQGLEWMGAIYPGNGDTSYNQKFKGR VTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAR S.YYSNSYWYFDLWGRGTLVTVSS

(SEQ ID NO:40)

2Lm18-5	2Hm3	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSVSYLSW YQQKPGQAPRLLIYAPSNLASGIPARFSGSGSG TDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQWSFNPPTFGQG TKVEIK*DGGGSGGGGSGGGGSS*QVQLVQSGAE VKKPGASVKVSCKASGYTFTSYNMHWVRQAP GQGLEWMGAIYPGNGDTSYNQKFKGRVTMTR DTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAR S.YYSNSYWYFDLWGRGTLVTVSS

(SEQ ID NO:41)

2Lm18-14	2Hm3	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSVSYLHW YQQKPGQAPRLLIYAPSNLASGIPARFSGSGSGT DFTLTISSLEPEDFAVYYCQQWSFNPPTFGQGTK VEIK*DGGGSGGGGSGGGGSS*QVQLVQSGAEVKK PGASVKVSCKASGYTFTSYNMHWVRQAPGQGL EWMGAIYPGNGDTSYNQKFKGRVTMTRDTSTST VYMELSSLRSEDTAVYYCAR S.YYSNSYWYFDLWGRGTLVTVSS

(SEQ ID NO:42)

2Lm19-1	2Hm3	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSYIDW YQQKPGQAPRLLIYAPSNLASGIPARFSGSGSGT DFTLTISSLEPEDFAVYYCQQWSFNPPTFGQGTK VEIK*DGGGSGGGGSGGGGSS*QVQLVQSGAEVK KPGASVKVSCKASGYTFTSYNMHWVRQAPGQG LEWMGAIYPGNGDTSYNQKFKGRVTMTRDTST STVYMELSSLRSEDTAVYYCAR S.YYSNSYWYFDLWGRGTLVTVSS

(SEQ ID NO:43)

2Lm19-2	**2Hm3**	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSYISW YQQKPGQAPRLLIYAPSNLASGIPARFSGSGSG TDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQWSFNPPTFGQG TKVEIK*DGGGSGGGGSGGGGSS*QVQLVQSGAE VKKPGASVKVSCKASGYTFTSYNMHWVRQAP GQGLEWMGAIYPGNGDTSYNQKFKGRVTMTR DTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAR S.YYSNSYWYFDLWGRGTLVTVSS

(SEQ ID NO:44)

2Lm19-3	**2Hm3**	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSYIVW YQQKPGQAPRLLIYAPSNLASGIPARFSGSGSGT DFTLTISSLEPEDFAVYYCQQWSFNPPTFGQGT KVEIK*DGGGSGGGGSGGGGSS*QVQLVQSGAEV KKPGASVKVSCKASGYTFTSYNMHWVRQAPG QGLEWMGAIYPGNGDTSYNQKFKGRVTMTRD TSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAR S.YYSNSYWYFDLWGRGTLVTVSS

(SEQ ID NO:45)

2Lm19-4	**2Hm3**	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSYIAW YQQKPGQAPRLLIYAPSNLASGIPARFSGSGSG TDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQWSFNPPTFGQG TKVEIK*DGGGSGGGGSGGGGSS*QVQLVQSGAE VKKPGASVKVSCKASGYTFTSYNMHWVRQAP GQGLEWMGAIYPGNGDTSYNQKFKGRVTMTR DTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAR S.YYSNSYWYFDLWGRGTLVTVSS

(SEQ ID NO:46)

2Lm19-7	**2Hm3**	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSYITW YQQKPGQAPRLLIYAPSNLASGIPARFSGSGSG TDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQWSFNPPTFGQG TKVEIK*DGGGSGGGGSGGGGSS*QVQLVQSGAE VKKPGASVKVSCKASGYTFTSYNMHWVRQAP GQGLEWMGAIYPGNGDTSYNQKFKGRVTMTR DTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAR S.YYSNSYWYFDLWGRGTLVTVSS

(SEQ ID NO:47)

2Lm19-9	**2Hm3**	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSYIIW YQQKPGQAPRLLIYAPSNLASGIPARFSGSGSG TDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQWSFNPPTFGQG TKVEIK*DGGGSGGGGSGGGGSS*QVQLVQSGAE VKKPGASVKVSCKASGYTFTSYNMHWVRQAP GQGLEWMGAIYPGNGDTSYNQKFKGRVTMTR

		DTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAR S.YYSNSYWYFDLWGRGTLVTVSS (SEQ ID NO:48)
2Lm19-12	2Hm3	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSYIPW YQQKPGQAPRLLIYAPSNLASGIPARFSGSGSG TDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQWSFNPPTFGQG TKVEIK*DGGGSGGGGSGGGGSS*QVQLVQSGAE VKKPGASVKVSCKASGYTFTSYNMHWVRQAP GQGLEWMGAIYPGNGDTSYNQKFKGRVTMTR DTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAR S.YYSNSYWYFDLWGRGTLVTVSS (SEQ ID NO:49)
2Lm19-14	2Hm3	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSYINW YQQKPGQAPRLLIYAPSNLASGIPARFSGSGSG TDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQWSFNPPTFGQG TKVEIK*DGGGSGGGGSGGGGSS*QVQLVQSGAE VKKPGASVKVSCKASGYTFTSYNMHWVRQAP GQGLEWMGAIYPGNGDTSYNQKFKGRVTMTR DTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAR S.YYSNSYWYFDLWGRGTLVTVSS (SEQ ID NO:50)
2Lm20-1	2Hm3	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSVSYISW YQQKPGQAPRLLIYAPSNLASGIPARFSGSGSG TDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQWSFNPPTFGQG TKVEIK*DGGGSGGGGSGGGGSS*QVQLVQSGAE VKKPGASVKVSCKASGYTFTSYNMHWVRQAP GQGLEWMGAIYPGNGDTSYNQKFKGRVTMTR DTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAR S.YYSNSYWYFDLWGRGTLVTVSS (SEQ ID NO:51)
2Lm20-2	2Hm3	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSVSYIAW YQQKPGQAPRLLIYAPSNLASGIPARFSGSGSG TDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQWSFNPPTFGQG TKVEIK*DGGGSGGGGSGGGGSS*QVQLVQSGAE VKKPGASVKVSCKASGYTFTSYNMHWVRQAP GQGLEWMGAIYPGNGDTSYNQKFKGRVTMTR DTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAR S.YYSNSYWYFDLWGRGTLVTVSS (SEQ ID NO:52)

2Lm20-4	**2Hm3**	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSVSY**I**VW YQQKPGQAPRLLIYAPSNLASGIPARFSGSGSG TDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQWSFNPPTFGQG TKVEIK*DGGGSGGGGSGGGGSS*QVQLVQSGAE VKKPGASVKVSCKASGYTFTSYNMHWVRQAP GQGLEWMGAIYPGNGDTSYNQKFKGRVTMTR DTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAR **S.**YYSNSYWYFDL**L**WGRGTLVTVSS
		(SEQ ID NO:53)
2Lm20-8	**2Hm3**	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSVN**Y**I**Y**W YQQKPGQAPRLLIYAPSNLASGIPARFSGSGSG TDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQWSFNPPTFGQG TKVEIK*DGGGSGGGGSGGGGSS*QVQLVQSGAE VKKPGASVKVSCKASGYTFTSYNMHWVRQAP GQGLEWMGAIYPGNGDTSYNQKFKGRVTMTR DTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAR **S.**YYSNSYWYFDL**L**WGRGTLVTVSS
		(SEQ ID NO:54)
2Lm20-11	**2Hm3**	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSVSY**ID**W YQQKPGQAPRLLIYAPSNLASGIPARFSGSGSG TDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQWSFNPPTFGQG TKVEIK*DGGGSGGGGSGGGGSS*QVQLVQSGAE VKKPGASVKVSCKASGYTFTSYNMHWVRQAP GQGLEWMGAIYPGNGDTSYNQKFKGRVTMTR DTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAR **S.**YYSNSYWYFDL**L**WGRGTLVTVSS
		(SEQ ID NO:55)
2Lm20-12	**2Hm3**	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSVSY**II**W YQQKPGQAPRLLIYAPSNLASGIPARFSGSGSG TDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQWSFNPPTFGQG TKVEIK*DGGGSGGGGSGGGGSS*QVQLVQSGAE VKKPGASVKVSCKASGYTFTSYNMHWVRQAP GQGLEWMGAIYPGNGDTSYNQKFKGRVTMTR DTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAR **S.**YYSNSYWYFDL**L**WGRGTLVTVSS
		(SEQ ID NO:56)
2Lm20-13	**2Hm3**	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSVSY**I**YW YQQKPGQAPRLLIYAPSNLASGIPARFSGSGSG TDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQWSFNPPTFGQG TKVEIK*DGGGSGGGGSGGGGSS*QVQLVQSGAE VKKPGASVKVSCKASGYTFTSYNMHWVRQAP GQGLEWMGAIYPGNGDTSYNQKFKGRVTMTR

DTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAR
S.YYSNSYWYFDLWGRGTLVTVSS

(SEQ ID NO:57)

2Lm5 (18009)	**2H5m3**	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC**RASQSVSYMH** WYQQKPGQAPRLLIY**APSNLAS**GIPARFSGS GSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYC**QQWSFNPPT** FGQGTKVEIKDGGGSGGGGSGGGGTGEVQLV QSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFT**SYNMH**W VRQMPGKGLEWMG**AIYPGNGDTSYNQKFKG** QVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCA R**VVYYSNSYWYFDL**WGRGTLVTVSS

(SEQ ID NO:58)

2Lm5 (2Lm5 2H3m3)	2H3m3	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC**RASQSVSYMH** WYQQKPGQAPRLLIY**APSNLAS**GIPARFSGSGS GTDFTLTISSLEPEDFAVYYC**QQWSFNPPT**FG QGTKVEIKDGGGSGGGGSGGGGTGEVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS**SYNMH**WVR QAPGKGLEWVS**AIYPGNGDTSYNQKFKG**RFT ISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA K**SYYSNSYWYFDL**WGRGTLVTVSS (SEQ ID NO:59)
IgG1	Hinge CSSS	DQ**EPKSCDKTHTSPPSS** (SEQ ID NO:60)
IgG1	CH2CH3 WT	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQV SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:61)
IgG1	CH2CH3 P331S	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPA**S**IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQV SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY**S** KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:62)
IgG1	Hinge WT	DQ**EPKSCDKTHTCPPCP** (SEQ ID NO:63)
IgG1	Hinge CSCS	DQ**EPKSCDKTHTSPPCS** (SEQ ID NO:64)
IgG1	Hinge SCCS	DQ**EPKSSDKTHTCPPCS** (SEQ ID NO:65)

NUCLEOTIDE SEQUENCES

2Lm1

gaaattgtgttgacacagtctccagccaccctgtctttgtctccaggggaaagagccaccctctcctgca
gggccagtcagagtgttagcagctacatgcactggtaccaacagaaacctggccaggctcctaggctc
ct
catctatgccccatccaacctggcttctggaattccagccaggttcagtggcagtggatccgggacaga
c
ttcactctcaccatcagcagcctagagcctgaagattttgcagtttattactgtcagcagtggatttcta
accctcccacgttcggccaagggaccaaggtggaaatcaaa

(SEQ ID NO:67)

2Lm2

gaaattgtgttgacacagtctccagccaccctgtctttgtctccaggggaaagagccaccctctcctgca
gggccagtcagagtgttagctacatgatctggtaccaacagaaacctggccaggctcctaggctcctca
t
ctatgccatatccaacctggcttctggaattccagccaggttcagtggcagtggatccgggacagacttc
actctcaccatcagcagcctagagcctgaagattttgcagtttattactgtcagcagtggagttttaacc
ctcccacgttcggccaagggaccaaggtggaaatcaaa

(SEQ ID NO:68)

2Lm3

gaaattgtgttgacacagtccccagccaccccgtctttgtctccaggtgaaagagccaccctctcctgca
gggccagttcaagtgttagctacatgatttggtaccaacagaaacctggccaggcacctaggctcctca
t
ctatgcaatctccaacctggcttctggaattccagccaggttcagtggcagtggatccgggacagacttc
actctcaccatcagcagtctagagcctgaagattttgcagtttattactgtcagcagtggactagtaacc
ctcccacgttcggccaagggaccaaggtggaaatcaaa

(SEQ ID NO:69)

2Lm4

gaaattgtgttgacacagtccccagccaccccgtctttgtctccaggtgaaagagccaccctctcctgca
gggccagttcaagtgttagctcctacatgatttggtaccaacagaaacctggccaggcacctaggctcc
t
catctatgcaatctccaacctggcttctggaattccagccaggttcagtggcagtggatccgggacaga
c
ttcactctcaccatcagcagtctagagcctgaagattttgcagtttattactgtcagcagtggactagta
accctcccacgttcggccaagggaccaaggtggaaatcaaa

(SEQ ID NO:70)

2Lm5

gaaattgtgttgacacagtctccagccaccctgtctttgtctccaggggaaagagccaccctctcctgca
gggccagtcagagtgttagctacatgcactggtaccaacagaaacctggccaggctcctaggctcctc
at
ctatgccccatccaacctggcttctggaattccagccaggttcagtggcagtggatccgggacagactt
c
actctcaccatcagcagcctagagcctgaagattttgcagtttattactgtcagcagtggagttttaacc
ctcccacgttcggccaagggaccaaggtggaaatcaaa

(SEQ ID NO:71)

2Lm5-1

gaaattgtgttgacacagtctccagccaccctgtctttgtctccaggtgaaagagccaccctctcctgca
gggccagtcagagtgttagctacatgcactggtaccaacagaaacctggccaggcacctaggctcctc
atctatgccccatccaacctggcttctggaattccagccaggttcagtggcagtggatccgggacagac
ttcactctcaccatcagcagtctagagcctgaagattttgcagtttattactgtcagcagtggagttttaacc
ctcccacgttcggccaagggaccaaggtggaaatcaaa

(SEQ ID NO:72)

2Lm5-2

gaaattgtgttgacacagtctccagccaccctgtctttgtctccaggtgaaagagccaccctctcctgca
gggccagtcagagtgttagctacatgcactggtaccaacagaaacctggccaggcacctaggctcctc
atctatgccccatccaacctggcttctggaattccagccaggttcagtggcagtggatccgggacagac
ttcactctcaccatcagcagtctagagcctgaagattttgcagtttattactgtcagcagtggagttttaacc
ctcccacgttcggccaagggaccaaggtggaaatcaaa

(SEQ ID NO:73)

2Lm5-3

gaaattgtgttgacacagtctccagccaccctgtctttgtctccaggtgaaagagccaccctctcctgca
gggccagtcagagtgttagctacatgcactggtaccaacagaaacctggccaggcacctaggctcctc
atctatgccccatccaacctggcttctggaattccagccaggttcagtggcagtggatccgggacagac
ttcactctcaccatcagcagtctagagcctgaagattttgcagtttattactgtcagcagtggagttttaacc
ctcccacgttcggccaagggaccaaggtggaaatcaaa

(SEQ ID NO: 74)

2Lm6

gaaattgtgttgacacagtctccagccaccctgtctttgtctccaggtgaaagagccaccctctcctgca
gggccagtcagagtgttagctacatgcactggtaccaacagaaacctggccaggcacctaggctcctc
at
ctatgccccatccaacctggcttctggaattccagccaggttcagtggcagtggatccgggacagactt
c
actctcaccatcagcagtctagagcctgaagattttgcagtttattactgtcagcagtggacttctaacc
ctcccacgttcggccaagggaccaaggtggaaatcaaa

(SEQ ID NO:75)

2Lm6-1

gaaattgtgttgacacagtctccagccaccctgtctttgtctccaggtgaaagagccaccctctcctgca
gggccagtcagagtgttagctacatgcactggtaccaacagaaacctggccaggcacctaggctcctc
atctatgccccatccaacctggcttctggaattccagccaggttcagtggcagtggatccgggacagac
ttcactctcaccatcagcagtctagagcctgaagattttgcagtttattactgtcagcagtggactagtaac
cctcccacgttcggccaagggaccaaggtggaaatcaaa

(SEQ ID NO:76)

2Lm6-2

gaaattgtgttgacacagtctccagccaccctgtctttgtctccaggtgaaagagccaccctctcctgca
gggccagtcagagtgttagctacatgcactggtaccaacagaaacctggccaggcacctaggctcctc
atctatgccccatccaacctggcttctggaattccagccaggttcagtggcagtggatccgggacagac
ttcactctcaccatcagcagtctagagcctgaagattttgcagtttattactgtcagcagtggacttctaacc
ctcccacgttcggccaagggaccaaggtggaaatcaaa

(SEQ ID NO:77)

2Lm6-3	Gaaattgtgttgacacagtctccagccaccctgtctttgtctccaggtgaaagagccaccctctcctgca gggccagtcagagtgttagctacatgcactggtaccaacagaaacctggccaggcacctaggctcctc atctatgccccatccaacctggcttctggaattccagccaggttcagtggcagtggatccgggacagac ttcactctcaccatcagcagtctagagcctgaagattttgcagtttattactgtcagcagtggactagtaac cctcccacgttcggccaagggaccaaggtggaaatcaaa (SEQ ID NO: 78)
2Lm7	gaaattgtgttgacacagtctccagccaccctgtctttgtctccaggtgaaagagccaccctctcctgca gggccagttcaagtgttagctacatgcactggtaccaacagaaacctggccaggcacctaggctcctc at ctatgccacatccaacctggcttctggaattccagccaggttcagtggcagtggatccgggacagactt c actctcaccatcagcagtctagagcctgaagattttgcagtttattactgtcagcagtggactagtaacc ctcccacgttcggccaagggaccaaggtggaaatcaaa (SEQ ID NO:79)
2Lm8	gaaattgtgttgacacagtctccagccaccctgtctttgtctccaggtgaaagagccaccctctcctgca gggccagttcaagtgttagctacatgatttggtaccaacagaaacctggccaggcacctaggctcctca t ctatgcaatctccaacctggcttctggaattccagccaggttcagtggcagtggatccgggacagacttc actctcaccatcagcagtctagagcctgaagattttgcagtttattactgtcagcagtggatttctaacc cttacactttcggccaagggaccaaggtggaaatcaaa (SEQ ID NO:80)
2Lm9	gaaattgtgttgacacagtctccagccaccctgtctttgtctccaggtgaaagagccaccctctcctgca gggccagttcaagtgttagctacatgatttggtaccaacagaaacctggccaggcacctaggctcctca t ctatgcaatctccaacctggcttctggaattccagccaggttcagtggcagtggatccgggacagacttc actctcaccatcagcagtctagagcctgaagattttgcagtttattactgtcagcagtggatttctaacc ctttcactttcggccaagggaccaaggtggaaatcaaa (SEQ ID NO:81)
2Lm10	gaaattgtgttgacacagtctccagccaccctgtctttgtctccaggtgaaagagccaccctctcctgca gggccagttcaagtgttagctacatgatttggtaccaacagaaacctggccaggcacctaggctcctca t ctatgcaatctccaacctggcttctggaattccagccaggttcagtggcagtggatccgggacagacttc actctcaccatcagcagtctagagcctgaagattttgcagtttattactgtcagcagtggatttctaacc ctctcactttcggccaagggaccaaggtggaaatcaaa (SEQ ID NO:82)

2Lm11

gaaattgtgttgacacagtctccagccaccctgtctttgtctccaggtgaaagagccaccctctcctgca
gggccagttcaagtgttagctacatgatttggtaccaacagaaacctggccaggcacctaggctcctca
tctatgcaatctccaacctggcttctggaattccagccaggttcagtggcagtggatccgggacagactt
cactctcaccatcagcagtctagagcctgaagattttgcagtttattactgtcagcagtggatttctaaccct
atcactttcggccaagggaccaaggtggaaatcaaa

(SEQ ID NO:83)

2Lm12

gaaattgtgttgacacagtctccagccaccctgtctttgtctccaggtgaaagagccaccctctcctgca
gggccagtcagagtgttagctacatgcactggtaccaacagaaacctggccaggcacctaggctcctc
at
ctatgccacatccaacctggcttctggaattccagccaggttcagtggcagtggatccgggacagactt
c
actctcaccatcagcagtctagagcctgaagattttgcagtttattactgtcagcagtggagttttaacc
ctcccacgttcggccaagggaccaaggtggaaatcaaa

(SEQ ID NO:84)

2Lm13

gaaattgtgttgacacagtctccagccaccctgtctttgtctccaggtgaaagagccaccctctcctgca
gggccagtcagagtgttagctacatgcactggtaccaacagaaacctggccaggcacctaggctcctc
at
ctatgccccatccaacctggcttctggaattccagccaggttcagtggcagtggatccgggacagactt
c
actctcaccatcagcagtctagagcctgaagattttgcagtttattactgtcagcagtggatcagtaacc
cacccacgttcggccaagggaccaaggtggaaatcaaa

(SEQ ID NO:85)

2Lm14

gaaattgtgttgacacagtctccagccaccctgtctttgtctccaggtgaaagagccaccctctcctgca
gggccagtcagagtgttagctacatgcactggtaccaacagaaacctggccaggcacctaggctcctc
at
ctatgccacatccaacctggcttctggaattccagccaggttcagtggcagtggatccgggacagactt
c
actctcaccatcagcagtctagagcctgaagattttgcagtttattactgtcagcagtggatcagtaacc
cacccacgttcggccaagggaccaaggtggaaatcaaa

(SEQ ID NO:86)

2Lm15

gaaattgtgttgacacagtctccagccaccctgtctttgtctccaggtgaaagagccaccctctcctgca
gggccagtcagagtgttagctacatacactggtaccaacagaaacctggccaggcacctaggctcctc
at
ctatgccccatccaacctggcttctggaattccagccaggttcagtggcagtggatccgggacagactt
c
actctcaccatcagcagtctagagcctgaagattttgcagtttattactgtcagcagtggatcagtaacc
cacccacgttcggccaagggaccaaggtggaaatcaaa

(SEQ ID NO:87)

2Lm16

gaaattgtgttgacacagtctccagccaccctgtctttgtctccaggtgaaagagccaccctctcctgca
gggccagttccagtgttagctacatgcactggtaccaacagaaacctggccaggcacctaggctcctc
at
ctatgccccatccaacctggcttctggaattccagccaggttcagtggcagtggatccgggacagactt
c
actctcaccatcagcagtctagagcctgaagattttgcagtttattactgtcagcagtggagttttaacc
ctcccacgttcggccaagggaccaaggtggaaatcaaa

(SEQ ID NO:88)

2Lm17-3

gaaattgtgttgacacagtctccagccaccctgtctttgtctccaggtgaaagagccaccctctcctgca
gggccagtcagagtgttagctacctgtcttggtaccaacagaaacctggccaggcacctaggctcctca
t
ctatgccccatccaacctggcttctggaattccagccaggttcagtggcagtggatccgggacagactt
c
actctcaccatcagcagtctagagcctgaagattttgcagtttattactgtcagcagtggagttttaacc
ctcccacgttcggccaagggaccaaggtggaaatcaaa

(SEQ ID NO:89)

2Lm17-4

gaaattgtgttgacacagtctccagccaccctgtctttgtctccaggtgaaagagccaccctctcctgca
gggccagtcagagtgttagctacctgacttggtaccaacagaaacctggccaggcacctaggctcctc
at
ctatgccccatccaacctggcttctggaattccagccaggttcagtggcagtggatccgggacagactt
c
actctcaccatcagcagtctagagcctgaagattttgcagtttattactgtcagcagtggagttttaacc
ctcccacgttcggccaagggaccaaggtggaaatcaaa

(SEQ ID NO:90)

2Lm17-6

gaaattgtgttgacacagtctccagccaccctgtctttgtctccaggtgaaagagccaccctctcctgca
gggccagtcagagtgttagctacctgtactggtaccaacagaaacctggccaggcacctaggctcctc
at
ctatgccccatccaacctggcttctggaattccagccaggttcagtggcagtggatccgggacagactt
c
actctcaccatcagcagtctagagcctgaagattttgcagtttattactgtcagcagtggagttttaacc
ctcccacgttcggccaagggaccaaggtggaaatcaaa

(SEQ ID NO:91)

2Lm17-8

gaaattgtgttgacacagtctccagccaccctgtctttgtctccaggtgaaagagccaccctctcctgca
gggccagtcagagtgttagctacctgcactggtaccaacagaaacctggccaggcacctaggctcctc
at
ctatgccccatccaacctggcttctggaattccagccaggttcagtggcagtggatccgggacagactt
c
actctcaccatcagcagtctagagcctgaagattttgcagtttattactgtcagcagtggagttttaacc
ctcccacgttcggccaagggaccaaggtggaaatcaaa

(SEQ ID NO:92)

2Lm17-12	gaaattgtgttgacacagtctccagccaccctgtctttgtctccaggtgaaagagccaccctctcctgca gggccagtcagagtgttagctacctgaactggtaccaacagaaacctggccaggcacctaggctcctc at ctatgccccatccaacctggcttctggaattccagccaggttcagtggcagtggatccgggacagactt c actctcaccatcagcagtctagagcctgaagattttgcagtttattactgtcagcagtggagttttaacc ctcccacgttcggccaagggaccaaggtggaaatcaaa (SEQ ID NO:93)
2Lm17-14	gaaattgtgttgacacagtctccagccaccctgtctttgtctccaggtgaaagagccaccctctcctgca gggccagtcagagtgttagctacctggcttggtaccaacagaaacctggccaggcacctaggctcctc at ctatgccccatccaacctggcttctggaattccagccaggttcagtggcagtggatccgggacagactt c actctcaccatcagcagtctagagcctgaagattttgcagtttattactgtcagcagtggagttttaacc ctcccacgttcggccaagggaccaaggtggaaatcaaa (SEQ ID NO:94)
2Lm18-2	gaaattgtgttgacacagtctccagccaccctgtctttgtctccaggtgaaagagccaccctctcctgca gggccagttccagtgttagctacctggcctggtaccaacagaaacctggccaggcacctaggctcctc at ctatgccccatccaacctggcttctggaattccagccaggttcagtggcagtggatccgggacagactt c actctcaccatcagcagtctagagcctgaagattttgcagtttattactgtcagcagtggagttttaacc ctcccacgttcggccaagggaccaaggtggaaatcaaa (SEQ ID NO:95)
2Lm18-3	gaaattgtgttgacacagtctccagccaccctgtctttgtctccaggtgaaagagccaccctctcctgca gggccagttccagtgttagctacctgaattggtaccaacagaaacctggccaggcacctaggctcctca t ctatgccccatccaacctggcttctggaattccagccaggttcagtggcagtggatccgggacagactt c actctcaccatcagcagtctagagcctgaagattttgcagtttattactgtcagcagtggagttttaacc ctcccacgttcggccaagggaccaaggtggaaatcaaa (SEQ ID NO:96)
2Lm18-4	gaaattgtgttgacacagtctccagccaccctgtctttgtctccaggtgaaagagccaccctctcctgca gggccagttccagtgttagctacctggattggtaccaacagaaacctggccaggcacctaggctcctca t ctatgccccatccaacctggcttctggaattccagccaggttcagtggcagtggatccgggacagactt c actctcaccatcagcagtctagagcctgaagattttgcagtttattactgtcagcagtggagttttaacc ctcccacgttcggccaagggaccaaggtggaaatcaaa (SEQ ID NO:97)

2Lm18-5	gaaattgtgttgacacagtctccagccaccctgtctttgtctccaggtgaaagagccaccctctcctgca gggccagttccagtgttagctacctgtcctggtaccaacagaaacctggccaggcacctaggctcctca t ctatgccccatccaacctggcttctggaattccagccaggttcagtggcagtggatccgggacagactt c actctcaccatcagcagtctagagcctgaagattttgcagtttattactgtcagcagtggagttttaacc ctcccacgttcggccaagggaccaaggtggaaatcaaa
	(SEQ ID NO:98)
2Lm18-14	gaaattgtgttgacacagtctccagccaccctgtctttgtctccaggtgaaagagccaccctctcctgca gggccagttccagtgttagctacctgcattggtaccaacagaaacctggccaggcacctaggctcctca t ctatgccccatccaacctggcttctggaattccagccaggttcagtggcagtggatccgggacagactt c actctcaccatcagcagtctagagcctgaagattttgcagtttattactgtcagcagtggagttttaacc ctcccacgttcggccaagggaccaaggtggaaatcaaa
	(SEQ ID NO:99)
2Lm19-1	gaaattgtgttgacacagtctccagccaccctgtctttgtctccaggtgaaagagccaccctctcctgca gggccagtcagagtgttagctacattgattggtaccaacagaaacctggccaggcacctaggctcctca t ctatgccccatccaacctggcttctggaattccagccaggttcagtggcagtggatccgggacagactt c actctcaccatcagcagtctagagcctgaagattttgcagtttattactgtcagcagtggagttttaacc ctcccacgttcggccaagggaccaaggtggaaatcaaa
	(SEQ ID NO:100)
2Lm19-2	gaaattgtgttgacacagtctccagccaccctgtctttgtctccaggtgaaagagccaccctctcctgca gggccagtcagagtgttagctacatttcctggtaccaacagaaacctggccaggcacctaggctcctca t ctatgccccatccaacctggcttctggaattccagccaggttcagtggcagtggatccgggacagactt c actctcaccatcagcagtctagagcctgaagattttgcagtttattactgtcagcagtggagttttaacc ctcccacgttcggccaagggaccaaggtggaaatcaaa
	(SEQ ID NO:101)
2Lm19-3	gaaattgtgttgacacagtctccagccaccctgtctttgtctccaggtgaaagagccaccctctcctgca gggccagtcagagtgttagctacattgtttggtaccaacagaaacctggccaggcacctaggctcctca t ctatgccccatccaacctggcttctggaattccagccaggttcagtggcagtggatccgggacagactt c actctcaccatcagcagtctagagcctgaagattttgcagtttattactgtcagcagtggagttttaacc ctcccacgttcggccaagggaccaaggtggaaatcaaa
	(SEQ ID NO:102)

2Lm19-4

gaaattgtgttgacacagtctccagccaccctgtctttgtctccaggtgaaagagccaccctctcctgca
gggccagtcagagtgttagctacattgcttggtaccaacagaaacctggccaggcacctaggctcctca
t
ctatgccccatccaacctggcttctggaattccagccaggttcagtggcagtggatccgggacagactt
c
actctcaccatcagcagtctagagcctgaagattttgcagtttattactgtcagcagtggagttttaacc
ctcccacgttcggccaagggaccaaggtggaaatcaaa

(SEQ ID NO:103)

2Lm19-7

gaaattgtgttgacacagtctccagccaccctgtctttgtctccaggtgaaagagccaccctctcctgca
gggccagtcagagtgttagctacattacctggtaccaacagaaacctggccaggcacctaggctcctc
at
ctatgccccatccaacctggcttctggaattccagccaggttcagtggcagtggatccgggacagactt
c
actctcaccatcagcagtctagagcctgaagattttgcagtttattactgtcagcagtggagttttaacc
ctcccacgttcggccaagggaccaaggtggaaatcaaa

(SEQ ID NO:104)

2Lm19-9

gaaattgtgttgacacagtctccagccaccctgtctttgtctccaggtgaaagagccaccctctcctgca
gggccagtcagagtgttagctacattatttggtaccaacagaaacctggccaggcacctaggctcctca
t
ctatgccccatccaacctggcttctggaattccagccaggttcagtggcagtggatccgggacagactt
c
actctcaccatcagcagtctagagcctgaagattttgcagtttattactgtcagcagtggagttttaacc
ctcccacgttcggccaagggaccaaggtggaaatcaaa

(SEQ ID NO:105)

2Lm19-12

gaaattgtgttgacacagtctccagccaccctgtctttgtctccaggtgaaagagccaccctctcctgca
gggccagtcagagtgttagctacattccctggtaccaacagaaacctggccaggcacctaggctcctc
at
ctatgccccatccaacctggcttctggaattccagccaggttcagtggcagtggatccgggacagactt
c
actctcaccatcagcagtctagagcctgaagattttgcagtttattactgtcagcagtggagttttaacc
ctcccacgttcggccaagggaccaaggtggaaatcaaa

(SEQ ID NO:106)

2Lm19-14

gaaattgtgttgacacagtctccagccaccctgtctttgtctccaggtgaaagagccaccctctcctgca
gggccagtcagagtgttagctacattaactggtaccaacagaaacctggccaggcacctaggctcctc
at
ctatgccccatccaacctggcttctggaattccagccaggttcagtggcagtggatccgggacagactt
c
actctcaccatcagcagtctagagcctgaagattttgcagtttattactgtcagcagtggagttttaacc
ctcccacgttcggccaagggaccaaggtggaaatcaaa

(SEQ ID NO:107)

gaaattgtgttgacacagtctccagccaccctgtctttgtctccaggtgaaagagccaccctctcctgca
gggccagttccagtgttagctacatttcttggtaccaacagaaacctggccaggcacctaggctcctcat
ctatgccccatccaacctggcttctggaattccagccaggttcagtggcagtggatccgggacagactt
c

2Lm20-1 actctcaccatcagcagtctagagcctgaagattttgcagtttattactgtcagcagtggagttttaacc
ctcccacgttcggccaagggaccaaggtggaaatcaaa

(SEQ ID NO:108)

gaaattgtgttgacacagtctccagccaccctgtctttgtctccaggtgaaagagccaccctctcctgca
gggccagttccagtgttagctacattgcctggtaccaacagaaacctggccaggcacctaggctcctca
t
ctatgccccatccaacctggcttctggaattccagccaggttcagtggcagtggatccgggacagactt
c

2Lm20-2 actctcaccatcagcagtctagagcctgaagattttgcagtttattactgtcagcagtggagttttaacc
ctcccacgttcggccaagggaccaaggtggaaatcaaa

(SEQ ID NO:109)

gaaattgtgttgacacagtctccagccaccctgtctttgtctccaggtgaaagagccaccctctcctgca
gggccagttccagtgttagctacattgtttggtaccaacagaaacctggccaggcacctaggctcctcat
ctatgccccatccaacctggcttctggaattccagccaggttcagtggcagtggatccgggacagactt
cactctcaccatcagcagtctagagcctgaagattttgcagtttattactgtcagcagtggagttttaaccc

2Lm20-4 tcccacgttcggccaagggaccaaggtggaaatcaaa

(SEQ ID NO:110)

gaaattgtgttgacacagtctccagccaccctgtctttgtctccaggtgaaagagccaccctctcctgca
gggccagttccagtgttaactacatttattggtaccaacagaaacctggccaggcacctaggctcctcat
ctatgccccatccaacctggcttctggaattccagccaggttcagtggcagtggatccgggacagactt
c

2Lm20-8 actctcaccatcagcagtctagagcctgaagattttgcagtttattactgtcagcagtggagttttaacc
ctcccacgttcggccaagggaccaaggtggaaatcaaa

(SEQ ID NO:111)

gaaattgtgttgacacagtctccagccaccctgtctttgtctccaggtgaaagagccaccctctcctgca
gggccagttccagtgttagctacattgattggtaccaacagaaacctggccaggcacctaggctcctca
t
ctatgccccatccaacctggcttctggaattccagccaggttcagtggcagtggatccgggacagactt
c

2Lm20-11 actctcaccatcagcagtctagagcctgaagattttgcagtttattactgtcagcagtggagttttaacc
ctcccacgttcggccaagggaccaaggtggaaatcaaa

(SEQ ID NO:112)

gaaattgtgttgacacagtctccagccaccctgtctttgtctccaggtgaaagagccaccctctcctgca
gggccagttccagtgttagctccattatctggtaccaacagaaacctggccaggcacctaggctcctcat
ctatgccccatccaacctggcttctggaattccagccaggttcagtggcagtggatccgggacagactt
c

2Lm20-12 actctcaccatcagcagtctagagcctgaagattttgcagtttattactgtcagcagtggagttttaacc
ctcccacgttcggccaagggaccaaggtggaaatcaaa

(SEQ ID NO:113)

gaaattgtgttgacacagtctccagccaccctgtctttgtctccaggtgaaagagccaccctctcctgca
gggccagttccagtgttagctacatttattggtaccaacagaaacctggccaggcacctaggctcctcat
ctatgccccatccaacctggcttctggaattccagccaggttcagtggcagtggatccgggacagactt
c

2Lm20-13 actctcaccatcagcagtctagagcctgaagattttgcagtttattactgtcagcagtggagttttaacc
ctcccacgttcggccaagggaccaaggtggaaatcaaa

(SEQ ID NO:114)

gaaattgtgttgacacagtctccagccaccctgtctttgtctccaggggaaagagccaccctctcctgca
gggccagtcagagtgttagctacatgatctggtaccaacagaaacctggccaggctcctaggctcctca
t
ctatgccatatccaacctggcttctggaattccagccaggttcagtggcagtggatccgggacagacttc

2Lm actctcaccatcagcagcctagagcctgaagattttgcagtttattactgtcagcagtggatttctaacc
ctcccacgttcggccaagggaccaaggtggaaatcaaa

(SEQ ID NO:115)

gaaattgtgttgacacagtctccagccaccctgtctttgtctccaggtgaaagagccaccctctcctgca
gggccagtcagagtgttagcagctacatgcactggtaccaacagaaacctggccaggcacctaggct
cctcatctatgccccatccaacctggcttctggaattccagccaggttcagtggcagtggatccgggac

2L agacttcactctcaccatcagcagtctagagcctgaagattttgcagtttattactgtcagcagtggagtttt
aaccctcccacgttcggccaagggaccaaggtggaaatcaaa

(SEQ ID NO: 116)

caggcttatctacagcagtctggggctgagctggtgaggcctggggcctcagtgaagatgtcctgcaa
gg
cttctggctacacatttaccagttacaatatgcactgggtaaagcagacacctagacagggcctggaatg
gattggagctatttatccaggaaatggtgatacttcctacaatcagaagttcaagggcaaggccacactg

2H7_mVK actgtagacaaatcctccagcacagcctacatgcagctcagcagcctgacatctgaagactctgcggtc
t
atttctgtgcaagagtggtgtactatagtaactcttactggtacttcgatgtctggggcacagggaccac
ggtcaccgtctct

(SEQ ID NO:117)

2H5m3	gaggtgcagctggtgcagtctggagcagaggtgaaaaagcccggagagtctctgaagatttcctgtaagg gatccggatacagctttaccagctacaacatgcactgggtgcgccagatgcccgggaaaggcctcgagtg gatgggggctatctatcctggaaatggtgatacatcctacaatcagaagttcaagggccaggtcactatc tcggccgacaagtccatcagcaccgcctacctgcaatggagcagcctgaaggcctcggacaccgcc atgtattactgtgcacgcagcgtgtactatagtaactactggtacttcgatctctggggccgcggcaccct ggt cactgtctcctct (SEQ ID NO:118)
2H5	gaggtgcagctggtgcagtctggagcagaggtgaaaaagcccggagagtctctgaagatttcctgtaagg gatccggatacagctttaccagctacaacatgcactgggtgcgccagatgcccgggaaaggcctcgagtg gatgggggctatctatcctggaaatggtgatacatcctacaatcagaagttcaagggccaggtcactatc tcggccgacaagtccatcagcaccgcctacctgcaatggagcagcctgaaggcctcggacaccgcc atgtattactgtgcacgcgtcgtgtactatagtaactcttactggtacttcgatctctggggccgcggcacc ct ggtcactgtctcctct (SEQ ID NO:119)
2H3m3 **(mutant CDR3 in huVH3-47 framework and JH2)**	gaggtgcagctgttggagtctggtggaggcttggtacagcctggcggatccctgagactctcct gtgcagcctctggattcacctttagcagctataacatgcactgggtccgccaggctccagggaaggga ct ggagtgggtctcagctatctatcctggaaatggtgatacatcctacaatcagaagttcaagggccggttc accatctccagagacaattccaagaacacgctgtatctgcaaatgaacagcctgagagccgaggacac gg ccgtatattactgtgcgaaaagctactatagtaactcctactggtacttcgatctctggggccgcggcac cctggtcactgtctcctca (SEQ ID NO:120)
2Hm **(CDR3 mutant in huVH1 framework and JH2)**	caggtgcagctggtgcagtctggtgctgagagcaagaagcctggggcctcagtgaaggtttcctgcaagg ctagcggatacaccttcaccagctacaatatgcactgggtgcgacaggcgcctggacaagggctcgagtg gatgggagctatctatcctggaaatggtgatacatcctacaatcagaagttcaagggcagggtcaccatg accagagacacgtccacgagcacagtctacatggagctgagcagcctgagatctgaggacacggcc gtgtattactgtgcccgaagcgtgtactatagtaactactggtacttcgatctctggggccgcggcaccct ggt cactgtctcctct (SEQ ID NO:121)

2H **(WT 2H7 CDRs in huVH1 framework and JH2)**	caggtgcagctggtgcagtctggtgctgagagcaagaagcctggggcctcagtgaaggtttcct gcaaggctagcggatacaccttcaccagctacaatatgcactgggtgcgacaggcgcctggacaagg gctcgagtggatgggagctatctatcctggaaatggtgatacatcctacaatcagaagttcaagggcag ggtc accatgaccagagacacgtccacgagcacagtctacatggagctgagcagcctgagatctgaggaca cggccgtgtatttctgtgcccgagtggtgtactatagtaactcttactggtacttcgatctctggggccgcg g caccctggtcactgtctcctct (SEQ ID NO:122)
2Hm3 **(CDR3 mutant)**	caggtgcagctggtgcagtctggtgctgagagcaagaagcctggggcctcagtgaaggtttcctgcaa gg ctagcggatacaccttcaccagctacaatatgcactgggtgcgacaggcgcctggacaagggctcga gtg gatgggagctatctatcctggaaatggtgatacatcctacaatcagaagttcaagggcagggtcaccat g accagagacacgtccacgagcacagtctacatggagctgagcagcctgagatctgaggacacggcc gtgtattactgtgcccgaagctactatagtaactcttactggtacttcgatctctggggccgcggcaccct ggtcactgtctcctct (SEQ ID NO:123)
2Hm4 **(CDR3 mutant)**	caggtgcagctggtgcagtctggtgctgagagcaagaagcctggggcctcagtgaaggtttcctgcaa gg ctagcggatacaccttcaccagctacaatatgcactgggtgcgacaggcgcctggacaagggctcga gtg gatgggagctatctatcctggaaatggtgatacatcctacaatcagaagttcaagggcagggtcaccat g accagagacacgtccacgagcacagtctacatggagctgagcagcctgagatctgaggacacggcc gtgtattactgtgcccgagtgtactatagtaactcttactggtacttcgatctctggggccgcggcaccct ggt cactgtctcctct (SEQ ID NO:124)
2Hm5 **(CDR3 mutant in huVH1 framework and JH2)**	caggtgcagctggtgcagtctggtgctgagagcaagaagcctggggcctcagtgaaggtttcctgcaa gg ctagcggatacaccttcaccagctacaatatgcactgggtgcgacaggcgcctggacaagggctcga gtg gatgggagctatctatcctggaaatggtgatacatcctacaatcagaagttcaagggcagggtcaccat g accagagacacgtccacgagcacagtctacatggagctgagcagcctgagatctgaggacacggcc gtgtattactgtgcccgaagcgtgtactataactcttactggtacttcgatctctggggccgcggcaccct ggtcactgtctcctct (SEQ ID NO:125)

2H3 **(WT 2H7 CDRs in huVH3-47 framework and JH2)**	gaggtgcagctgttggagtctggtggaggcttggtacagcctggcggatccctgagactctcct gtacagcctctggattcacctttagcagctataacatgcactgggtccgccaggctccagggaagggca ct ggagtgggtctcagctatctatcctggaaatggtgatacatcctacaatcagaagttcaagggccggttc accatctccagagacaattccaagaacacgctgtatctgcaaatgaacagcctgagagccgaggacac gg ccgtatattactgtgcgaaagtcgtgtactatagtaactcctactggtacttcgatctctggggccgcgg caccctggtcactgtctcctct (SEQ ID NO:126)
2H7mVH	caggcttatctacagcagtctggggctgagctggtgaggcctggggcctcagtgaagatgtcctgcaa gg cttctggctacacatttaccagttacaatatgcactgggtaaagcagacacctagacagggcctggaatg gattggagctatttatccaggaaatggtgatacttcctacaatcagaagttcaagggcaaggccacactg actgtagacaaatcctccagcacagcctacatgcagctcagcagcctgacatctgaagactctgcggtc t atttctgtgcaagagtggtgtactatagtaactcttactggtacttcgatgtctggggcacagggaccac ggtcaccgtctct (SEQ ID NO:127)
IgG1 Hinge and CH2CH3	EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:128)
Human CD20 (Extracellular domain underlined)	MTTPRNSVNGTFPAEPMKGPIAMQSGPKPLFRRMSSLVGPTQSFF MRESKTLGAVQIMNGLFHIALGGLLMIPAGIYAPICVTVWYPLW GGIMYIISGSLLAATEKNSRKCLVKGKMIMNSLSLFAAISGMILSI MDILNI**KISHFLKMESLNFIRAHTPYINIYNCEPANPSEKNSPST QYCY**SIQSLFLGILSVMLIFAFFQELVIAGIVENEWKRTCSRPKSNI VLLSAEEKKEQTIEIKEEVVGLTETSSQPKNEEDIEIIPIQEEEEEET ETNFPEPPQDQESSPIENDSSP (SEQ ID NO: 129)

CLAIMS

What is claimed is:

1. A humanized CD20 binding molecule comprising an immunoglobulin heavy chain variable domain (VH) and an immunoglobulin light chain variable domain (VL) comprising framework regions and CDR1, CDR2 and CDR3 regions, wherein said framework regions are human immunoglobulin framework regions and wherein:

(a) the VH domain amino acid sequence comprises the amino acid sequence of a heavy chain CDR3 found in any one of SEQ ID NOS: 1-59; or

(b) the VL domain amino acid sequence comprises the amino acid sequence of a light chain CDR3 found in any one of SEQ ID NOS: 1-59; or

(c) the humanized CD20 binding molecule comprises a VH amino acid sequence of (a) and a VL amino acid sequence of (b); or

(d) the humanized CD20 binding molecule comprises a VH amino acid sequence of (a) and a VL amino acid sequence of (b) and wherein said VH and VL are found in the same reference sequence,

or a CD20 binding fragment of said binding molecule.

2. The humanized CD20 binding molecule of claim 1, further comprising:

(a) a VH domain amino acid sequence comprising an amino acid sequence that is at least 90% identical to the VH domain amino acid sequence found in any one of SEQ ID NOS: 1-59; or

(b) a VL domain amino acid sequence comprising an amino acid sequence that is at least 90% identical to the VL domain amino acid sequence found in any one of SEQ ID NOS: 1-59; or

(c) both a VH of (a) and a VL of (b); or

(d) the VH of (a) and the VL of (b), which are found in the same reference sequence.

3. The humanized CD20 binding molecule of claim 1, further comprising:

(a) a VH domain amino acid sequence comprising an amino acid sequence that is at least 95% identical to the VH domain amino acid sequence found in any one of SEQ ID NOS: 1-59; or

(b) a VL domain amino acid sequence comprising an amino acid sequence that is at least 95% identical to the VL domain amino acid sequence found in any one of SEQ ID NOS: 1-59; or

(c) both a VH of (a) and a VL of (b); or

(d) the VH of (a) and the VL of (b), which are found in the same reference sequence.

4. The humanized CD20 binding molecule of claim 1, further comprising:

(a) a VH domain amino acid sequence comprising the VH domain amino acid sequence found in any one of SEQ ID NOS: 1-59; or

(b) a VL domain amino acid sequence comprising the VL domain amino acid sequence found in any one of SEQ ID NOS: 1-59; or

(c) both a VH of (a) and a VL of (b); or

(d) the VH of (a) and the VL of (b), which are found in the same reference sequence.

5. The humanized CD20 binding molecule of any one of claims 1-4, which is an antibody or an antigen-binding fragment thereof.

6. The humanized CD20 binding molecule of any one of claims 1-4, which is a humanized Small Modular Immunopharmaceutical (SMIP).

7. A humanized SMIP that specifically binds CD20.

8. The humanized SMIP of claim 7 that binds the same epitope as, competes with or cross-competes with a humanized CD20 binding molecule comprising the amino acid sequence shown in any one of SEQ ID NOS: 1-59.

9. The humanized SMIP of any one of claims 6-8, comprising a hinge domain having the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 60.

10. The humanized SMIP of claim 9, comprising an effector domain comprising the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 61.

11. The humanized SMIP of claim 7, wherein the SMIP possesses at least one of the following properties:

(a) ADCC activity;

(b) CDC activity;

(c).reduces the growth of xenograft tumors;

(d) reduces the progression of disseminated lymphoma in vivo;

(e) depletes CD19+ B cells in peripheral blood, bone marrow and lymph nodes.

12. The humanized SMIP of claim 11, wherein the SMIP possesses at least three of the properties.

13. The CD20 binding molecule of any one of claims 1-6 or the humanized SMIP of any one of claims 7-12 which is detectably labeled.

14. A composition comprising the CD20 binding molecule of any one of claims 1-6 or the humanized SMIP of any one of claims 7-12.

15. A kit comprising the CD20 binding molecule of any one of claims 1-6, the humanized SMIP of any one of claims 7-12 or a composition of claim 14 and instructions for use.

16. A nucleic acid encoding the CD20 binding molecule or antigen-binding fragment of any one of claims 1-6 or the humanized SMIP of any one of claims 7-12.

17. The nucleic acid of claim 16 that encodes the VH domain and comprises a nucleotide sequence encoding the VH amino acid sequence found in any one of SEQ ID NOS: 1-59.

18. The nucleic acid of claim 17, comprising the nucleotide sequence of any one of SEQ ID NOS: 118-126.

19. The nucleic acid of claim 16 that encodes the VL domain and comprises a nucleotide sequence encoding the VL amino acid sequence found in any one of SEQ ID NOS: 1-59.

20. The nucleic acid of claim 19, comprising the nucleotide sequence of any one of SEQ ID NOS: 67-116.

21. The nucleic acid of any one of claims 16-20, operably linked to an expression control sequence.

22. A vector comprising the nucleic acid of any one of claims 16-21.

23. A host cell comprising the nucleic acid of any one of claims 16-21 or the vector of claim 22.

24. A method for producing a humanized CD20 binding molecule or antigen binding fragment thereof comprising the step of culturing the host cell of claim 23 and recovering the humanized CD20 binding molecule or antigen-binding fragment.

25. A method of detecting CD20 in a biological sample from a subject comprising the step of contacting the sample with the CD20 binding molecule or the humanized SMIP of claim 13 and detecting binding.

26. A method of treating a subject having or suspected of having a disease associated with aberrant B-cell activity, comprising administering to the subject a therapeutically effective amount of the humanized CD20 binding molecule of any one of claims 1-6, the humanized SMIP of any one of claims 7-12 or the composition of claim 14.

27. The method of claim 26, wherein the disease associated with aberrant B cell activity is rheumatoid arthritis, lupus erythamatosis or multiple sclerosis.

28. A method of reducing the number of B-cells in a subject in need thereof, comprising administering to the subject a therapeutically effective amount of the humanized CD20 binding molecule of any one of claims 1-6, the humanized SMIP of any one of claims 7-12 or the composition of claim 14.

29. The method of claim 28, wherein the subject is suffering from rheumatoid arthritis, lupus erythematosus or multiple sclerosis.

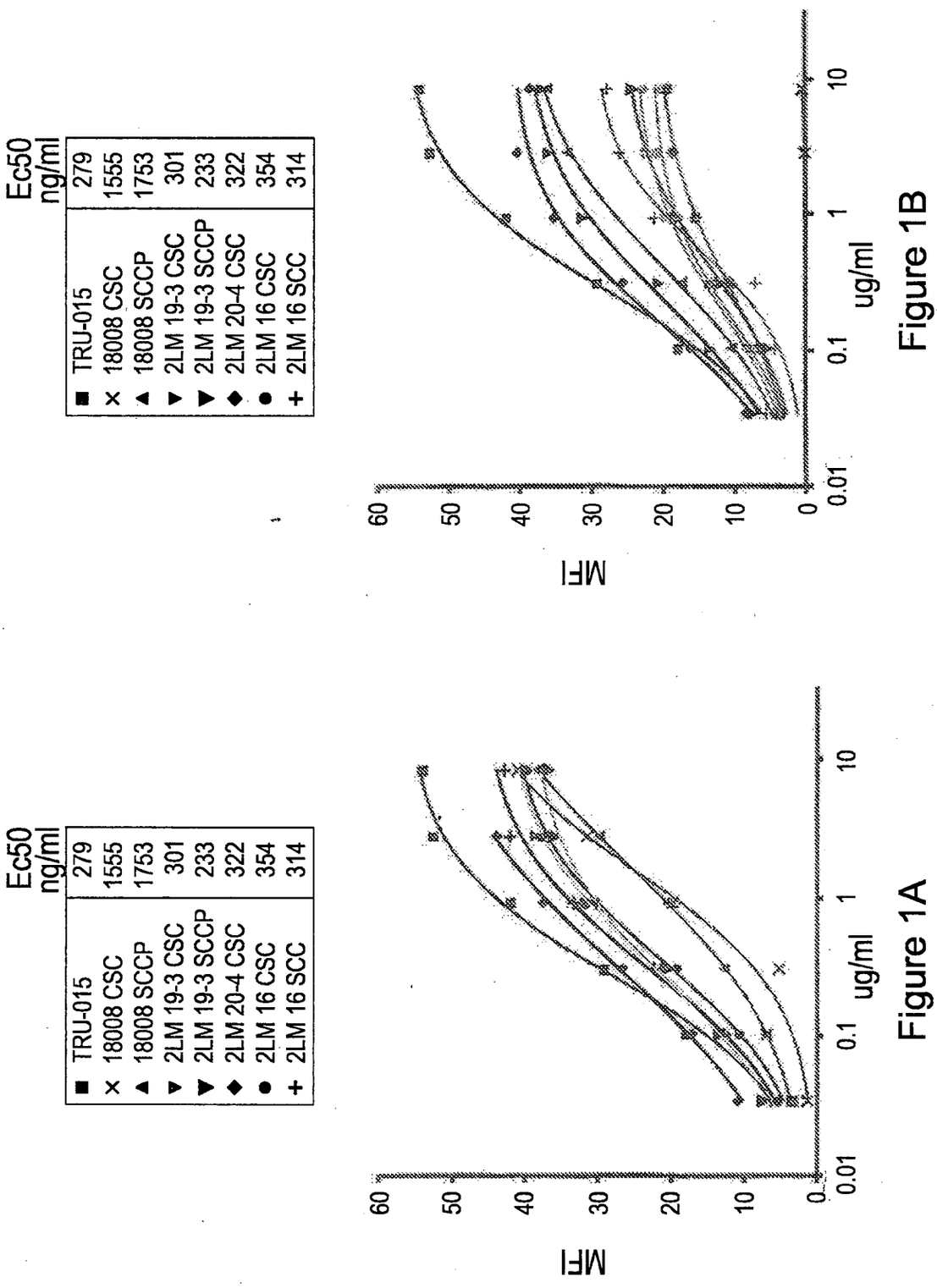


Figure 1B

Figure 1A

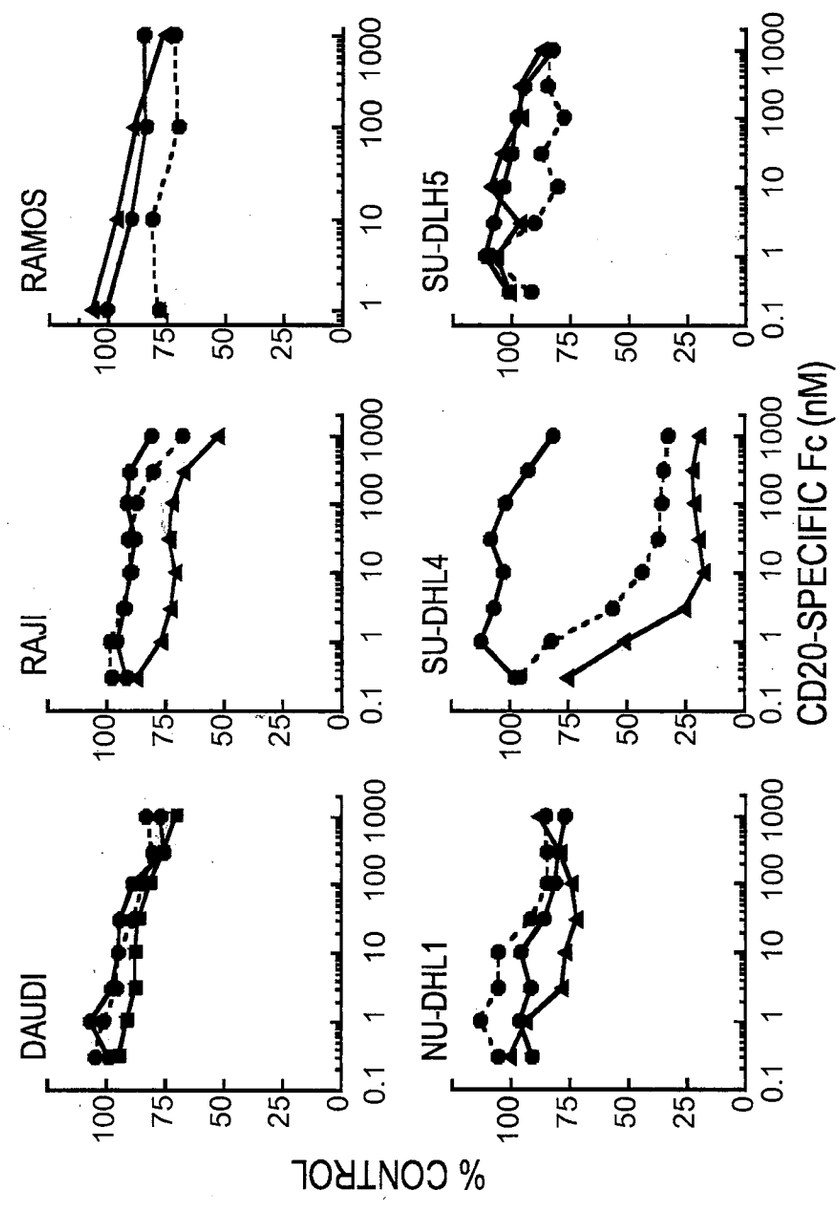

RAMOS
SU-DLH5
RAJI
SU-DHL4
DAUDI
NU-DHL1
% CONTROL
CD20-SPECIFIC Fc (nM)
018011
TRU-015
RITUXAN®

Figure 2

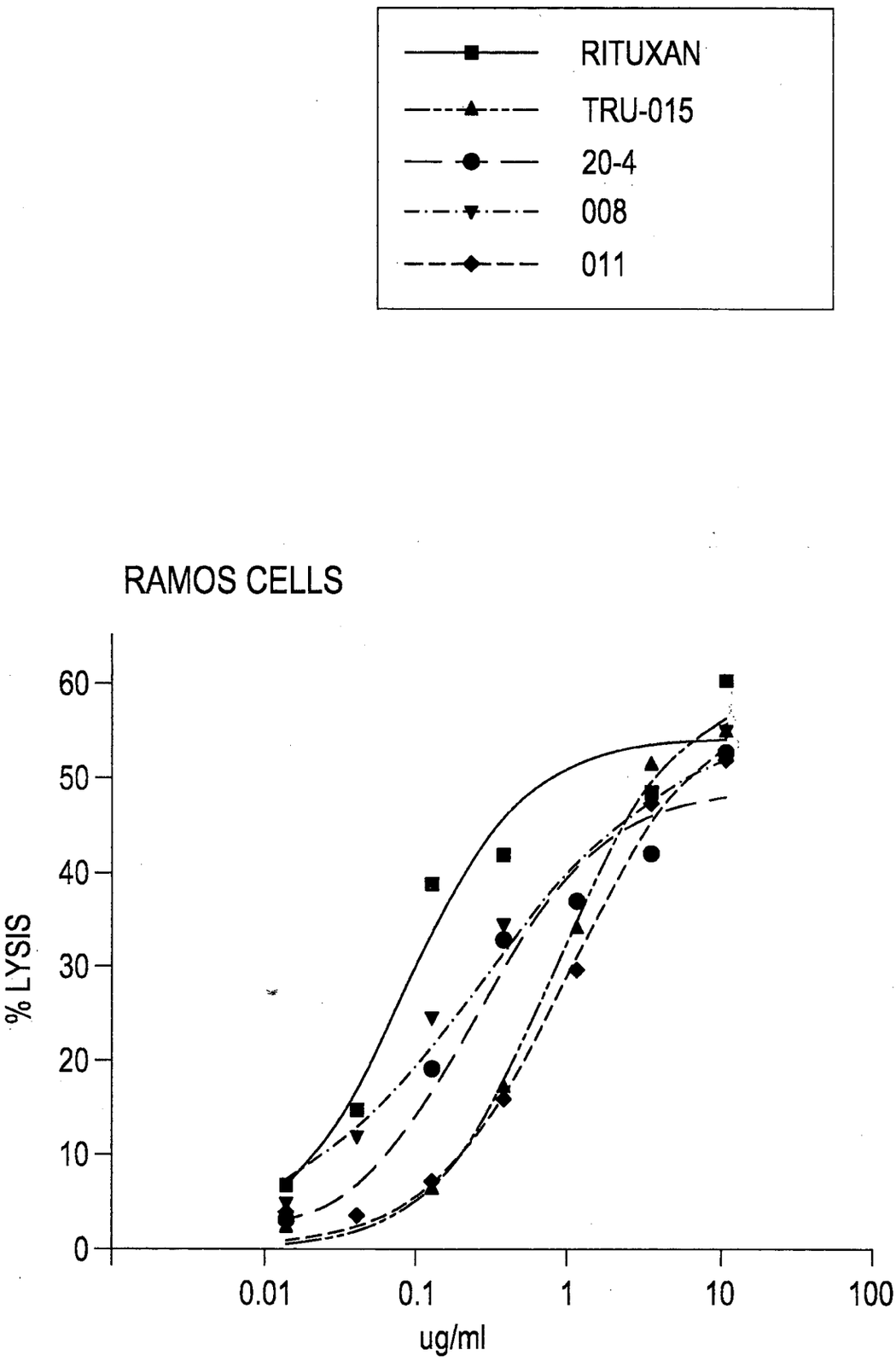

RITUXAN
TRU-015
20-4
008
011
RAMOS CELLS
% LYSIS
60
50
40
30
20
10
0
0.01
0.1
1
10
100
ug/ml

Figure 3A

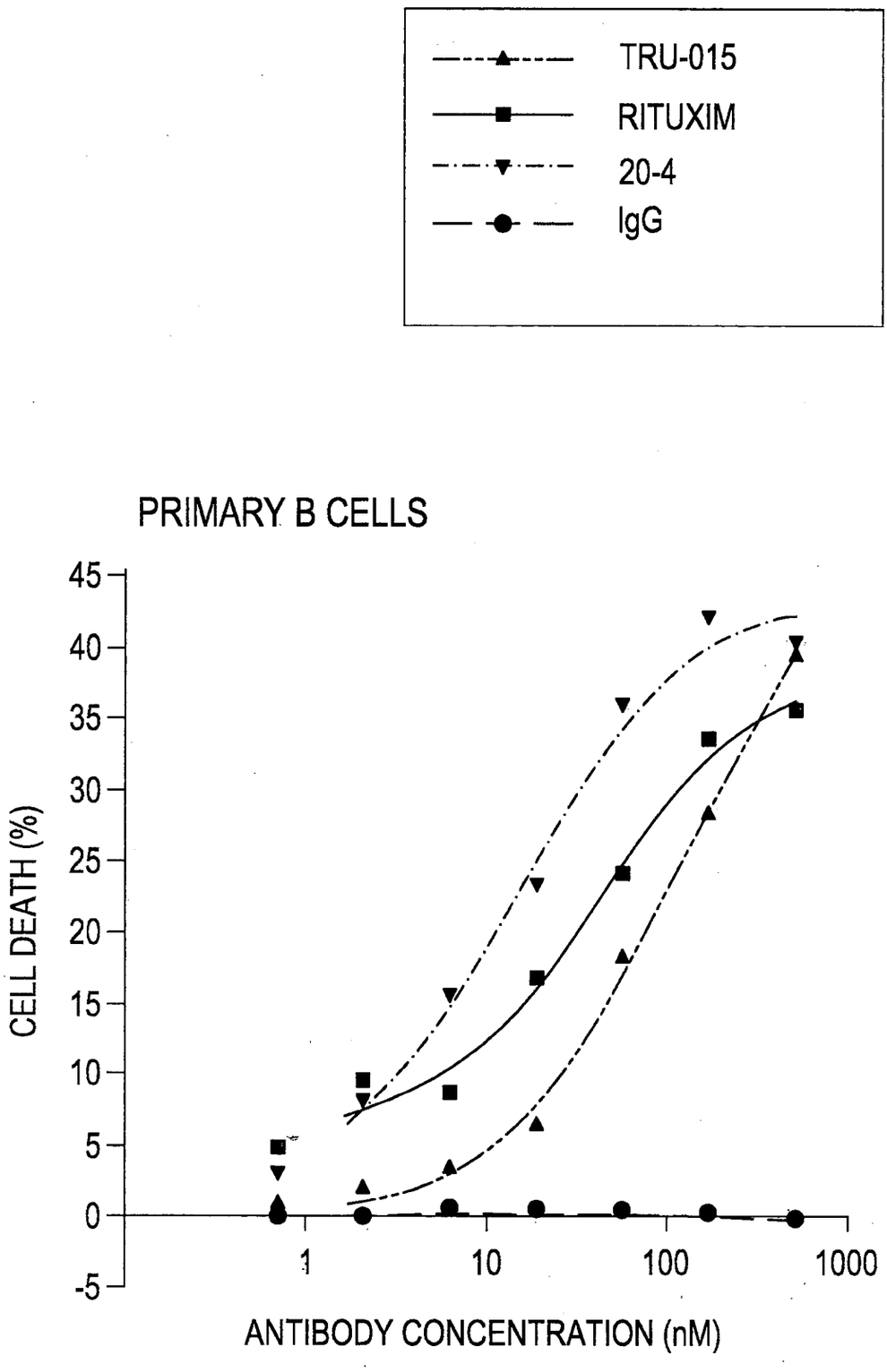

TRU-015
RITUXIM
20-4
IgG
PRIMARY B CELLS
CELL DEATH (%)
45
40
35
30
25
20
15
10
5
0
-5
1
10
100
1000
ANTIBODY CONCENTRATION (nM)

Figure 3B

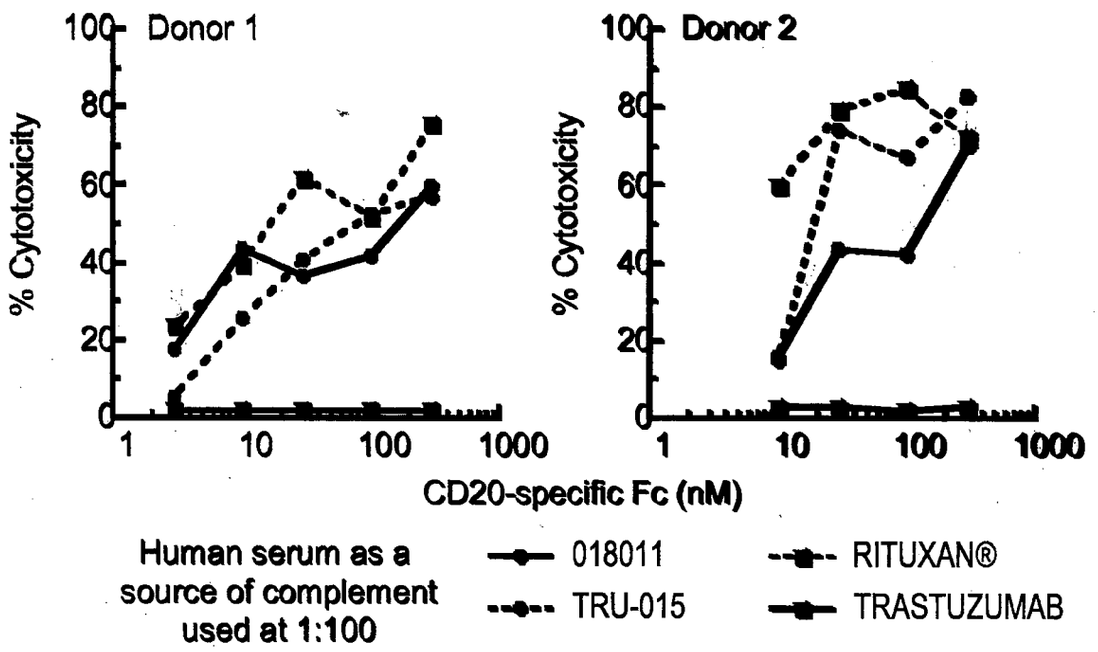


Figure 4A

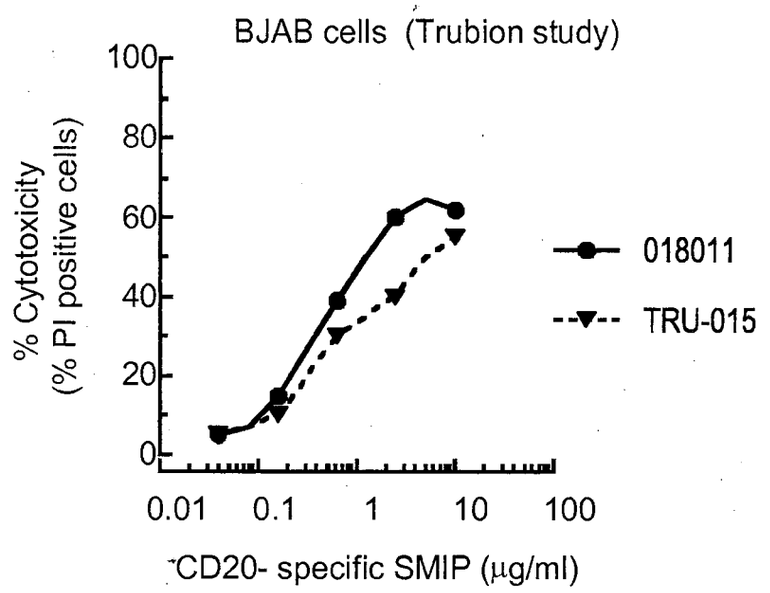


Figure 4B

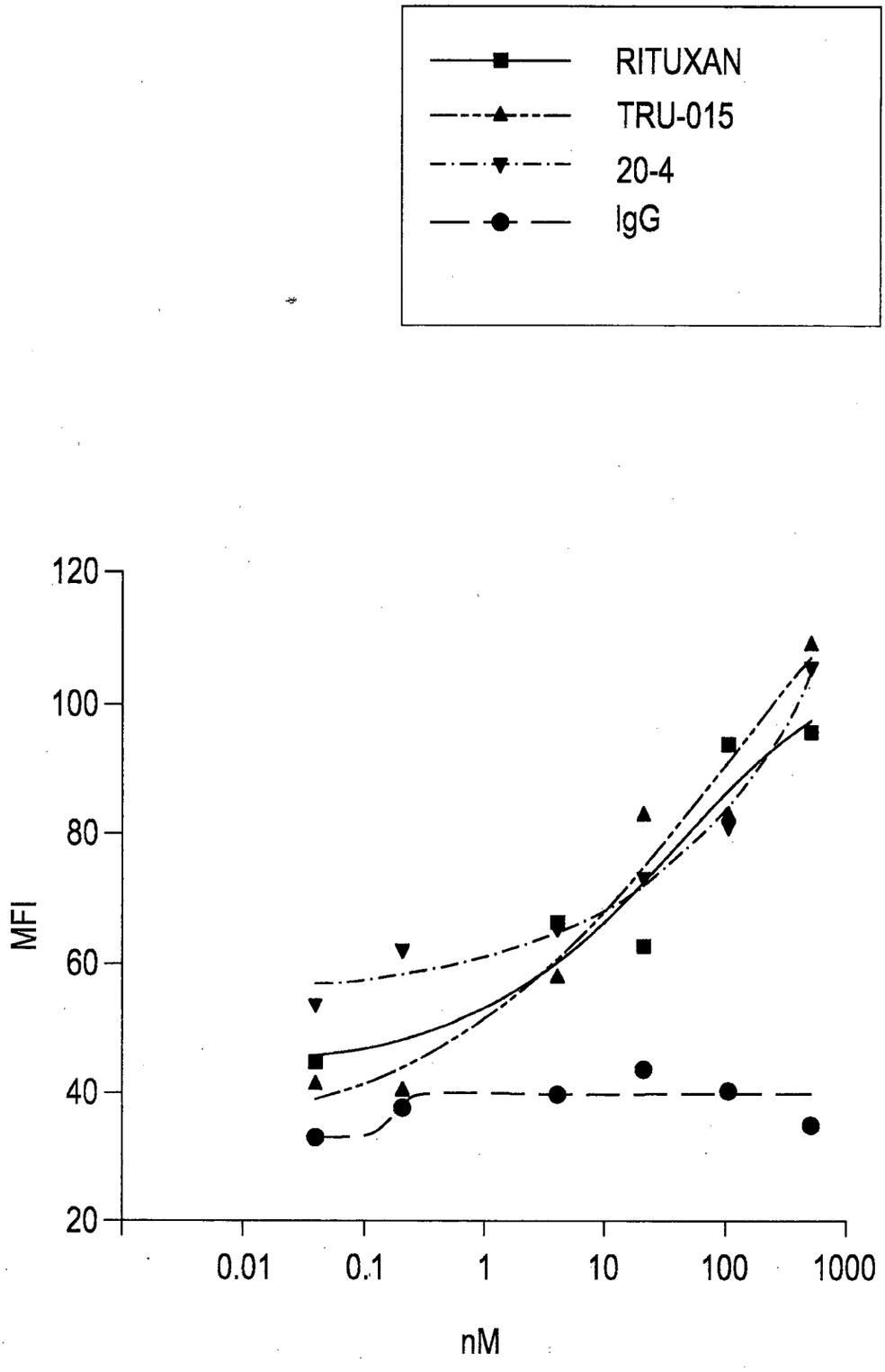

RITUXAN
TRU-015
20-4
IgG
120
100
80
60
40
20
MFI
0.01
0.1
1
10
100
1000
nM

Figure 5

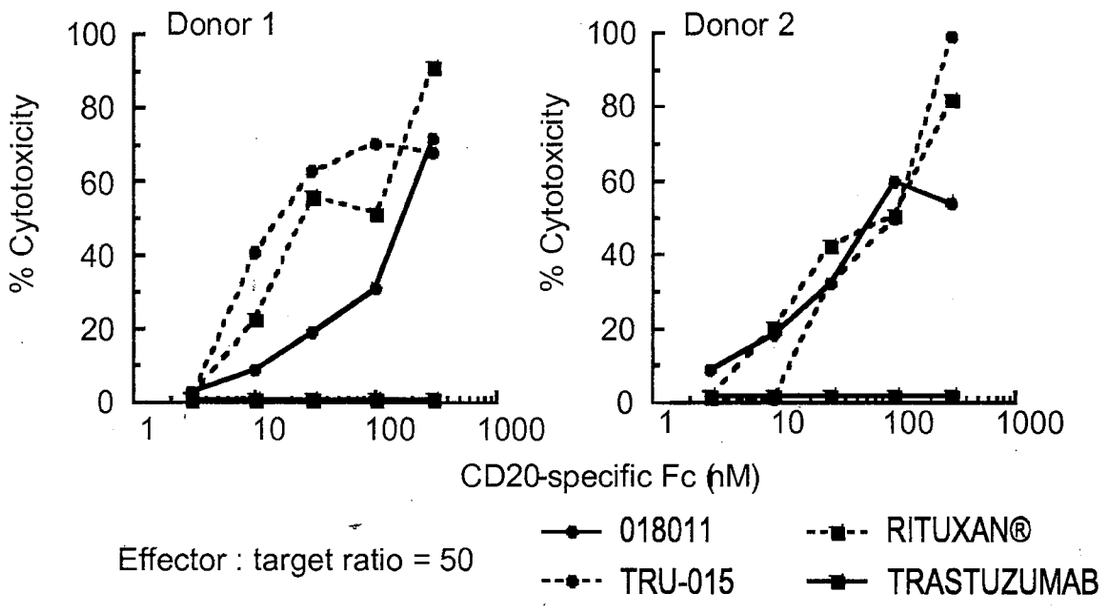


Figure 6A

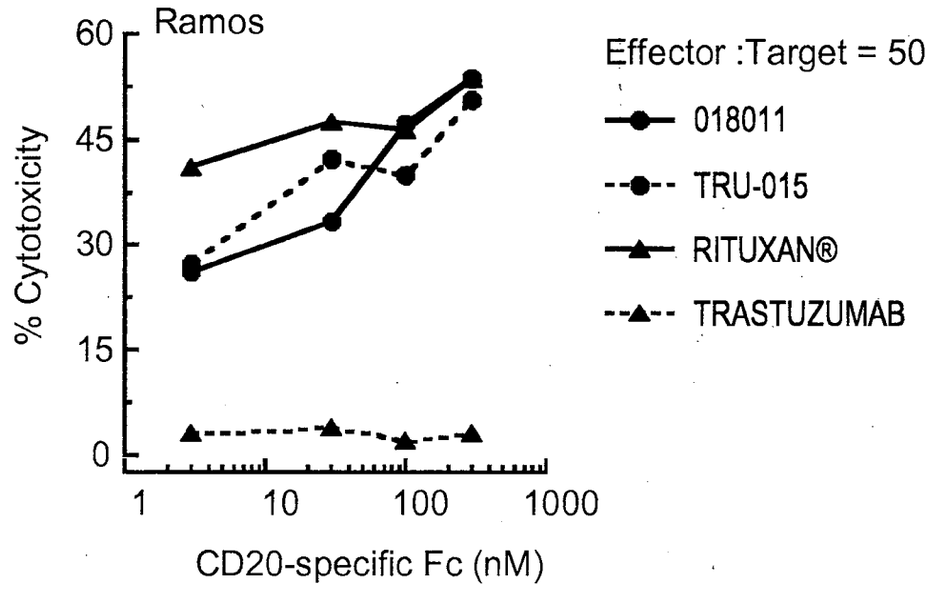


Figure 6B

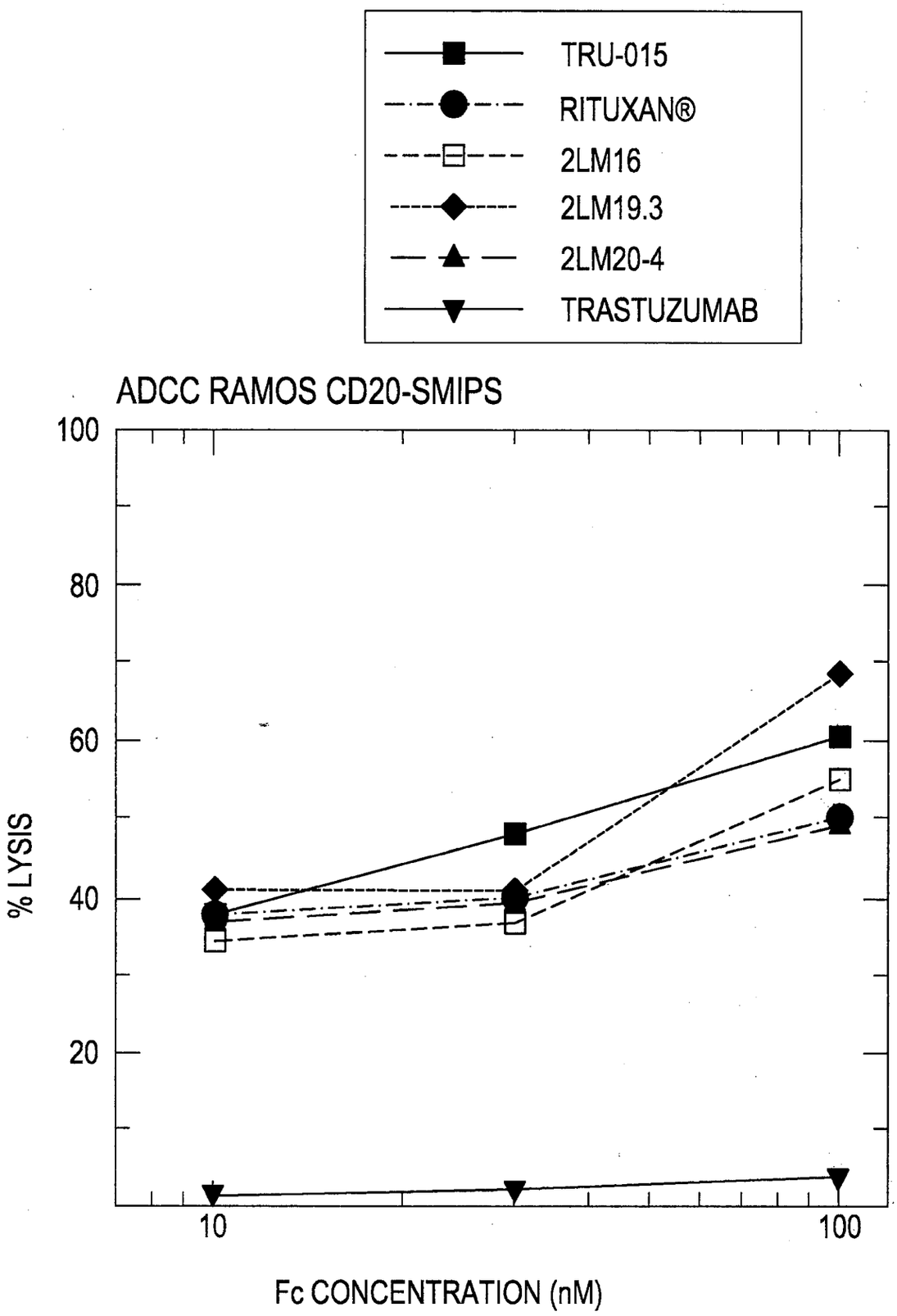

TRU-015
RITUXAN®
2LM16
2LM19.3
2LM20-4
TRASTUZUMAB
ADCC RAMOS CD20-SMIPS
100
80
60
40
20
% LYSIS
10
100
Fc CONCENTRATION (nM)

Figure 7

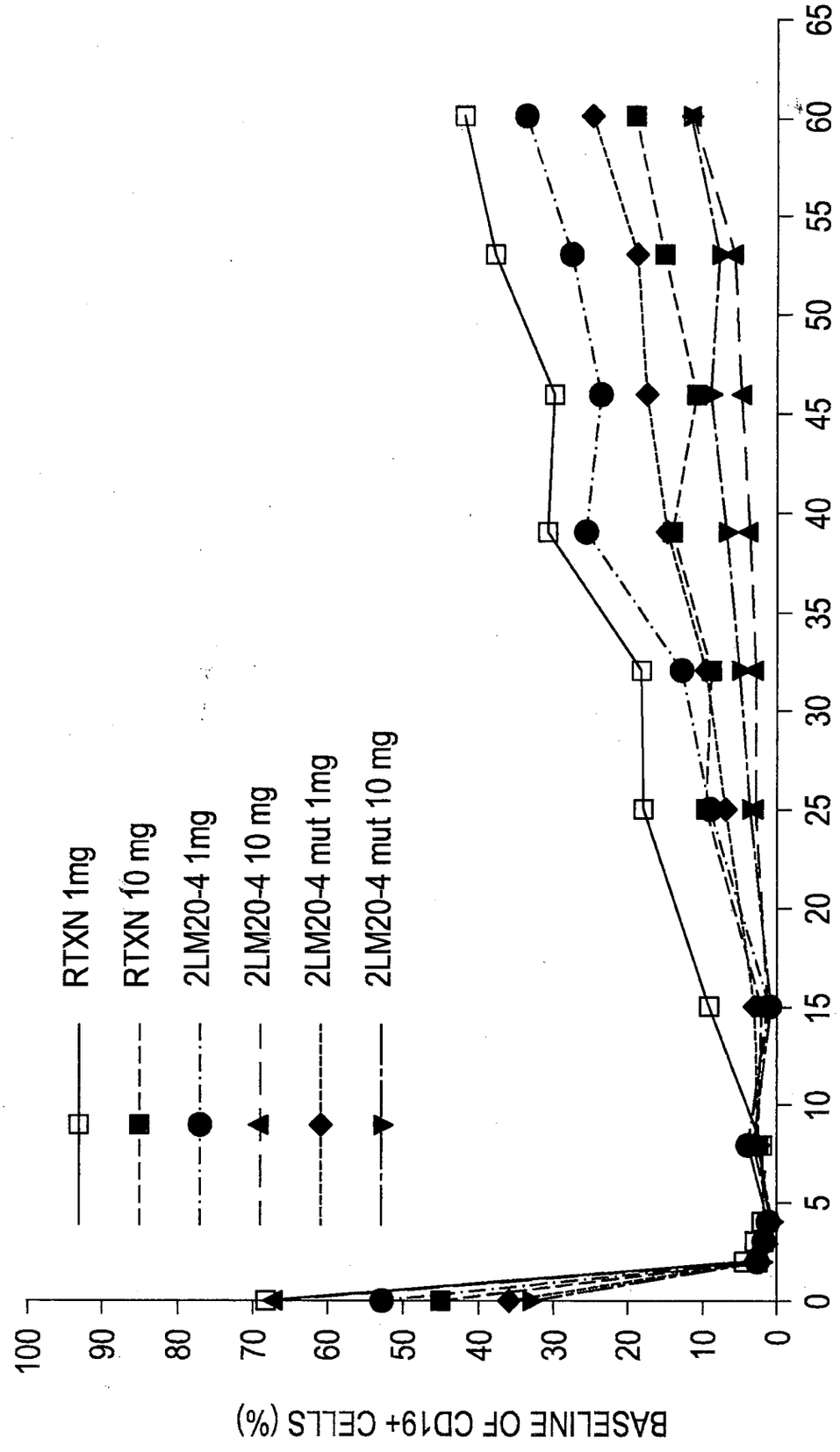

RTXN 1mg
RTXN 10 mg
2LM20-4 1mg
2LM20-4 10 mg
2LM20-4 mut 1mg
2LM20-4 mut 10 mg
BASELINE OF CD19+ CELLS (%)
DAY
0
5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100

Figure 8

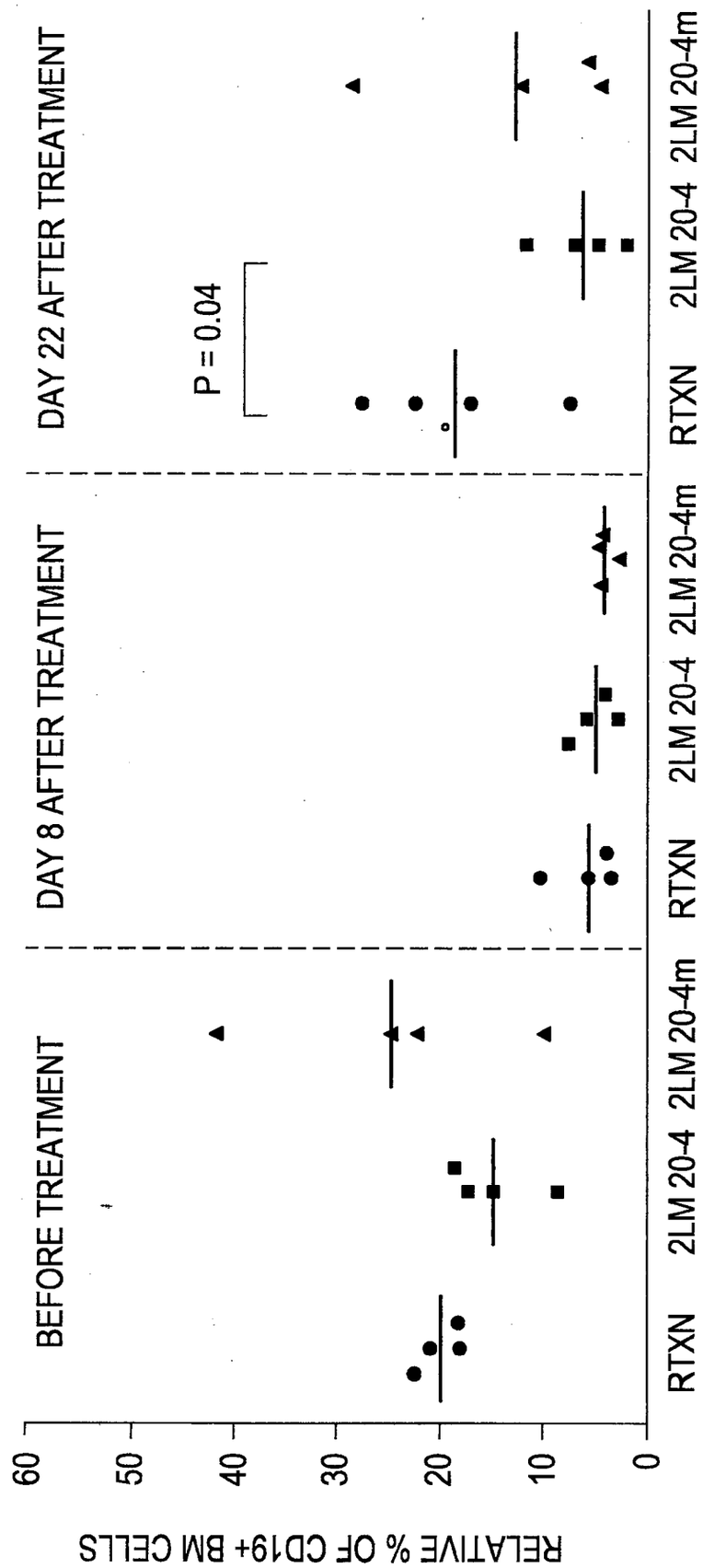

RELATIVE % OF CD19+ BM CELLS
60
50
40
30
20
10
0
BEFORE TREATMENT
DAY 8 AFTER TREATMENT
DAY 22 AFTER TREATMENT
P = 0.04
RTXN
2LM 20-4
2LM 20-4m
RTXN
2LM 20-4
2LM 20-4m
RTXN
2LM 20-4
2LM 20-4m

Figure 9

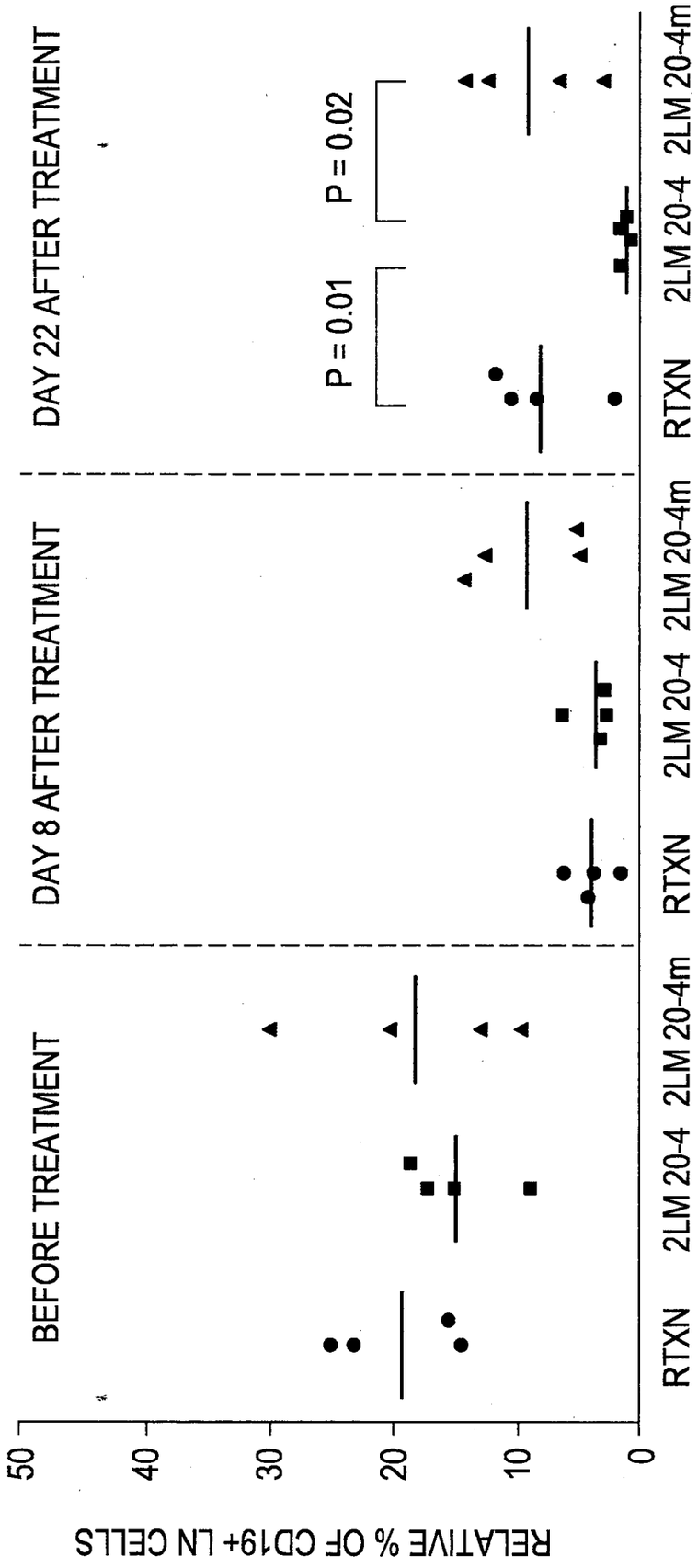

RELATIVE % OF CD19+ LN CELLS
50
40
30
20
10
0
BEFORE TREATMENT
DAY 8 AFTER TREATMENT
DAY 22 AFTER TREATMENT
P = 0.01
P = 0.02
RTXN
2LM 20-4
2LM 20-4m
RTXN
2LM 20-4
2LM 20-4m
RTXN
2LM 20-4
2LM 20-4m

Figure 10

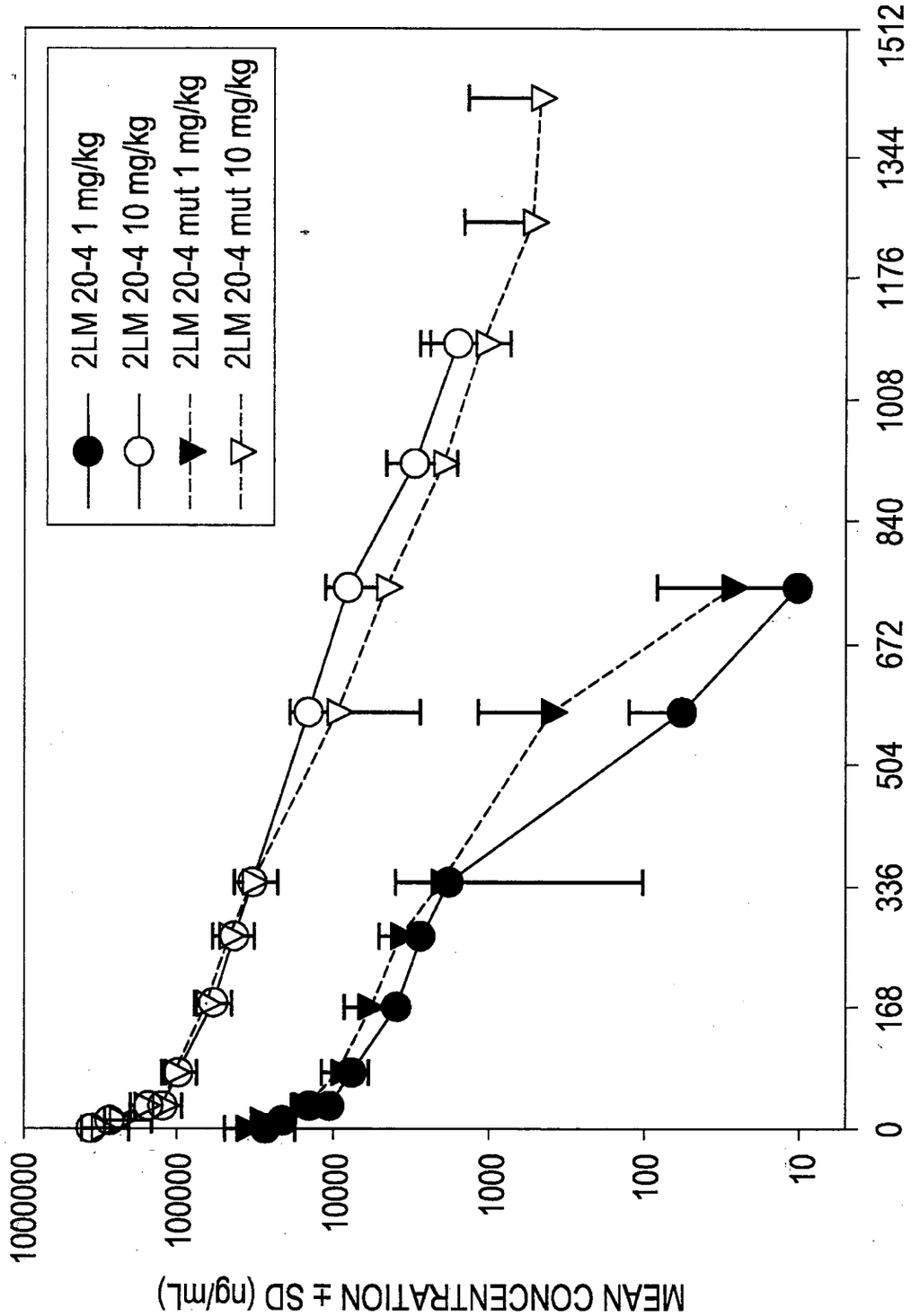

2LM 20-4 1 mg/kg
2LM 20-4 10 mg/kg
2LM 20-4 mut 1 mg/kg
2LM 20-4 mut 10 mg/kg
MEAN CONCENTRATION ± SD (ng/mL)
1000000
100000
10000
1000
100
10
0
168
336
504
672
840
1008
1176
1344
1512
HOURS

Figure 11

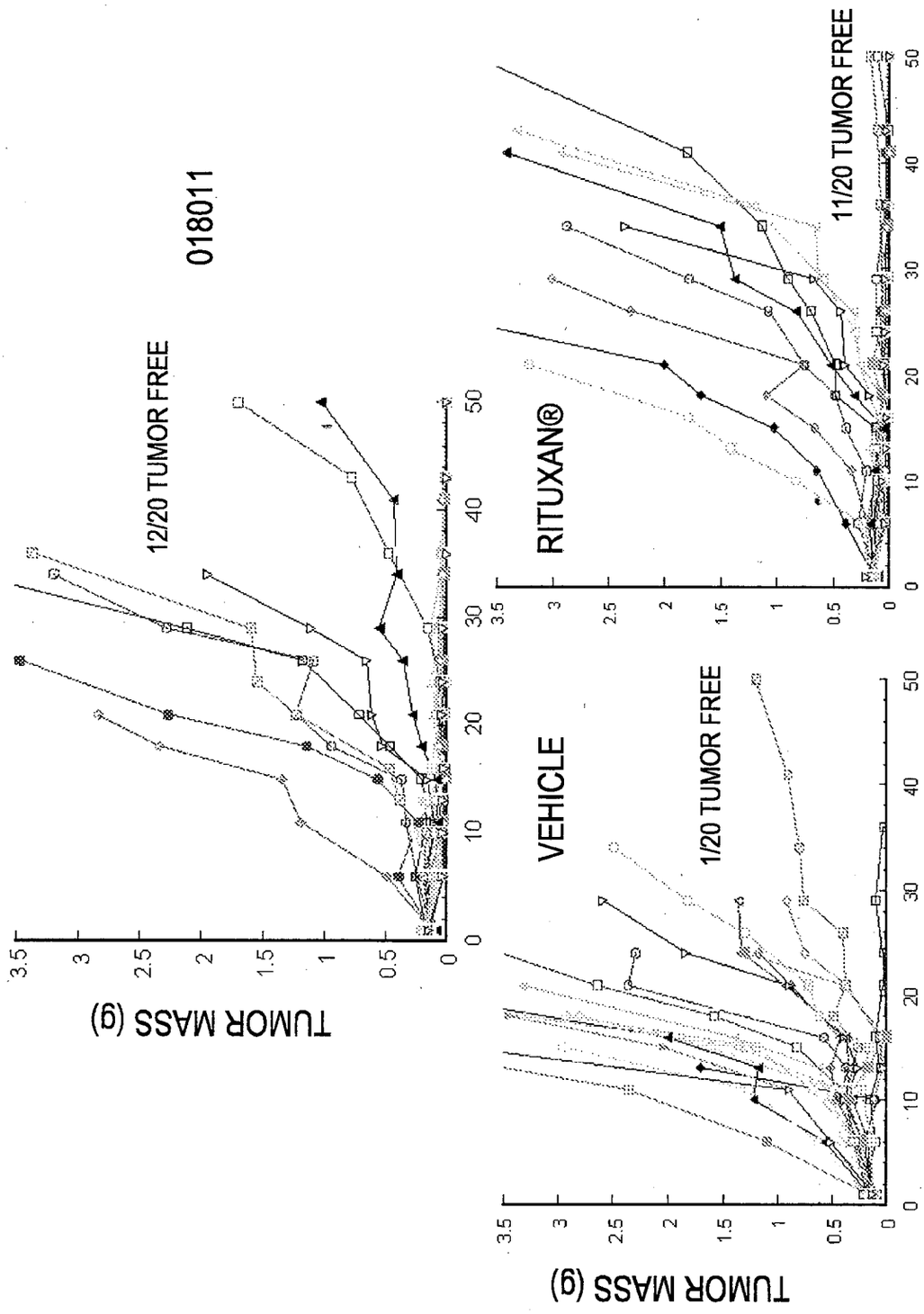

018011
12/20 TUMOR FREE
11/20 TUMOR FREE
RITUXAN®
VEHICLE
1/20 TUMOR FREE
TUMOR MASS (g)
DAYS

Figure 12

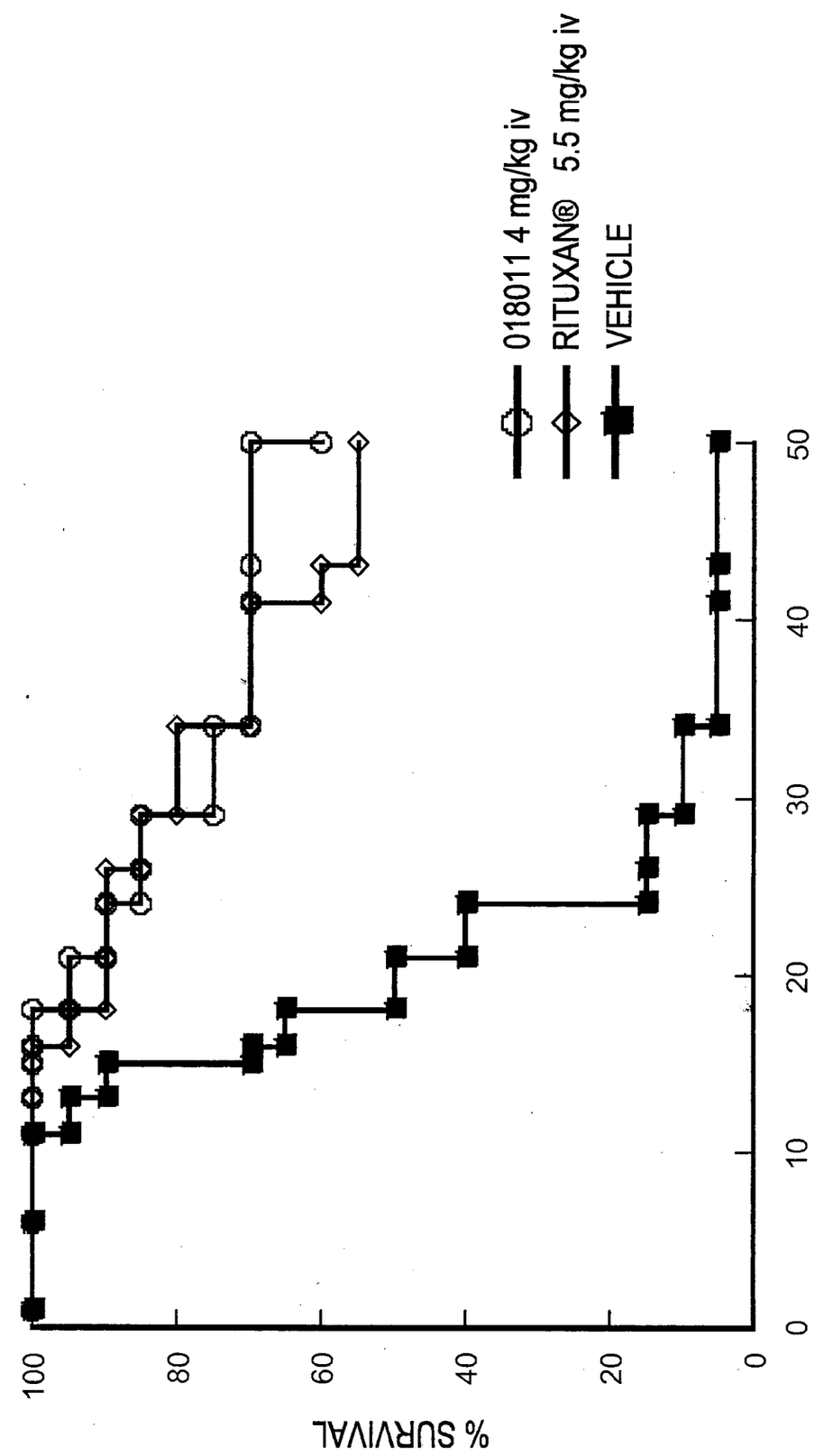

018011 4 mg/kg iv
RITUXAN® 5.5 mg/kg iv
VEHICLE
% SURVIVAL
100
80
60
40
20
0
0
10
20
30
40
50
DAYS

Figure 13

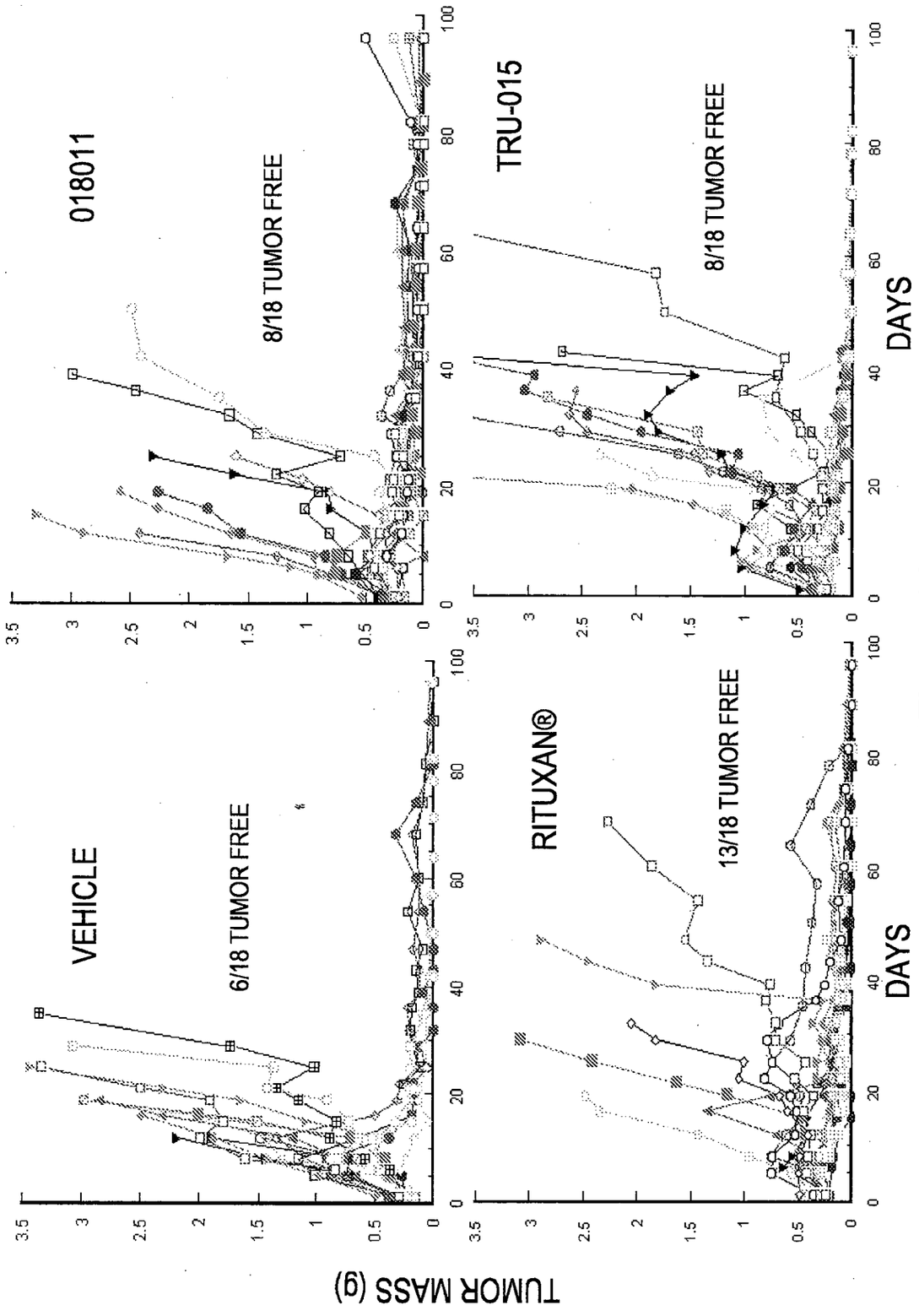

018011
8/18 TUMOR FREE
TRU-015
8/18 TUMOR FREE
VEHICLE
6/18 TUMOR FREE
RITUXAN®
13/18 TUMOR FREE
TUMOR MASS (g)
DAYS
DAYS

Figure 14

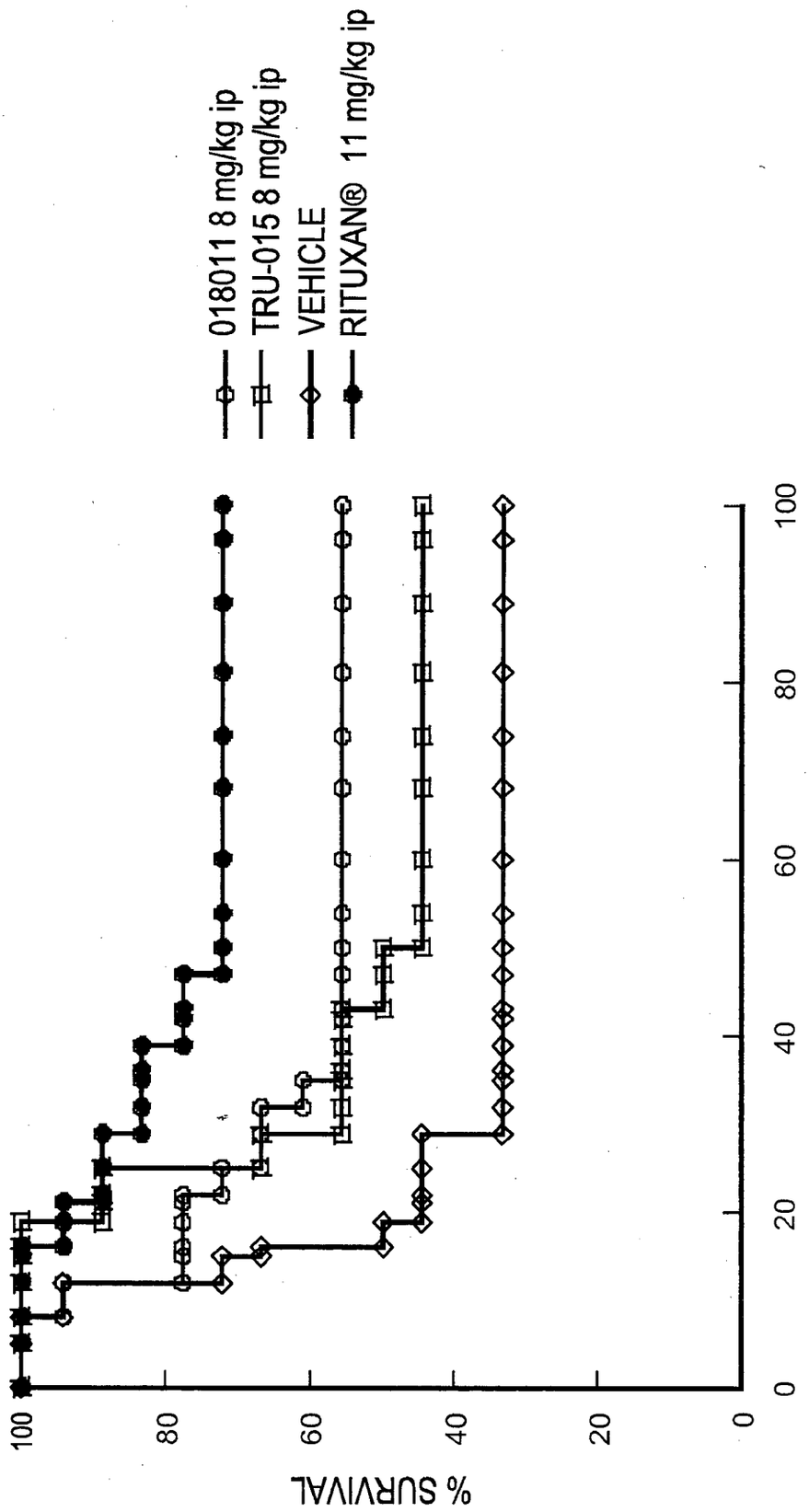

018011 8 mg/kg ip
TRU-015 8 mg/kg ip
VEHICLE
RITUXAN® 11 mg/kg ip
% SURVIVAL
100
80
60
40
20
0
0
20
40
60
80
100
DAYS

Figure 15

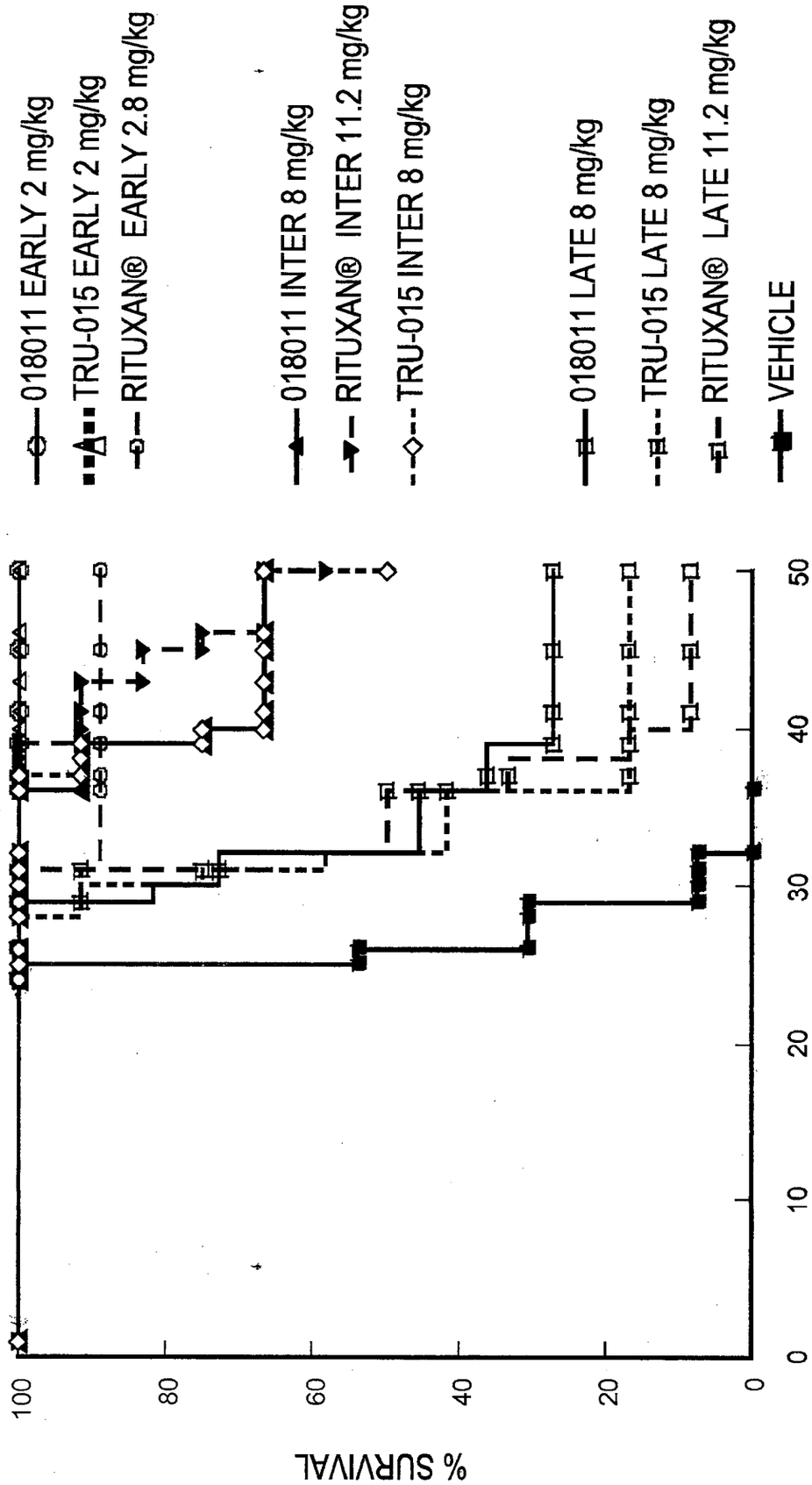

018011 EARLY 2 mg/kg
TRU-015 EARLY 2 mg/kg
RITUXAN® EARLY 2.8 mg/kg
018011 INTER 8 mg/kg
RITUXAN® INTER 11.2 mg/kg
TRU-015 INTER 8 mg/kg
018011 LATE 8 mg/kg
TRU-015 LATE 8 mg/kg
RITUXAN® LATE 11.2 mg/kg
VEHICLE
% SURVIVAL
100
80
60
40
20
0
0
10
20
30
40
50
DAYS

Figure 16

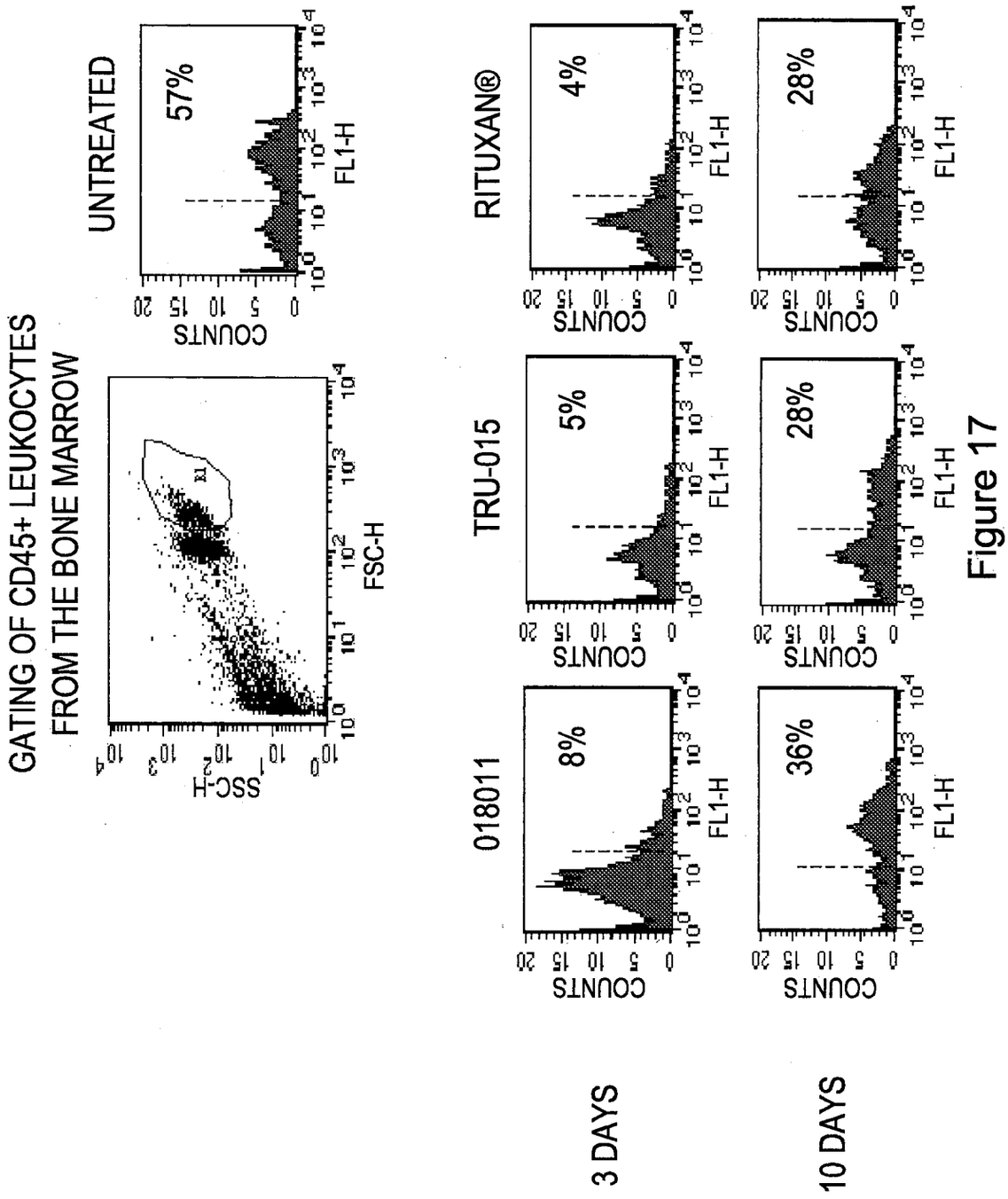

GATING OF CD45+ LEUKOCYTES
FROM THE BONE MARROW
SSC-H
FSC-H
R1
UNTREATED
57%
COUNTS
FL1-H
RITUXAN®
TRU-015
018011
4%
28%
5%
28%
8%
36%
3 DAYS
10 DAYS

Figure 17

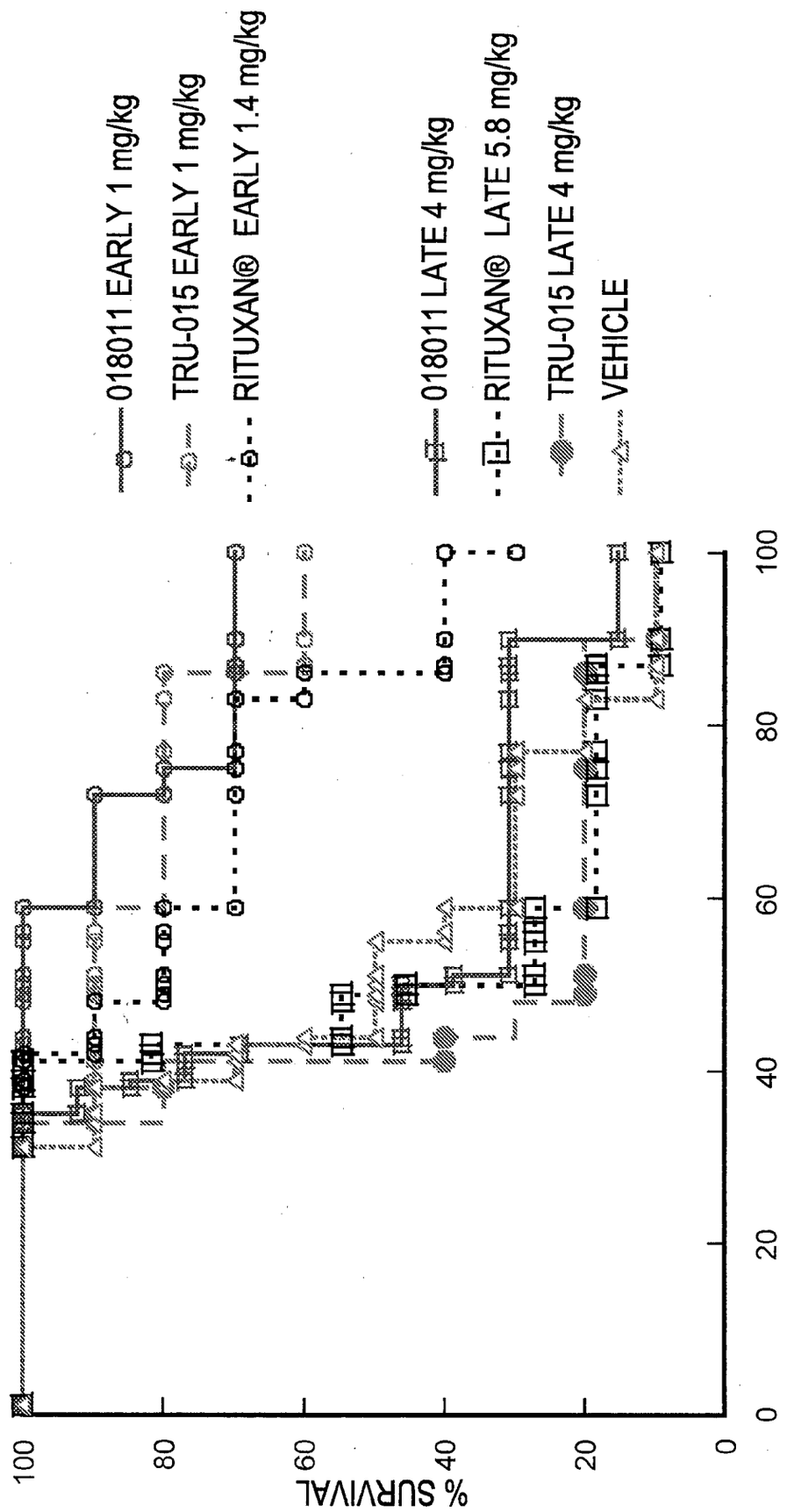

018011 EARLY 1 mg/kg
TRU-015 EARLY 1 mg/kg
RITUXAN® EARLY 1.4 mg/kg
018011 LATE 4 mg/kg
RITUXAN® LATE 5.8 mg/kg
TRU-015 LATE 4 mg/kg
VEHICLE
% SURVIVAL
100
80
60
40
20
0
0
20
40
60
80
100
DAYS

Figure 18

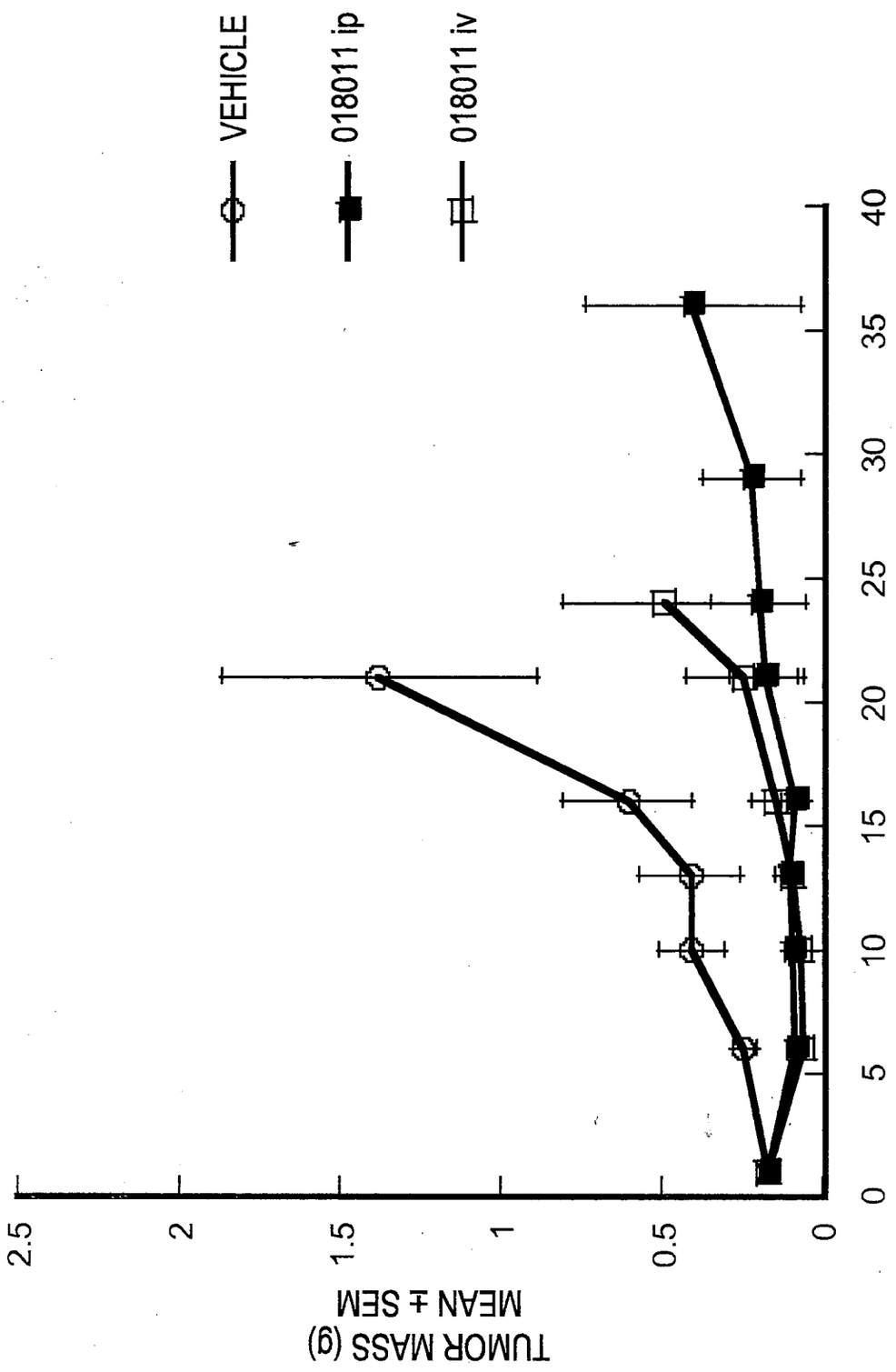

VEHICLE
018011 ip
018011 iv
TUMOR MASS (g)
MEAN ± SEM
2.5
2
1.5
1
0.5
0
0
5
10
15
20
25
30
35
40
DAYS

Figure 19

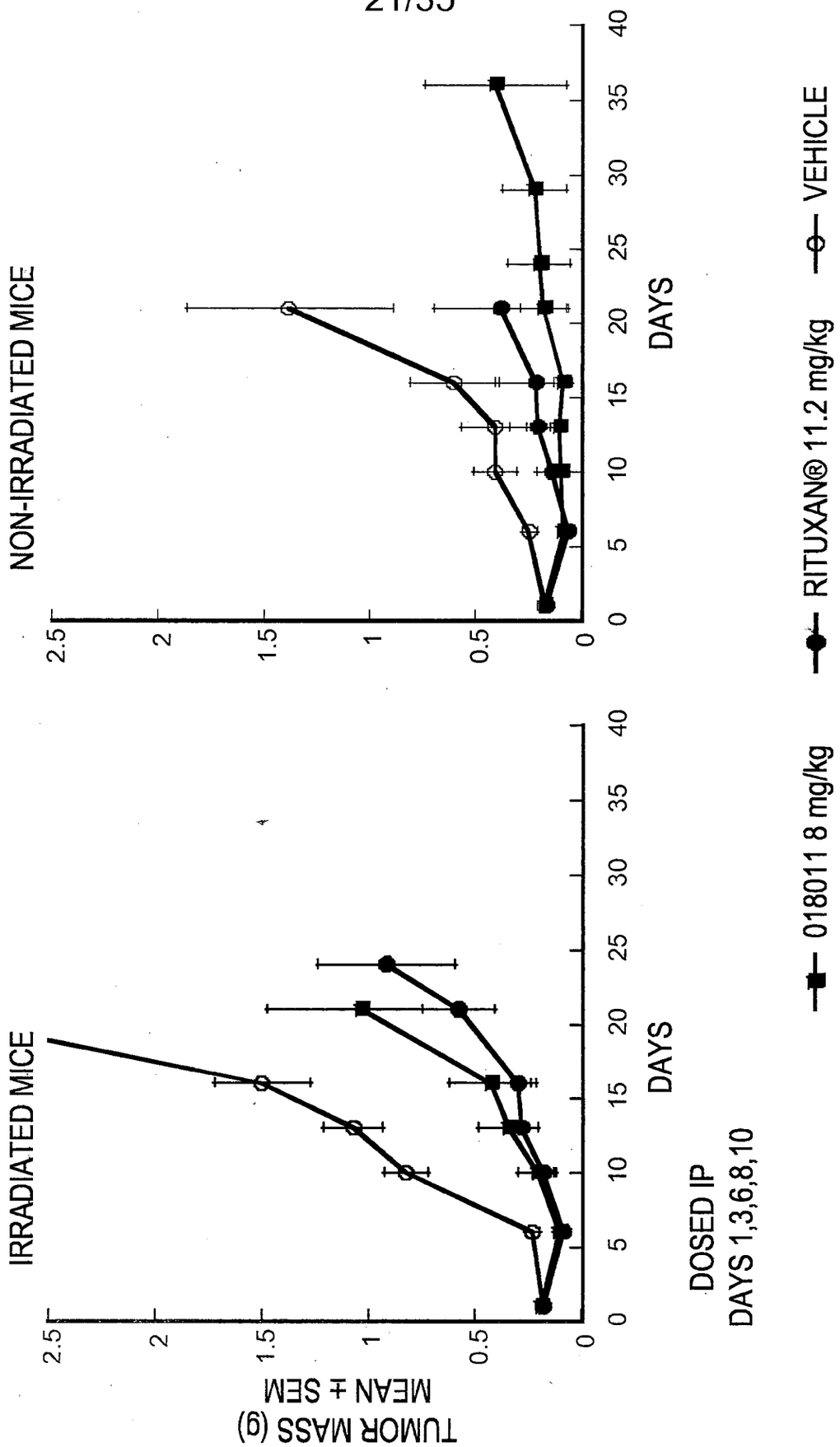

NON-IRRADIATED MICE
IRRADIATED MICE
TUMOR MASS (g)
MEAN ± SEM
DAYS
DOSED IP
DAYS 1,3,6,8,10
018011 8 mg/kg
RITUXAN® 11.2 mg/kg
VEHICLE

Figure 20

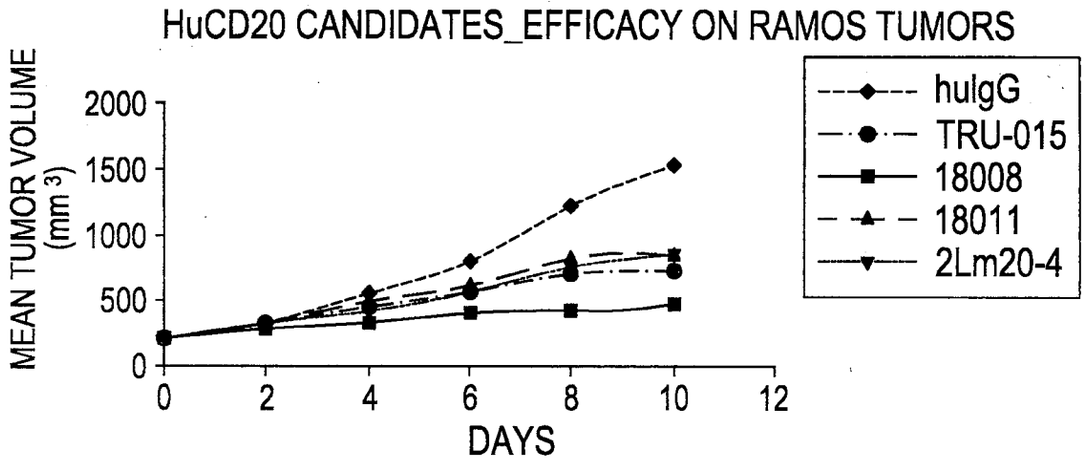


Figure 21A

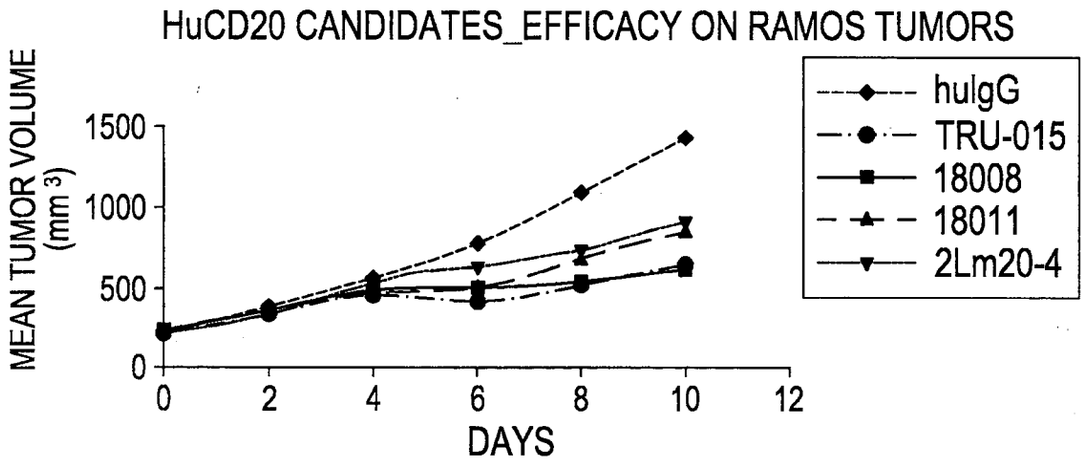


Figure 21B

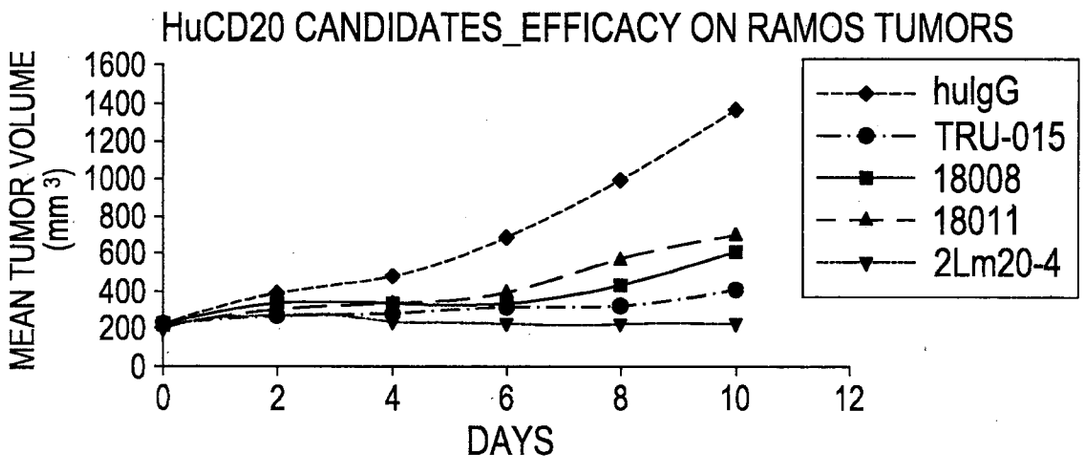


Figure 21C

p Value from Relevant Comparison in One-Way ANOVA with Indicated Post-Test		
	Dunnett's - Comparison with hulgG as Control	Tukey's - Comparison of all groups
HulgG vs TRU-015	**< 0.05**	> 0.05
HulgG vs 18008	**< 0.01**	**< 0.01**
HulgG vs 18011	> 0.05	> 0.05
HulgG vs 2Lm20-4	> 0.05	> 0.05
TRU-015 vs 18008	---	> 0.05
TRU-015 vs 18011	---	> 0.05
TRU-015 vs 2Lm20-4	---	> 0.05
18008 vs 18011	---	> 0.05
18008 vs 2Lm20-4	---	> 0.05
18011 vs 2Lm20-4	---	> 0.05

p Value from Relevant Comparison in One-Way ANOVA with Indicated Post-Test		
	Dunnett's - Comparison with hulgG as Control	Tukey's - Comparison of all groups
HulgG vs TRU-015	**< 0.05**	> 0.05
HulgG vs 18008	**< 0.01**	**< 0.001**
HulgG vs 18011	> 0.05	> 0.05
HulgG vs 2Lm20-4	**< 0.05**	> 0.05
TRU-015 vs 18008	---	> 0.05
TRU-015 vs 18011	---	> 0.05
TRU-015 vs 2Lm20-4	---	> 0.05
18008 vs 18011	---	> 0.05
18008 vs 2Lm20-4	---	> 0.05
18011 vs 2Lm20-4	---	> 0.05

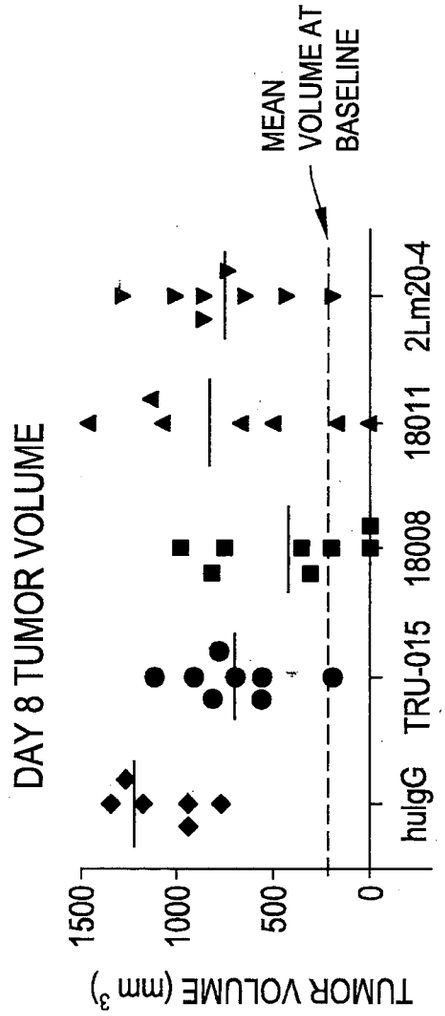
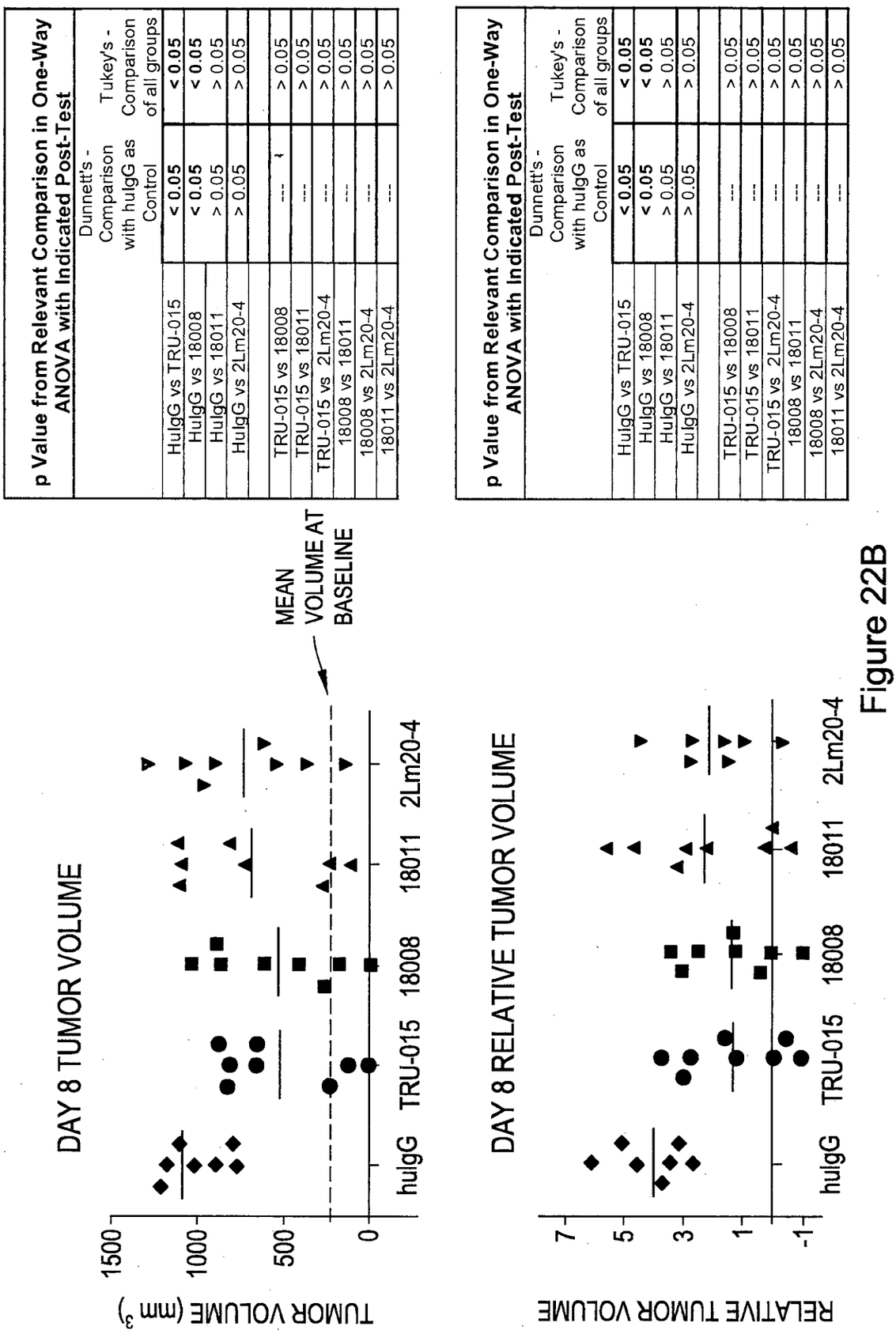


Figure 22A



p Value from Relevant Comparison in One-Way ANOVA with Indicated Post-Test

	Dunnett's - Comparison with hulgG as Control	Tukey's - Comparison of all groups
HulgG vs TRU-015	**< 0.05**	**< 0.05**
HulgG vs 18008	**< 0.05**	**< 0.05**
HulgG vs 18011	> 0.05	> 0.05
HulgG vs 2Lm20-4	> 0.05	> 0.05
TRU-015 vs 18008	---	> 0.05
TRU-015 vs 18011	---	> 0.05
TRU-015 vs 2Lm20-4	---	> 0.05
18008 vs 18011	---	> 0.05
18008 vs 2Lm20-4	---	> 0.05
18011 vs 2Lm20-4	---	> 0.05

p Value from Relevant Comparison in One-Way ANOVA with Indicated Post-Test

	Dunnett's - Comparison with hulgG as Control	Tukey's - Comparison of all groups
HulgG vs TRU-015	**< 0.05**	**< 0.05**
HulgG vs 18008	**< 0.05**	**< 0.05**
HulgG vs 18011	> 0.05	> 0.05
HulgG vs 2Lm20-4	> 0.05	> 0.05
TRU-015 vs 18008	---	> 0.05
TRU-015 vs 18011	---	> 0.05
TRU-015 vs 2Lm20-4	---	> 0.05
18008 vs 18011	---	> 0.05
18008 vs 2Lm20-4	---	> 0.05
18011 vs 2Lm20-4	---	> 0.05

Figure 22B

p Value from Relevant Comparison in One-Way ANOVA with Indicated Post-Test

	Dunnett's - Comparison with hulgG as Control	Tukey's - Comparison of all groups
HulgG vs TRU-015	**P < 0.01**	**P < 0.01**
HulgG vs 18008	**P < 0.01**	**P < 0.05**
HulgG vs 18011	P > 0.05	P > 0.05
HulgG vs 2Lm20-4	**P < 0.01**	**P < 0.001**
TRU-015 vs 18008	---	> 0.05
TRU-015 vs 18011	---	> 0.05
TRU-015 vs 2Lm20-4	---	> 0.05
18008 vs 18011	---	> 0.05
18008 vs 2Lm20-4	---	> 0.05
18011 vs 2Lm20-4	---	> 0.05

p Value from Relevant Comparison in One-Way ANOVA with Indicated Post-Test

	Dunnett's - Comparison with hulgG as Control	Tukey's - Comparison of all groups
HulgG vs TRU-015	**P < 0.01**	**P < 0.01**
HulgG vs 18008	**P < 0.05**	**P < 0.05**
HulgG vs 18011	P > 0.05	P > 0.05
HulgG vs 2Lm20-4	**P < 0.01**	**P < 0.01**
TRU-015 vs 18008	---	> 0.05
TRU-015 vs 18011	---	> 0.05
TRU-015 vs 2Lm20-4	---	> 0.05
18008 vs 18011	---	> 0.05
18008 vs 2Lm20-4	---	> 0.05
18011 vs 2Lm20-4	---	> 0.05

Figure 22C

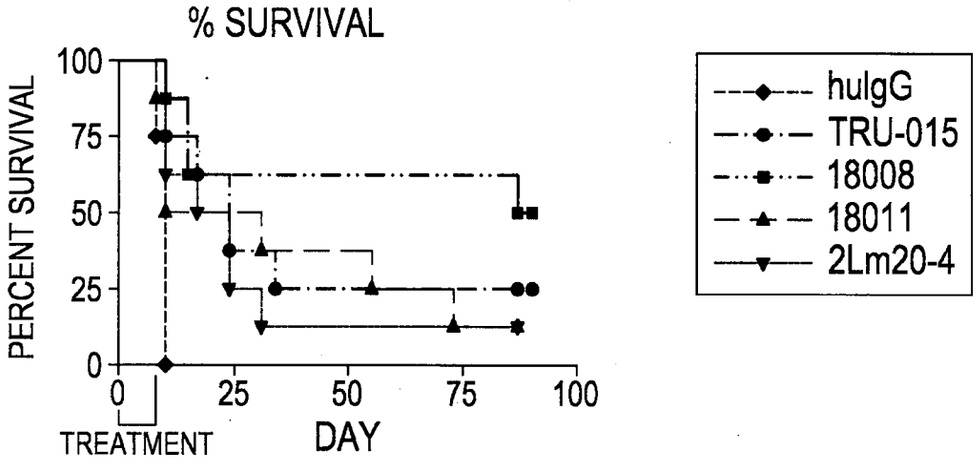


Figure 23A

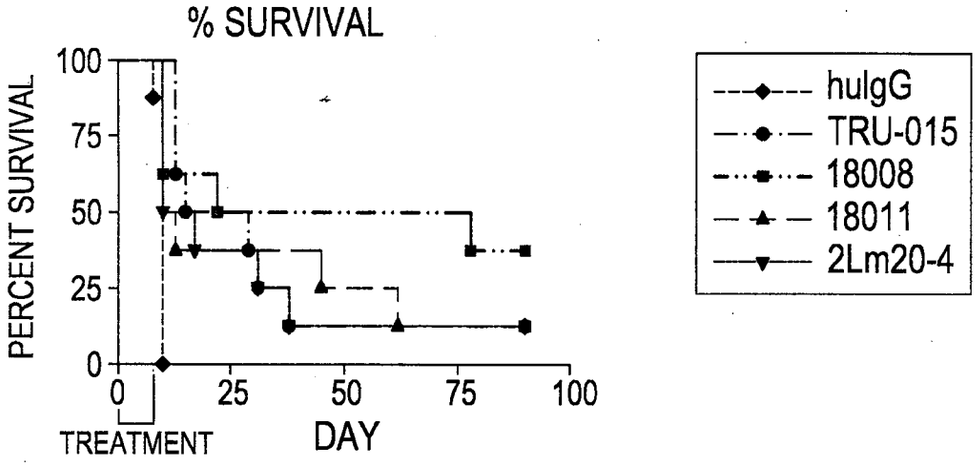


Figure 23B

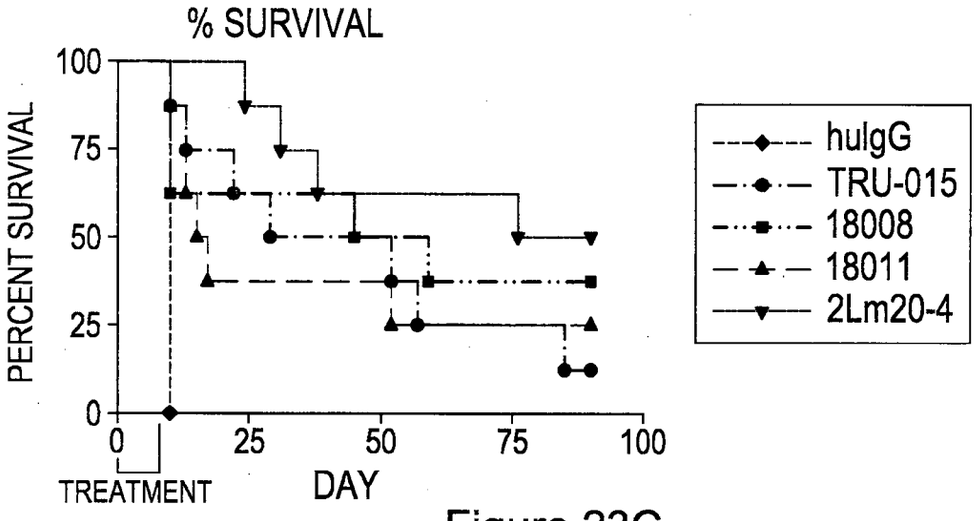


Figure 23C

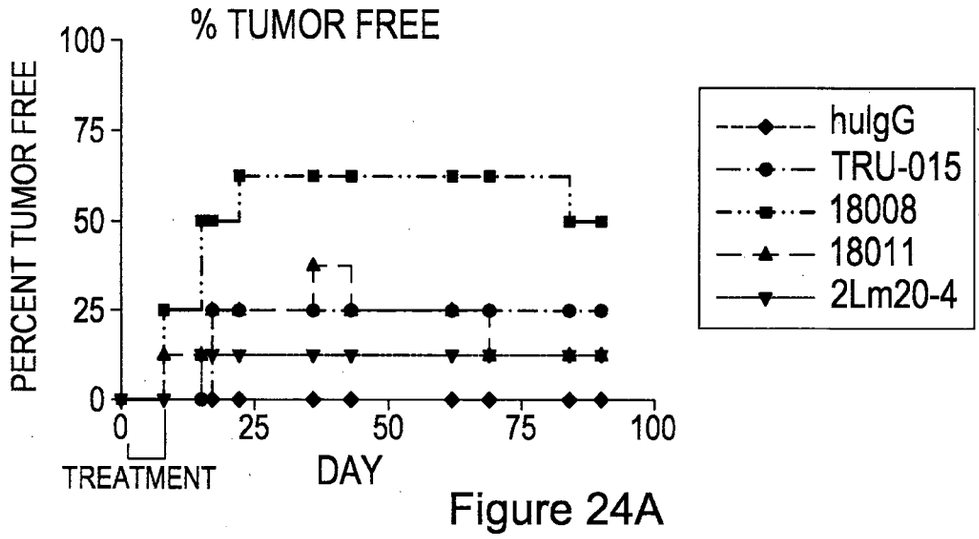


Figure 24A

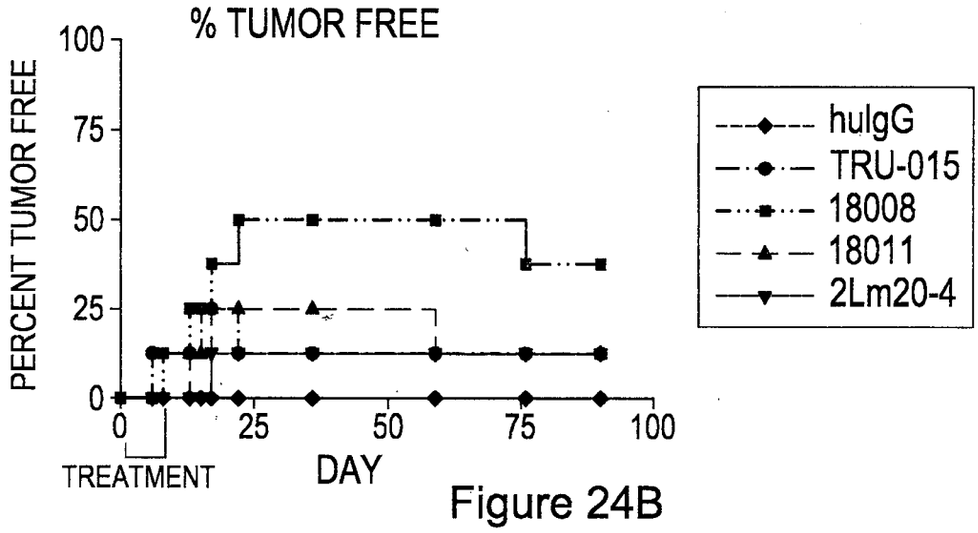


Figure 24B

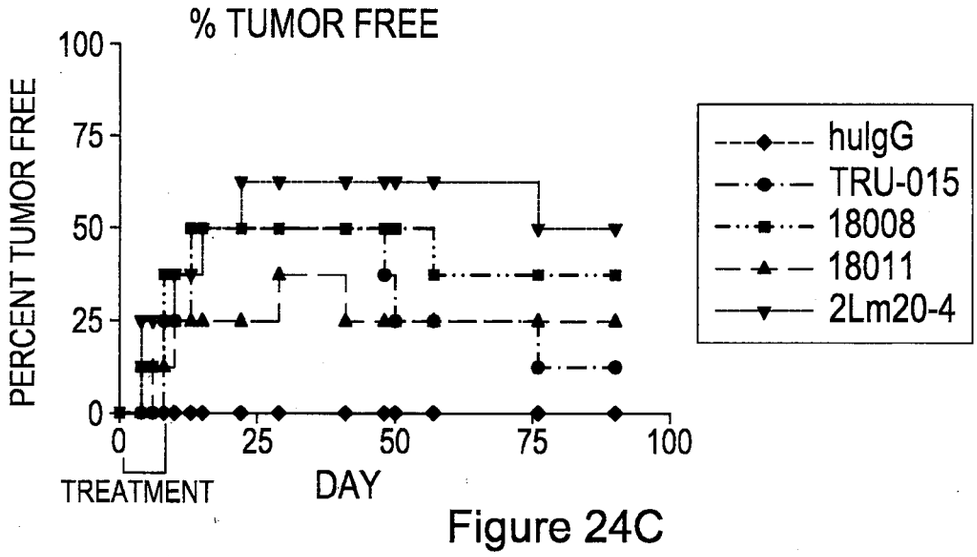


Figure 24C

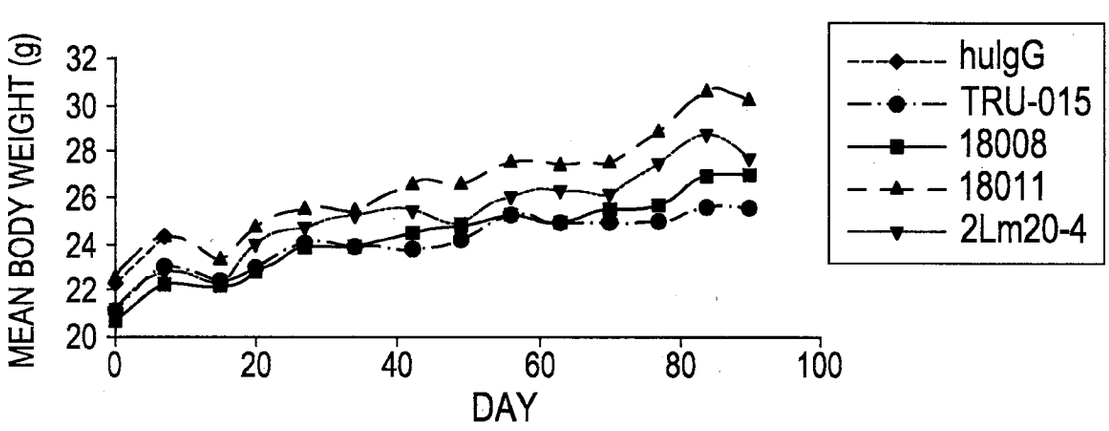


Figure 25A

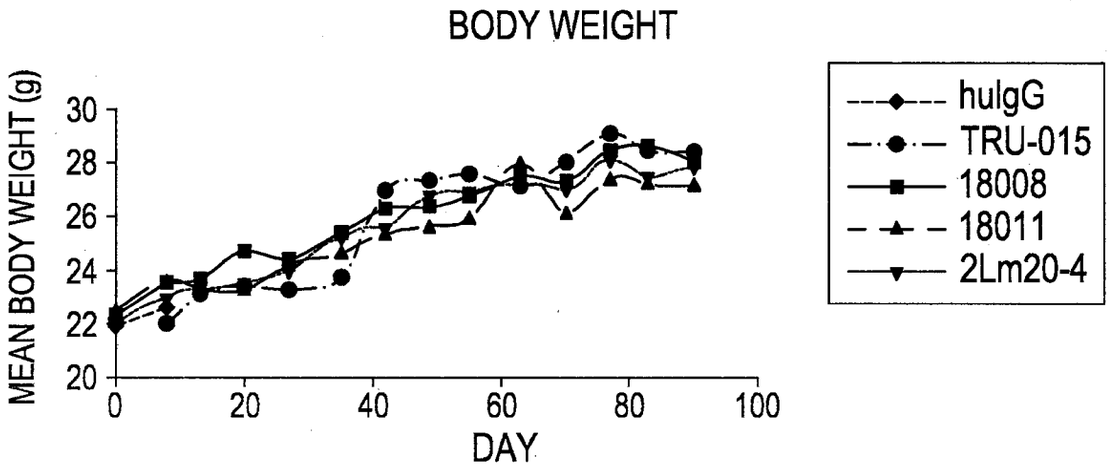


Figure 25B

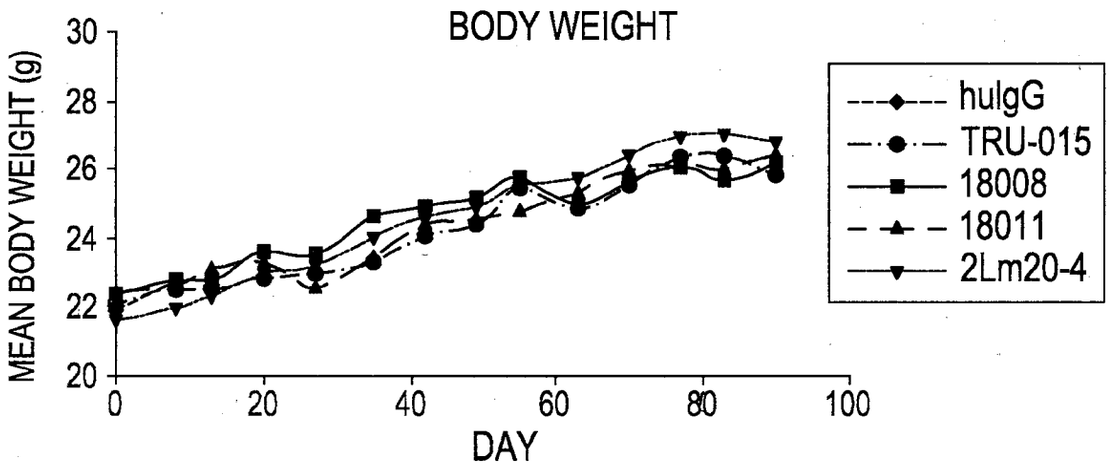


Figure 25C

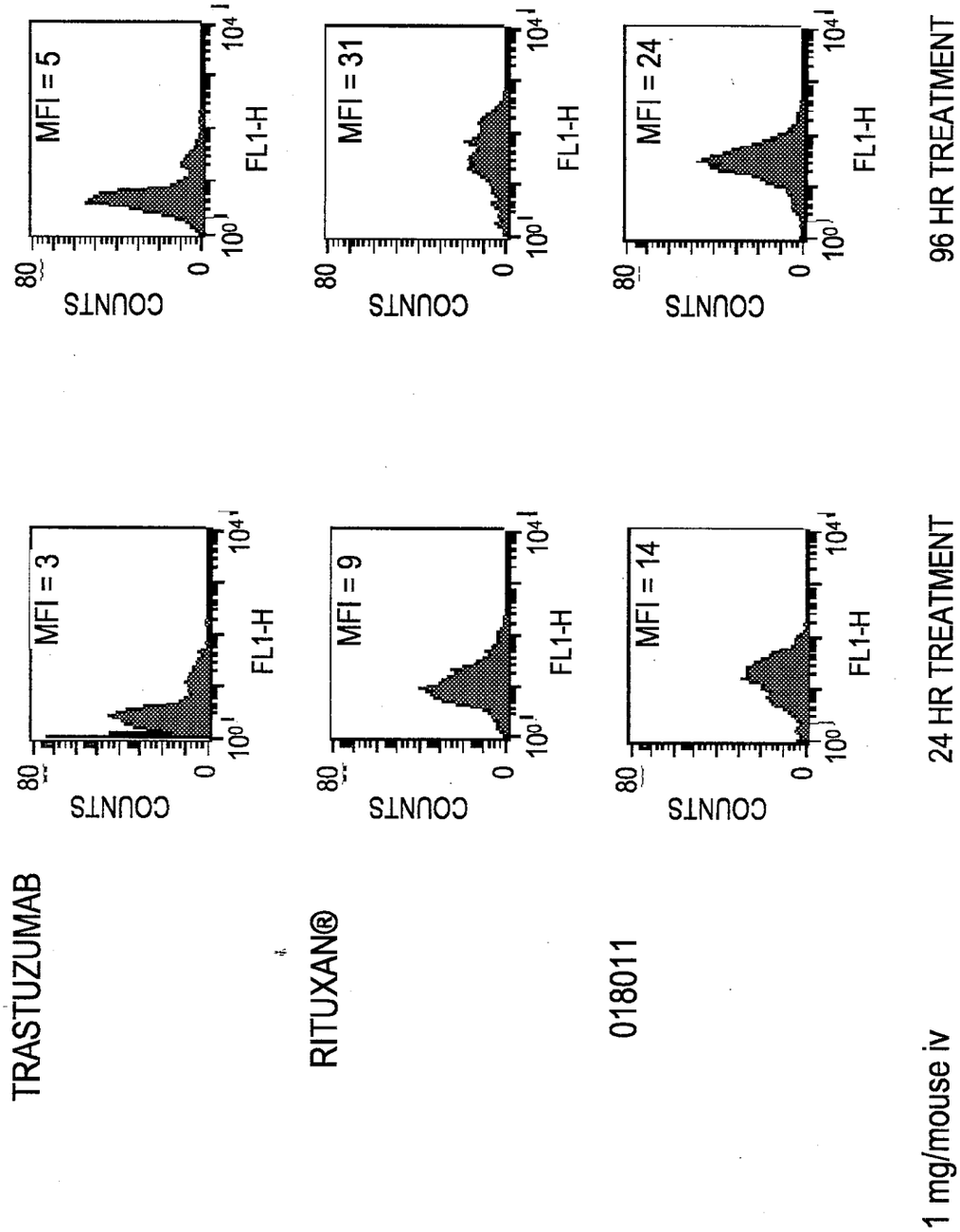

TRASTUZUMAB
RITUXAN®
018011
1 mg/mouse iv
24 HR TREATMENT
96 HR TREATMENT
MFI = 3
MFI = 9
MFI = 14
MFI = 5
MFI = 31
MFI = 24
COUNTS
FL1-H
80
0
10^0
10^4

Figure 26

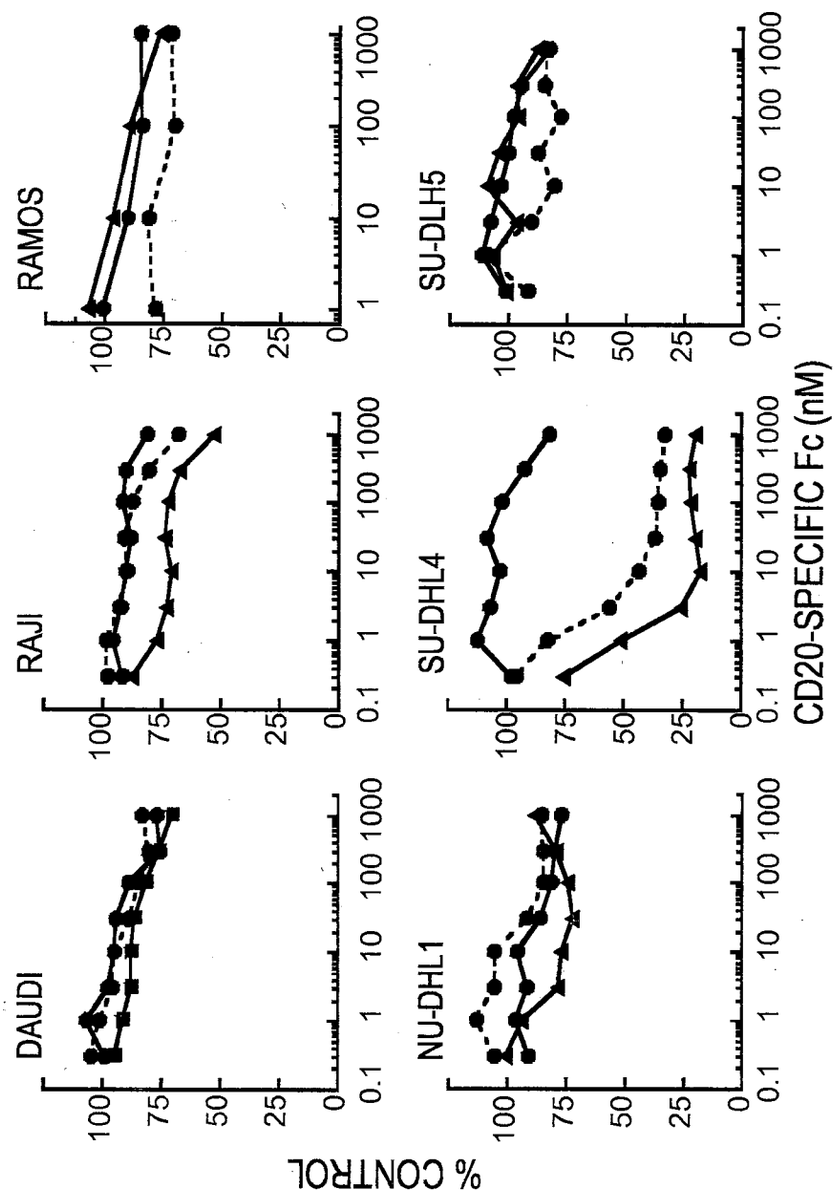

RAMOS
SU-DLH5
RAJI
SU-DHL4
DAUDI
NU-DHL1
% CONTROL
CD20-SPECIFIC Fc (nM)
018011
TRU-015
RITUXAN®

Figure 27

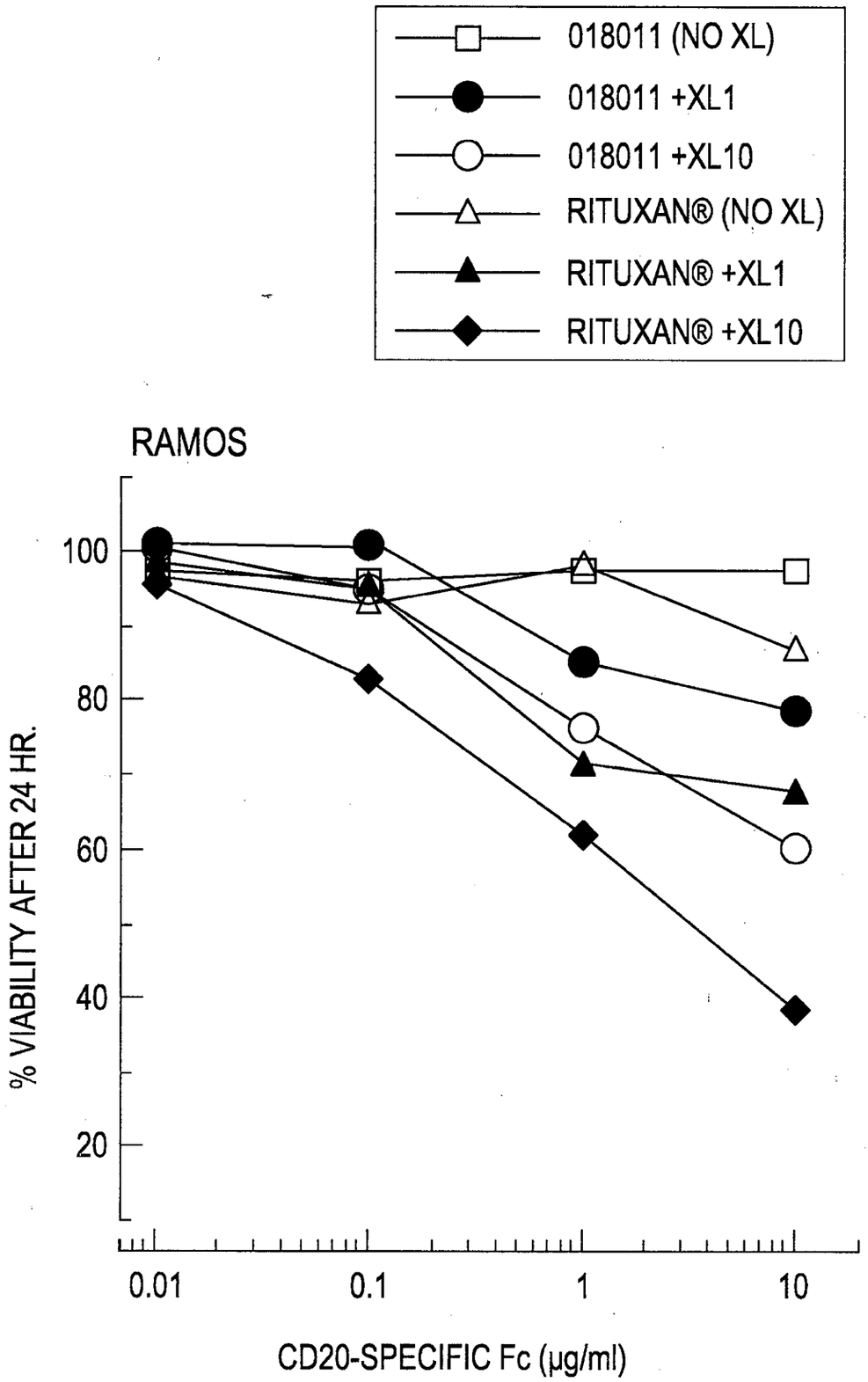

018011 (NO XL)
018011 +XL1
018011 +XL10
RITUXAN® (NO XL)
RITUXAN® +XL1
RITUXAN® +XL10
RAMOS
% VIABILITY AFTER 24 HR.
100
80
60
40
20
0.01
0.1
1
10
CD20-SPECIFIC Fc (µg/ml)

Figure 28

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

HUMANIZED ANTI-CD20 SMIP SUMMARY

Designation	Variable			FW	Hinge[1]	IgG1 Fc
018008	hVK3	S27Q	–	–	C,S,C,S	-
	hVH5	T28S	V102L	–		
					C,S,C,S	P331S
					S,C,C,S	-
					S,C,C,P	-
018009	hVK3	S27Q	–	–	C,S,C,S	-
	hVH5	T28S[1]	V95Δ V96S V102L	–		
					C,S,C,S	P331S
					S,C,C,S	-
					S,C,C,P	-
					S,C,C,P	P331S
018010	hVK3	S27Q M33I H34V	–	–	C,S,C,S	-
	hVH5	T28S[1]	V102L	–		
					C,S,C,S	P331S
					S,C,C,S	-

[1] Hinge positions in wild-type: C220, C226, C229, and P230.

Figure 29 (part 1)

FIG 1

Designation	Variable			FW	Hinge[1]	IgG1 Fc
018011	hVK3	S27Q M33I H34V	–	–	C,S,C,S	-
	hVH5	T28S[1]	V95Δ V96S V102L	–		
					S,C,C,S	-
					S,C,C,P	-
					S,C,C,P	P331S
018014	mVK	–	–	–	C,S,C,S	-
	hVH5	T28S[1]	V102L	–		
					C,S,C,S	P331S
					S,C,C,S	-
					S,C,C,P	-
018015	mVK	–	–	–	C,S,C,S	-
	hVH5	T28S[1]	V95Δ V96S V102L	–		
					C,S,C,S	P331S
					S,C,C,S	-
					S,C,C,P	-

Figure 29 (part 2)

Designation	Variable			FW	Hinge[1]	IgG1 Fc
2Lm5	hVK3	S27Q	–	–	C,S,S,S	-
	hVH3	Y27F[1] T30S[1]	V95Δ V96S V102L	–		
2Lm5-1	hVK3	S27Q	–	–	C,S,S,S	-
	hVH1	–	V95Δ V96S V102L	L11S		
2Lm6-1	hVK3	S27Q	S92T F93S	–	C,S,S,S	-
	hVH1	–	V95Δ V96S V102L	L11S		
2Lm16	hVK3	–	–	–	C,S,C,S	-
	hVH1	–	V95Δ V96S V102L	L11S		
					C,S,C,S	P331S
					S,C,C,S	-
					S,C,C,S	P331S
					S,C,C,P	-
					S,C,C,P	P331S

Figure 29 (part 3)

Designation	Variable			FW	Hinge[1]	IgG1 Fc
2Lm16-1	hVK3	S27Q	S92T F93S	–	C,S,S,S	-
	hVH1	–	V95Δ V96S V102L	L11S		
2Lm19-3	hVK3	S27Q M33I H34V	–	–	C,S,C,S	-
	hVH1	–	V95Δ V96S V102L	L11S		
					C,S,C,S	P331S
					S,C,C,S	-
					S,C,C,P	-
					S,C,C,P	P331S
2Lm20-4	hVK3	M33I H34V	–	–	C,S,C,S	-
	hVH1	–	V95Δ V96S V102L	L11S		
					C,S,C,S	P331S
					S,C,C,S	-
					S,C,C,P	-
					S,C,C,P	P331S

Figure 29 (part 4)

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

COMPOSICIONES Y MÉTODOS TERAPÉUTICOS ANTI-CD20

CAMPO DE LA INVENCIÓN

[0001] La invención proporciona materiales y métodos para el tratamiento de enfermedades que involucran actividad de células B aberrantes, que utiliza una molécula de unión específica CD20. Las composiciones descritas aquí son útiles para el tratamiento y diagnóstico de trastornos de célula B, tal como malignidades de células B y enfermedades autoinmunes.

INFORMACIÓN ANTECEDENTE

[0002] En su papel usual, el sistema inmune humano protege al cuerpo del daño de sustancias externas y patógenos. Una forma en la que el sistema inmune protege al cuerpo es mediante la producción de células especializadas llamadas linfocitos B o células B. Las células B producen anticuerpos que se unen a, y en algunos casos median la destrucción de, una sustancia externa o patógeno.

[0003] Aunque en algunos casos, el sistema inmune humano, y específicamente los linfocitos B del sistema inmune humano, va mal y resulta en enfermedad. Existen numerosos cánceres que involucran proliferación no controlada de células B. Existen también numerosas enfermedades autoinmunes que involucran la producción de células B de anticuerpos que, en lugar de unirse a sustancias externas y patógenos, se une a partes del cuerpo. Adicionalmente, existen numerosas enfermedades inflamatorias y autoinmunes que involucran células B en su patología, por ejemplo, a través de la presentación de antígeno de células B inapropiada para células T o a través de otras rutas que involucran células B. Por

ejemplo, ratones propensos a autoinmunogenicidad deficientes en células B que no desarrollan enfermedad autoinmune del riñón, vasculitis o autoanticuerpos. (Shlomchik et al., J Exp. Med. 1994, 180:1295-306). De forma interesante, estos ratones propensos a autoinmunogenicidad que poseen células B pero que son deficientes en producción de inmunoglobulina, desarrollan enfermedades autoinmunes cuando se inducen experimentalmente (Chan et al., J Exp. Med. 1999, 189:1639-48), lo que indica que las células B juegan un papel integral en el desarrollo de la enfermedad autoinmune.

[0004] Las células B se pueden identificar mediante moléculas en su superficie celular. El CD20 es la primera molécula de superficie específica de linaje de células B humanas identificadas por un anticuerpo monoclonal. Esta es una fosfoproteína de transmembrana de células B de 35 kDa hidrófoba, no glucosilada que tiene sus extremos amino y carboxi situados dentro de la célula. Einfeld et al., EMBO J. 1988, 7:711-17. El CD20 se expresa mediante todas las células B maduras normales, pero no se expresa mediante células B precursoras o células de plasma. Los ligandos naturales para CD20 no se han identificado, y la función de CD20 en Biología de células B se entiende aún incompletamente.

[0005] Ciertos anticuerpos monoclonales anti-CD20 pueden afectar la viabilidad y el crecimiento de células B. (Clark et al, Proc. Natl Acad. Sci. USA 1986, 83:4494-98). La reticulación extensiva de CD20 puede inducir apoptosis en Estirpes celulares de linfoma B (Shan et al., Blood 1998, 91:1644-52), y la reticulación de CD20 en la superficie celular se ha reportado por incrementar la magnitud y mejoramiento de las cinéticas de transducción de señal, por ejemplo, como se detecta al medir la fosforilación tirosina de los sustratos celulares. (Deans et al., J. Immunol. 1993, 146:846-53). Por lo tanto, adicionalmente para agotamiento celular

mediante mecanismos ADCC y complementarios, La unión del receptor Fc mediante ciertos Anticuerpos monoclonales CD20 in vivo puede promover apoptosis de células B malignas mediante la reticulación de CD20, consistente con la teoría que la efectividad de la terapia CD20 de linfoma humano en un Modelo de ratón SCID puede depender de la unión del receptor Fc mediante el anticuerpo monoclonal CD20 (Funakoshi et al., J. Immunotherapy 1996, 19:93-101). La presencia de múltiples dominios de expansión de membrana en el polipéptido CD20 (Einfeld et al., EMBO J. 1988, 7:711-17; Stamenkovic et al, J.Exp. Med. 1988, 167:1975-80; Tedder et al., J. Immunol. 1988, 141:4388-4394), evita la internalización de CD20 después de la unión de anticuerpo, y esto se reconoce como una característica importante para la terapia de malignidades de células B cuando un anticuerpo monoclonal CD20 de murino, 1F5, se inyecta en pacientes con linfoma de célula B, lo que resulta en agotamiento significativo de células malignas y respuestas clínicas parciales (Press et al., Blood 1987, 69:584-91).

[0006] Debido a que las células B maduras normales también expresan CD20, las células B normales se agotan mediante terapia de anticuerpo anti-CD20 (Reff et al., Blood 1994, 83:435-445). Después de que se completa el tratamiento, sin embargo, las células B normales se pueden regenerar de Precursores de células B negativos CD20; por lo tanto, los pacientes tratados con terapia anti-CD20 no experimentan inmunosupresión significativa.

[0007] El CD20 se expresa mediante células malignas de origen de células B, que incluyen linfoma de células B y leucemia linfocítica crónica (CLL). El CD20 no se expresa mediante malignidades de células pre-B, tal como leucemia linfoblástica aguda. El CD20 es por lo tanto un buen objetivo para la terapia de linfoma de célula B, CLL, y otras enfermedades en las que las células B se involucran en la

etiología de la enfermedad. Otros trastornos de células B incluyen enfermedades autoinmunes en las que se producen autoanticuerpos durante la diferenciación de células B en células de plasma.

[0008] El uso de moléculas objetivo de anticuerpos monoclonales (mAb) que se expresan preferencialmente en la superficie de una célula de tumor es ahora una estrategia terapéutica bien establecida, con por lo menos 7 distintos terapéuticos mAb aprobados y que se utilizan actualmente en terapia de cáncer: Rituxan® (RITUXAN), trastuzumab, alemtuzumab, cetuximab, panitumumab, bevacizumab y gemtuzumab ozogamicina. Tales terapéuticos mAb median su actividad antineoplásica por vía de dos mecanismos distintos. El primer mecanismo involucra la inhibición mediada por mAb de las interacciones del receptor clave-ligando/contra-receptor que contribuyen al crecimiento del tumor y el segundo mecanismo depende de la participación de los componentes efectores del sistema inmune del anfitrión tal como células efectoras FcR+ capaces de mediar la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC) y factores humorales tal como complemento capaz de mediar la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC). En el último caso, el terapéutico mAb puede poseer la capacidad de interactuar con los FcγR en células efectoras y complemento. Con la excepción de Panitumumab objetivado por EGFR, cada uno de los cinco mAb inmunoterapéutico que se utiliza en terapia de cáncer posee la capacidad de vincular los componentes efectores del sistema inmune.

[0009] RITUXAN es el primer mAb en ser aprobado para uso clínico en cáncer. RITUXAN es un mAb quimérico IgG1 humano de ratón recombinante en el que los dominios de variable de las cadenas liviana y pesada de un mAb anti-CD20 de murino se fusionan a las regiones constantes humanas de IgG1.

[0010] Adicionalmente, el CD20 también se ha objetivado mediante agentes radioinmunoterapéuticos para tratar enfermedades relacionadas con célula B. Un tratamiento consiste de anticuerpos anti-CD20 preparados en la forma de radionúclidos para tratar linfoma de células B (por ejemplo, anticuerpo anti-CD20 marcado ^{131}I), así como también una forma marcada Sr para la paliación de dolor óseo originado por metástasis de cáncer de próstata y mama (Endo, Gan To Kagaku Ryoho 1999, 26: 744-748).

[0011] En un estudio, se prueba RITUXAN para seguridad, tolerabilidad y eficacia clínica preliminar para el tratamiento de 18 pacientes con Lupus Eritematoso Sistémico (SLE) (quienes no son pacientes inmunosuprimidos). De los 18 pacientes tratados, seis pacientes reciben una infusión de RITUXAN a 100 mg/m^2 (dosis baja), seis pacientes reciben una infusión de RITUXAN a 375 mg/m^2 (dosis media), y seis pacientes reciben cuatro infusiones semanales de RITUXAN a 375 mg/m^2 (dosis alta). Aún en la dosificación media o baja, tres de los 12 pacientes (25%) desarrollan niveles elevados de anticuerpos anti-quimera humanos (HACA) en dos meses.

[0012] De acuerdo con lo anterior, existe una necesidad de desarrollar moléculas de unión específica a CD20 novedosas para terapia, preferiblemente, moléculas de unión específica a CD20 novedosas que no originan, o tienen un potencial reducido para originar, una reacción HACA cuando se administra a los pacientes quienes no son inmunosuprimidos. Adicionalmente, aunque se ha llevado a cabo la búsqueda extensiva en terapias con base en anticuerpo, subsiste una necesidad en la técnica de composiciones y métodos para tratar enfermedades asociadas con la actividad aberrante de células B.

RESUMEN DE LA INVENCIÓN

[0013] La invención se relaciona con moléculas de unión CD20 novedosas que son útiles en el diagnóstico y tratamiento de enfermedades mediadas de células B y afecciones en un sujeto en necesidad de este que incluye pero no se limita a cánceres de célula B, artritis reumatoide y lupus eritematoso. En varias modalidades, la invención proporciona secuencias CDR de cadena pesada novedosas, secuencias CDR de cadena liviana, secuencia de dominio de variable novedosa que comprende las secuencias CDR y las moléculas de unión CD20 que comprenden un CDR novedoso o una secuencia de dominio variable, ácidos nucleicos, vectores, células anfitrionas, composiciones y equipos que comprenden los CDR, dominios de unión o moléculas que los comprenden. En algunas modalidades, las moléculas de unión CD20 que comprenden una secuencia CDR novedosa o dominio variable es un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo. En otras modalidades, la molécula de unión CD20 es un SMIP inmunofarmacéutico modular pequeño. En algunas modalidades, el anticuerpo o SMIP es humanizado y comprende la estructura de secuencia humana y las secuencias de región constante. Las moléculas de unión CD20 de la invención que se unen al CD20 en la célula, muestran actividad CDC y ADCC, agotamiento de la célula CD 19+ B en la sangre, médula ósea y ganglios linfáticos, reduce el crecimiento de tumor de linfoma de célula B, y/o reduce la progresión y efectos de linfoma diseminado. Las moléculas de unión CD20 de la invención también son útiles para detectar y cuantificar la presencia de CD20 o células que lo expresan, por ejemplo en una muestra biológica de un sujeto.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0014] Figura 1. Unión de SMIP anti-CD20 a células B primarias. Las células B primarias aisladas de cubierta amarilla se incuban con la concentración indicada de una variedad de SMIP anti- CD20, como se especifica. La unión de SMIP se analiza mediante citometría de flujo (MFI) utilizando anticuerpo IgG-PE antihumano marcado (Fc específico). El Ec50 de cada SMIP se calcula de acuerdo con lo anterior.

[0015] Figura 2. Efecto Inhibidor de Crecimiento In Vitro de 018011 (también denominado como 18011 o 011, que son la molécula idéntica) contra Linfomas de células B humanas.

[0016] Figura 3A-3B. Ensayo de Citotoxicidad dependiente de Complemento de SMIP anti-CD20. A: Células B ramos se incuban con SMIP anti-CD20 en la presencia de 10% de suero humano (Quidel) durante 3.5 horas a 37°C. La muerte celular se mide mediante la liberación de LDH de las células (Equipo Promega). B: células B humanas primarias ($5X10^5$) aisladas de cubierta amarilla se preincuban con anticuerpo CD55 antihumano (2 µg/ml) durante 10 min a 37° C. Luego se agregan el SMIP anti-CD20 en la concentración indicada y suero (10%). Después de 3.5-horas de incubación, la muerte celular se evalúa mediante teñido 7-AAD y análisis de citometría de flujo.

[0017] Figura 4A-4B. Estos estudios in vitro demuestran que el 018011 une en una forma dependiente de dosis a células de linfoma de células B CD20+ y es capaz de llevar la citotoxicidad celular mediada por Fc así como también la citotoxicidad dependiente del complemento contra células objetivo de linfoma de células B CD20+. Esta demostración de la capacidad funcional efectora puede ser

importante para la capacidad de 018011 de inhibir el crecimiento de linfoma de células B humanas. A. La citotoxicidad dependiente del complemento de 018011 contra células de linfoma de células B SU-DHL4. B. La citotoxicidad dependiente del complemento de 01801 1 Contra células de linfoma de célula BJAB.

[0018] Figura 5. Ensayo de citotoxicidad dependiente de anticuerpo SMIP anti-CD20. Las células de linfoma BJAB se marcan con CFSE, luego se incuban con SMIP y PBMC humano activado. Las células se tiñen con PI y se analizan mediante citometría de flujo. Solo las células $CFSE^{+}$ se evalúan para muerte celular.

[0019] Figura 6A-6B. A. Citotoxicidad Celular mediada por Fc de 018011 contra linfoma de células B SU- DHL4. B. Citotoxicidad Celular mediada por Fc de 018011 contra Linfoma de células B Ramos.

[0020] Figura 7. ADCC de CD20-SMIP contra Células B ramos.

[0021] Figura 8. Agotamiento de células B CD19+B periféricas en primate no humano. El 2LM 20-4 y 2LM 20-4 mut Fc demuestran agotamiento efectivo de células B CD19+B periféricas en primate no humano que es comparable por lo menos con Rituxan.

[0022] Figura 9. Agotamiento de médula ósea de células CD 19+ B en primate no humano. El 2LM 20-4 y 2LM 20-4 mut Fc demuestran agotamiento efectivo de médula ósea de células CD 19+ B en primate no humano que es comparable por lo menos con Rituxan.

[0023] Figura 10. Agotamiento de Ganglio linfático de células CD 19+ B en primate no humano. El 2LM 20-4 y 2LM 20-4 mut Fc demuestran agotamiento efectivo de ganglio linfático de células CD 19+ B en primate no humano que es por lo menos comparable con Rituxan.

[0024] Figura 11. Análisis Farmacocinético (PK) de 2LM 20-4 y 2LM 20-4 Fc mut en macacos después de administración IV. Los perfiles PK de 2LM 20-4 y 2LM 20-4 Fc mut son comparables con los de Rituxan.

[0025] Figura 12. Efecto de 018011 y Rituximab en Xenoinjertos Subcutáneos Ramos Establecidos en Ratones sin Pelo Balb/c.

[0026] Figura 13. Análisis de Supervivencia de 018011 y Rituximab en Xenoinjertos Subcutáneos Ramos Establecidos en Ratones sin Pelo Balb/c.

[0027] Figura 14. Efecto de 018011, TRU-015 y Rituximab en Xenoinjertos Subcutáneos Ramos Establecidos en Ratones sin Pelo nu/nu.

[0028] Figura 15. Análisis de Supervivencia de 018011, TRU-015 y Rituximab en Xenoinjertos Subcutáneos Ramos Establecidos en Ratones sin Pelo nu/nu.

[0029] Figura 16. Análisis de Supervivencia de 018011, TRU-015- y Ratones Scid tratados con Rituximab con Linfoma de Células B Ramos Diseminada.

[0030] Figura 17. Detección de Células de Linfoma B humano en Médula ósea de Ratones Scid con Enfermedad Diseminada.

[0031] Figura 18. Análisis de Supervivencia de 018011-, TRU-015-, y Ratones Scid tratados con Rituximab con Linfoma de Célula Grande Difusa WSU-DLCL2 Diseminada.

[0032] Figura 19. Efecto de 018011 Administrado Intravenosamente o Intraperitonealmente en el crecimiento de Xenoinjertos Subcutáneos Ramos.

[0033] Figura 20. Efecto de 018011 y Rituximab en Xenoinjertos Subcutáneos Ramos irradiados y no irradiados.

[0034] Figura 21 A-21C. Volúmenes de Tumor Medios Durante el Tiempo. En el día de estudio 0, se clasifican ratones sin pelo que llevan tumores palpables Ramos en los grupos de tratamiento (n=8/grupo) de tal manera que el volumen de tumor medio para cada grupo es equivalente. Los ratones se tratan IV en los días 0, 2, 4, 6, y 8 con 100 µg de IgG humano, TRU-015, 018008 (también denominado como 18008 o 008, que son la molécula idéntica), 018011, o 2Lm20-4. Los tumores se miden en los días indicados con un calibrador y el volumen de tumor se calcula utilizando la Fórmula: $V = \frac{1}{2}$ [largo x $(\text{ancho})^2$]. Una vez se seca del estudio un animal debido a que el volumen de tumor excede los límites específicos, se arrastra el valor para el volumen de tumor final. Los resultados se muestran solo a través del día 10, cuando se sacrifican los últimos ratones de control.

[0035] Figura 22A-22C. El volumen de los tumores de los ratones individuales en un Punto de Tiempo Temprano. Los ratones se tratan y se monitorean, y el volumen de los tumores se determina como se describe en la leyenda de la Figura 21. Los resultados se muestran en términos de volumen de tumor de los ratones

individuales en el día 8 (el último punto de tiempo en el que todos los ratones estaban vivos) (i) o con relación al volumen de tumor de los ratones individuales en el día 8 con relación al día 0 (ii). Las diferencias significativas entre los grupos se determinan utilizando un ANOVA de una vía con post-prueba de comparación múltiple de Dunnett (para comparación con controles tratados hulgG) y Post-prueba de comparación múltiple de Tukey (para todas las otras comparaciones en forma de pares); se indican los valores p para todas las comparaciones en forma de pares.

[0036] Figura 23A-23C. Porcentajes de Supervivencia de ratones Tratados con TRU-015 o HuCD20 SMIP. Los ratones se tratan y se monitorean, y el volumen de los tumores se determina como se describe en la leyenda de Figura 21. El volumen de los tumores se determina por lo menos 3 veces a la semana (M W F) con la excepción que el monitoreo se conmuta una vez por semana durante los periodos cuando todos los ratones que permanecen en el estudio tienen tumores no palpables. Los ratones se sacrifican cuando el volumen de los tumores alcanza más de 1500 mm^3 (o 1200 mm^3 los viernes). No se encuentran ratones muertos o sacrificados por otras razones.

[0037] Figura 24A-24C. Porcentaje de Ratones Libres de Tumor Durante el Tiempo. Los ratones se tratan y se monitorean, y el volumen de los tumores se determina como se describe en la leyenda de Figura 21. Un ratón se considera "libre de tumor" si este no tiene tumor palpable. El volumen de los tumores se determina por lo menos 3 veces a la semana (M W F) con la excepción que el monitoreo se conmuta una vez por semana durante los periodos cuando todos los ratones que permanecen en el estudio tienen tumores no palpables.

[0038] Figura 25 A-25C. Pesos Corporales Medios de Los Ratones Durante el Tiempo. Los ratones se tratan y se monitorean como se describe en la leyenda de Figura 21. Los pesos corporales se determinan en los días indicados del estudio.

[0039] Figura 26. Evaluación de Citometría de Flujo de 018011 o Rituximab Unido a Células Aisladas de Xenoinjertos de Linfoma de Células B Ramos.

[0040] Figura 27. Efecto Inhibidor de Crecimiento In Vitro de 01801 1 contra Linfomas de células B humanas.

[0041] Figura 28. Efecto de Reticulación de 018011 en Muerte Inducida por Activación de Células de Linfoma B Ramos.

[0042] La Figura 29 es una tabla que resume los residuos de aminoácido en varias posiciones clave de los SMIP humanizados de ejemplo. Los residuos listados bajo la columna "Bisagra" describen los residuos para las posiciones 220, 226, 229 y 230 de la SEQ ID NO: 60. El residuo 331 en la columna "IgGl Fc" se refiere al residuo 331 en la SEQ ID NO: 61.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

I. Definiciones

[0043] Con el fin que la presente invención se pueda entender más fácilmente, se definen primero ciertos términos. Las definiciones adicionales se establecen a través de la descripción detallada.

[0044] Una "molécula de unión CD20" de acuerdo con varias modalidades de la invención es un molécula que comprende una porción de unión a CD20 de la molécula de unión CD20 humanizada específicamente ejemplificada aquí. Un tipo de molécula de unión CD20 contemplada por la invención es un anticuerpo o un fragmento de unión a CD20 del mismo. Una molécula de unión se puede modificar de acuerdo con métodos estándar en la técnica, por ejemplo, para mejorar su afinidad de unión, para mejorar su especificidad, para disminuir su inmunogenicidad, para alterar sus funciones efectoras y/o para mejorar su disponibilidad en el cuerpo de un individuo. Tales modificaciones pueden incluir, por ejemplo, modificaciones de la secuencia de aminoácido o expresión como una proteína de fusión. Tales proteínas de fusión también se unen a moléculas de acuerdo con la invención. Una molécula de unión de ejemplo de la invención es un inmunofarmacéutico modular pequeño (SMIP).

[0045] El término "anticuerpo" se refiere a una inmunoglobulina o fragmento de la misma, y abarca cualquier tal polipéptido que comprende un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo. El término incluye pero no se limita a anticuerpos generados policlonal, monoclonal, monoespecífico, poliespecífico, humanizado, humano, de cadena única, quimérico, sintético, recombinante, híbrido, mutado, injertado, e in vitro.

[0046] El término "anticuerpo" también incluye fragmentos de unión a antígeno de un anticuerpo. Ejemplos de fragmentos de unión a antígeno incluyen, pero no se limitan a, Fragmentos Fab (que consisten de los dominios V_L, V_H, CL y C_HI); Fragmentos Fd (que consisten de los dominios V_H y C_HI); Fragmentos Fv (referidos a un dímero de un dominio variable de cadena liviana o un dominio variable de cadena pesada en asociación íntima no covalente); fragmentos dAb

(que consisten de un dominio V_H); regiones CDR aisladas; fragmentos $(Fab')_2$, fragmentos bivalentes (que comprenden dos Fragmentos Fab ligados mediante un puente de disulfuro a la región de bisagra), scFv (referido a una fusión de los dominios VL y V_H, ligado junto con un ligador corto), y otros fragmentos de anticuerpo que retienen la función de unión a antígeno. La parte del antígeno que se reconoce específicamente y se une por el anticuerpo se refiere como el "epítopo."

[0047] Un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo anti-CD20 de la invención se puede producir mediante técnicas bioquímicas convencionales, tal como división de enzima, o técnicas de ADN recombinante conocidas en la técnica. Estos fragmentos se pueden producir mediante división proteolítica de anticuerpos intactos mediante métodos bien conocidos en la técnica, o al insertar los codones de parada en las ubicaciones deseadas en los vectores utilizando mutagenia dirigida a sitio, tal como después de C_H1 para producir Fragmentos Fab o después de la región de bisagra para producir fragmentos $(Fab')_2$. Por ejemplo, la digestión de Papaína de anticuerpos produce dos fragmentos de unión idénticos a antígeno, llamados fragmentos "Fab", cada uno con un único sitio de unión a antígeno, y un fragmento residual "Fc". El tratamiento con pepsina de un anticuerpo produce un fragmento $F(ab')_2$ que tiene dos sitios de combinación de antígeno y es todavía capaz de reticular el antígeno. Los anticuerpos monocatenarios se pueden producir al unir las regiones codificantes V_L y V_H con un ADN que codifica un ligador de péptido conectado a los fragmentos de proteína V_L y V_H.

[0048] "anticuerpo generado In vitro" se refiere a un anticuerpo donde todo o parte de la región variable (por ejemplo, por lo menos un CDR) se genera en una

selección celular no inmune (por ejemplo, una presentación de fago in vitro, chip de proteína o cualquier otro método en el que las secuencias candidatas se pueden probar por su capacidad de unión a un antígeno). Este término excluye las secuencias generadas mediante redisposición genómica en una célula inmune.

[0049] Un fragmento/dominio de unión a antígeno puede comprender un anticuerpo de región variable de cadena liviana (V_L) y un anticuerpo de región variable de cadena pesada (V_H); sin embargo, este no comprende las dos. Los fragmentos Fd, por ejemplo, tienen dos regiones V_H y frecuentemente retienen la función de unión a antígeno del dominio de unión a antígeno intacto. Ejemplos de fragmentos de unión a antígeno de un anticuerpo incluyen (1) un fragmento Fab, un fragmento monovalente que tiene los dominios V_L, V_H, C_L y C_HI; (2) un fragmento $F(ab')_2$, un fragmento bivalente que tiene dos Fragmentos Fab ligados mediante un puente disulfuro a la región de bisagra; (3) un fragmento Fd que tiene los dos dominios V_H y C_HI; (4) un fragmento Fv que tiene los dominios V_L y V_H de un único brazo de un anticuerpo, (5) un fragmento dAb (Ward et al., (1989) Nature 341 :544-546), que tiene un dominio V_H; (6) una región determinante de complementariedad aislada (CDR), y (7) un Fv monocatenario (scFv). Aunque los dos dominios del fragmento Fv, V_L y V_H, se codifican mediante genes separados, ellos se pueden unir, utilizando métodos de ADN recombinante, mediante un ligador sintético que les permite ser hechos como una cadena de proteína única en la que los pares de regiones V_L y V_H forman moléculas monovalentes (conocidas como Fv monocatenario (scFv); ver por ejemplo, Bird et al. (1988) Science 242:423-426; y Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883). Estos fragmentos de anticuerpo se obtienen utilizando técnicas convencionales conocidas por aquellos expertos en la técnica, y los fragmentos se evalúan para funcionar en la misma forma como lo hacen los anticuerpos intactos.

[0050] El término "anticuerpo humano" incluye anticuerpos que tienen las regiones variable y constante que corresponden sustancialmente a secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana conocidas en la técnica, que incluye, por ejemplo, aquellas descritas por Kabat et al. (Ver Kabat, et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Quinta Edición, Departamento de Salud y Servicios Humanos de los Estados Unidos, Publicación NIH No. 91-3242). Los anticuerpos humanos de la invención pueden incluir residuos de aminoácido no codificados por las secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana (por ejemplo, mutaciones introducidas por mutagenia específica a sitio o aleatorizada in vitro o mediante mutación somática in vivo). El anticuerpo humano puede tener por lo menos una, dos, tres, cuatro, cinco, o más posiciones reemplazadas con un residuo de aminoácido que no se codifica por la secuencia de inmunoglobulina de línea germinal humana. Los CDR son como se define por Kabat o en Chothia C, Lesk AM, Canonical structures for the hypervariable regions of immunoglobulins, J Mol Biol. 1987 Aug 20;196(4):901-17. Los CDR se refieren típicamente a regiones que son hipervariables en secuencia y/o forman espirales definidos estructuralmente, por ejemplo, los CDR de Kabat se basan en la variabilidad de secuencia, como se describe en Sequences of Proteins of Immunological Interest, Departamento de Salud y Servicios Humanos de los Estados Unidos (1991), eds. Kabat et al, o alternativamente, en la ubicación de los espirales estructurales hipervariables como se describe por Chothia. Ver, por ejemplo, Chothia, D. et al. (1992,) J. Mol. Biol. 227:799-817; y Tomlinson et al. (1995) EMBO J. 14:4628-4638. Todavía otro estándar es la definición de AbM utilizada por el software de modelamiento de anticuerpo AbM de Oxford Molecular, que define las regiones hipervariables de contacto con base en la estructura de cristal. Ver, en general, por ejemplo, Protein Sequence and Structure Analysis of

Antibody Variable Domains. In: Antibody Engineering Lab Manual (Ed.: Duebel, S. y Kontermann, R., Springer- Verlag, Heidelberg). Alternativamente se pueden implementar las modalidades descritas con respecto a los CDR de Kabat utilizando relaciones descritas similares con respecto a espirales hipervariables Chothia o a los espirales definidos por AbM.

[0051] El término "cantidad efectiva" se refiere a una dosificación o cantidad que es suficiente durante un curso de terapia para reducir cualquier actividad CD20, para mejorar uno o más síntomas clínicos o alcanzar un resultado biológico deseado.

[0052] La frase actividad CD20 "inhibe" o "antagoniza" y sus cognatos se refiere a una reducción, inhibición, o de otra forma diminución de por lo menos una actividad de CD20 debido a la unión de una molécula de unión específica CD20, en donde la reducción es con relación a la actividad de CD20 en la ausencia de la misma molécula. La inhibición o antagonismo no indica necesariamente una eliminación total de la actividad biológica CD20. Una reducción en la actividad puede ser por lo menos aproximadamente 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, o más.

[0053] El término "aislado" se refiere a una molécula que es sustancialmente libre de su ambiente natural. Por ejemplo, una proteína aislada es sustancialmente libre de material celular u otras proteínas de la célula o fuente de tejido del cual este se deriva. El término también se refiere a preparaciones donde la proteína aislada es suficientemente pura para las composiciones farmacéuticas; o por lo menos 70% (p/p) puro; o por lo menos 80% (p/p) puro; o por lo menos 90% puro; o por lo menos 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100% (p/p) puro.

[0054] El término "agente terapéutico" es una sustancia que trata o asiste en el tratamiento de un trastorno médico. Los agentes terapéuticos pueden incluir, pero no se limitan a, agentes anti-proliferativos, agentes antineoplásicos que incluyen quimioterapéuticos, anti-víricos, anti-infectivos, inmuno moduladores, y similares que modulan las células inmunes o las respuestas inmunes en una forma que complementa la reducción de la actividad CD20 mediante las moléculas de unión específica a CD20 de la invención. Se describen aquí ejemplos no limitantes y usos de agente terapéuticos.

[0055] Como se utiliza aquí, una "cantidad terapéuticamente efectiva" de una molécula de unión específica CD20 se refiere a una cantidad de una molécula de unión específica CD20 que es efectiva, luego de única administración o múltiples administraciones de dosis a un sujeto (tal como un paciente humano) para tratar, prevenir, curar, retrasar, reducir la severidad de, y/o aliviar por lo menos un síntoma de un trastorno o trastorno recurrente, o prolongar la supervivencia del sujeto más allá de lo esperado en la ausencia de tratamiento. Cuando se aplica a un ingrediente activo individual, administrado solo, una dosis terapéuticamente efectiva se refiere a aquel ingrediente solo. Cuando se aplica a una combinación, una dosis terapéuticamente efectiva se refiere a cantidades combinadas de los ingredientes activos que resultan en el efecto terapéutico, si se administra en combinación, serialmente o simultáneamente. La invención contempla específicamente que una o más moléculas de unión específicas a CD20 se pueden administrar de acuerdo con métodos de la invención, cada una en una dosis efectiva.

[0056] El término "tratamiento" o 'tratar" se refiere a mediciones terapéuticas, preventivas o profilácticas. Un tratamiento terapéutico puede mejorar por lo menos un síntoma de enfermedad en un individuo que recibe tratamiento o puede retrasar el empeoramiento de una enfermedad progresiva en un individuo, o prevenir el inicio de enfermedades asociadas adicionales. El tratamiento se puede administrar a un sujeto que tiene un trastorno médico o quien finalmente puede adquirir el trastorno, para prevenir, curar, retrasar, reducir la severidad de, y/o aliviar uno o más síntomas del trastorno o trastorno recurrente, o con el fin de prolongar la supervivencia de un sujeto más allá de lo esperado en la ausencia de tratamiento.

[0057] El término "CD20 humano" está destinado a referirse al antígeno de diferenciación restringido de linfocito B humano (también conocido como Bp35). El CD20 se expresa durante desarrollo de célula pre-B temprano y permanece hasta la diferenciación de célula de plasma. La molécula CD20 puede regular una etapa en el proceso de activación que se requiere para el inicio y diferenciación del ciclo celular, y se expresa usualmente en muy altos niveles en las células B neoplásicas. El CD20 está presente en células B "normales" así como también células B "malignas" (es decir aquellas células B cuya proliferación ininterrumpida puede conducir a linfoma de célula B).

II. Moléculas de unión específica a CD20

De acuerdo con la invención, las moléculas de unión CD20 unen a CD20 en las células B primarias y en las estirpes celulares de linfoma de células B que incluye NU-DHL1, Ramos, SU-DHL4, SU-DHL5, y WSU-DLCL2. En varias modalidades, las moléculas de unión CD20 unen a células que expresan CD20 con un EC50 comparable al EC50 mostrado en la Figura 1 y/o unen en una forma dependiente

de dosis. En varias modalidades, las moléculas de unión CD20 poseen una o más propiedades seleccionadas de: citotoxicidad mediada complementaria (CDC) en las células B primarias y en por lo menos Ramos, células SU-DHL4 y BJAB, en algunos casos con por lo menos 40% de citotoxicidad; dependiente de anticuerpo (o citotoxicidad dependiente de Fc (ADCC o FcCC) en por lo menos células Ramos, BJAB y SU-DHL4, que es dependiente de dosis y en algunos casos con por lo menos 40% de citotoxicidad; mantiene el agotamiento de célula CD 19+ B en médula ósea y ganglios linfáticos por una duración mayor de RITUXAN® o durante más de 8 días y durante por lo menos 10, 12, 14, 16, 18, 20 o 21 días; reduce el crecimiento de tumores de xenoinjerto establecidos en un modelo de ratón como se describe en los Ejemplos y es protector cuando se administra en las etapas tempranas de linfoma diseminado en varios modelos de ratón, como se describe en los Ejemplos.

[0058] En algunas modalidades, las moléculas de unión α CD20 son Small Modular-ImmunoPharmaceuticals (SMIP). En un aspecto, la invención proporciona moléculas de unión específicas a CD20 humanizadas. Los solicitantes han proporcionado 57 moléculas de unión específica a CD20 novedosas que son útiles para el tratamiento de sujetos mamíferos, que incluyen humanos y animales domésticos. La invención también proporciona secuencias de ácido nucleico que codifican las moléculas de unión específicas CD20.

[0059] En ciertas modalidades, las moléculas de unión específicas CD20 de la invención tienen una alta afinidad de unión, una baja velocidad de disociación, y específicamente unen al CD20 humano.

[0060] En ciertas modalidades, las moléculas de unión específicas CD20 humanizadas de la invención son anticuerpos, en particular anticuerpos monoclonales anti-CD20 (mAb), o fragmentos de unión a antígeno de los mismos.

[0061] Un anticuerpo quimérico es un anticuerpo que tiene porciones derivadas de diferentes anticuerpos. Por ejemplo, un anticuerpo quimérico puede tener una región variable y una región constante derivada de dos anticuerpos diferentes. Los anticuerpos donantes pueden ser de la misma o de especies diferentes. En ciertas modalidades, la región variable de un anticuerpo quimérico anti-CD20 de la invención no es humano, por ejemplo, murino, (o una combinación de no humano y humano) y la región constante es humana.

[0062] Las moléculas de unión CD20 humanizadas de la invención también incluyen anticuerpos anti-CD20 de CDR injertado humanizado. En una modalidad, el anticuerpo humanizado comprende CDR de cadena pesada y/o liviana de un SMIP anti-CD20 humanizado de la invención (SEQ ID NOS: 1-59) y estructuras de cadena liviana y de cadena pesada y regiones constantes de una inmunoglobulina aceptora humana. Se describen métodos para elaborar anticuerpos humanizados en la Pat. Estadounidense Nos: 5,530,101 ; 5,585,089; 5,693,761 ; 5,693,762; y 6,180,370 cada una de las cuales se incorpora aquí como referencia en su totalidad.

[0063] Los fragmentos de unión a antígeno de los anticuerpos de la invención, que retiene la especificidad de unión del anticuerpo intacto, también se incluyen en la invención. Los fragmentos de unión a antígeno incluyen cadenas pesadas completas o parciales o cadenas livianas, regiones variables, o regiones CDR de cualesquier anticuerpos específicos CD20 descritos aquí.

[0064] En algunas modalidades, un anticuerpo específico CD20 humanizado de la invención comprende el CDR3 de cadena pesada, el CDR3 de cadena liviana, o ambos, de cualquier molécula de unión ejemplificada en el listado de secuencias de la solicitud. En modalidades que comprenden un HCDR3 y un LCDR3, ellas pueden ser de la misma molécula o de diferentes moléculas en el listado de secuencias de la solicitud. En algunas modalidades, un anticuerpo específico CD20 humanizado de la invención comprende el CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada, CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena liviana, o todos lo seis CDR de una molécula de unión ejemplificada en el listado de secuencias de la solicitud o el HCDR1 -3 y LCDR1 -3 puede ser de diferentes moléculas de unión en el listado de secuencias de la solicitud. En algunas modalidades, un anticuerpo específico CD20 humanizado de la invención es un anticuerpo que comprende un dominio variable de cadena pesada, un dominio variable de cadena liviana o ambos, de una molécula de unión ejemplificada en el listado de secuencias de la solicitud. También se abarcan por la invención anticuerpos humanizados anti-CD20 que comprenden cualquier V_H mostrado en el listado de secuencias de la solicitud, cualquier V_L mostrado en el listado de secuencias de la solicitud, cualquier combinación de tal VH y V_L o cualquier par VH/VL mostrado en el listado de secuencias de la solicitud, o porción de unión a antígeno de tales anticuerpos.

[0065] En ciertas modalidades, una molécula de unión específica CD20 de la invención es un inmunofarmacéutico modular pequeño específico CD20 (SMIP).

[0066] Un SMIP anti-CD20 humanizado de la invención contiene tres dominios modulares: un dominio de unión, un dominio de bisagra, y un dominio efector. En algunas modalidades, el dominio de unión de un SMIP anti-CD20 de la invención

comprende un dominio V_H y un dominio V_L. El dominio de bisagra de un SMIP anti-CD20 de la invención desempeña dos funciones complementarias al proporcionar un enlace flexible entre el dominio de unión y el dominio efector aunque también controla la asociación, o multimerización, de los SMIP. El dominio efector de un SMIP anti-CD20 humanizado de la invención puede comprender por ejemplo, un dominio de anticuerpo humano Fc, o una proteína sin anticuerpo con función efectora. El dominio efector determina qué tipo de célula inmune se activa y regula el balance de las funciones efectoras empleadas, que incluye la actividad relativa de anticuerpo dependiente de citotoxicidad celular (ADCC) o citotoxicidad dependiente de complemento (CDC). El dominio efector también se puede construir por ingeniería para regular la multimerización de fármaco SMIP.

[0067] El dominio de unión de un SMIP de la invención puede tener o más regiones de unión, tal como variable las regiones de unión de cadena liviana y cadena pesada variable derivadas de una o más inmunoglobulinas. Estas regiones se separan típicamente mediante péptidos ligadores, que pueden tener cualquier péptido ligador conocido en la técnica por ser compatible con el enlazador de dominio o región. Ligadores de ejemplo son ligadores basados en el motivo ligador Gly_4Ser, tal como $(Gly_4Ser)n$, donde n=1-5 o cualquier ligador mostrado en el listado de secuencias de la solicitud. Se puede utilizar cualquier ligador adecuado en el contexto de la presente invención, ejemplos el cual se describe en WO 2007/146968.

[0068] En algunas modalidades, el dominio de unión comprende un producto Fv derivado de inmunoglobulina de cadena única humanizado, que puede incluir todo o una porción de por lo menos un inmunoglobulina de región variable de cadena

liviana y todo o una porción de por lo menos una inmunoglobulina de región variable de cadena pesada, se une por un ligador.

[0069] El dominio de bisagra de un SMIP anti-CD20 humanizado de la invención puede ser un péptido de ocurrencia natural, un péptido mutado o construido genéticamente por ingeniería, o un péptido artificial. Por ejemplo, la región de bisagra se puede derivar de una región de bisagra de inmunoglobulina (por ejemplo, porciones de la secuencia de cadena pesada de inmunoglobulina que es responsable de formar enlaces disulfuro de dominio de inmunoglobulina intracadena en las regiones C_H1 y C_H2). La región de bisagra también puede ser un fragmento de (por ejemplo, 5-65 aminoácidos, 10-50 aminoácidos, 15- 35 aminoácidos, 18-32 aminoácidos, 20-30 aminoácidos, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28 o 29 aminoácidos) una región de cadena de polipéptido de inmunoglobulina clásicamente referida como que tiene función de bisagra. El dominio de bisagra también puede incluir aminoácidos ubicados (de acuerdo con el criterio estructural para asignar un residuo particular en un dominio particular que puede variar, como se conoce en la técnica) en un dominio de inmunoglobulina adjunto, tal como el dominio C_H1, el dominio CH2, o el dominio variable.

[0070] El dominio de bisagra de un SMIP anti-CD20 humanizado de la invención puede ser una región bisagra humana, es decir, la región de bisagra de cadena pesada de un anticuerpo humano. En modalidades que comprende una región bisagra humana, la región de bisagra puede ser de cualquier isotipo de inmunoglobulina humano, tal una inmunoglobulina IgG humana (es decir, un IgG1, IgG2, IgG3, o IgG4 humana). En ciertas modalidades, el dominio de bisagra comprende cero o un residuo cisteína. En algunas modalidades, un SMIP anti-

CD20 humanizado de la invención comprende una bisagra que se muestra en una cualquiera de las SEQ IDS 60 o 63 a 66.

[0071] Un SMIP anti-CD20 humanizado de la invención contiene suficiente secuencia de aminoácido de una región constante de una inmunoglobulina para proporcionar una función efectora, preferiblemente ADCC y/o CDC. Por ejemplo, el dominio efector puede comprender la secuencia de dominio de inmunoglobulina humana C_H2, o puede comprender dominios de inmunoglobulina humana C_H2 y C_H3. En modalidades que comprenden los dominios C_H2 y C_H3, los dominios pueden ser de la misma o de diferentes inmunoglobulinas humanas. En otras modalidades, el dominio efector puede comprender las secuencias de regiones de inmunoglobulina humana IgE C_H3 y C_H4.

[0072] En ciertas modalidades, el dominio de unión CD20- de los SMIP de la invención comprende una secuencia de aminoácido V_H, una secuencia de aminoácido V_L, cualquiera de una secuencia de aminoácido V_H y a V_L o un par V_H/V_L establecido en la SEQ ID NOs: 1-59. En ciertas modalidades, el dominio de bisagra de los SMIP de la invención comprende una secuencia de aminoácido como se establece en la SEQ ID NO: 60. En ciertas modalidades, el dominio efector de los SMIP de la invención comprende una secuencia de aminoácido como se establece en la SEQ ID NO: 60 o 61.

[0073] En ciertas modalidades, el dominio de unión CD20 de los SMIP de la invención comprende una región V_H con secuencias de estructura de inmunoglobulina humana y cadena pesada CDR1, CDR2, y CDR3 de secuencias de aminoácido de cadena liviana CDR1, CDR2, y CDR3 de secuencias de aminoácido, o ambas, del dominio de unión de CD20 de un SMIP seleccionado de

SEQ ID NOs: 1-59. En ciertas modalidades, el dominio de bisagra SMIP comprende adicionalmente SEQ ID NO: 60, y el dominio efector comprende SEQ ID NO: 61.

[0074] La invención proporciona numerosas secuencias V_H de cadena pesada, cadena liviana V_L, y CDR útiles para generar moléculas de unión específica CD20. Por ejemplo, uno o más de los CDR mostrados en el listado de secuencias de la solicitud se pueden combinar con una subregión de estructura humana (por ejemplo, un FR1, FR2, FR3, o FR4 completamente humano) para generar una molécula de unión específica CD20. En ciertas modalidades, las moléculas de unión específicas CD20 de la invención comprenden tres CDR de una de región variable de cadena liviana, y tres CDR de una de región variable de cadena pesada, en donde los CDR de cadena pesada y cadena liviana son de la misma secuencia de referencia. Los CDR de la invención se pueden injertar a cualquier tipo de estructuras inmunoglobulina.

[0075] La invención también proporciona moléculas de unión específica CD20 humanizadas que comprende una secuencia de aminoácido que es sustancialmente idéntica o sustancialmente homóloga a una secuencia mostrada en el listado de secuencias de la solicitud, y moléculas de unión específica humanizadas CD20 que comprenden CDR que son sustancialmente idénticas o sustancialmente homólogas a las secuencias CDR (destacado) mostradas en el listado de secuencias de la solicitud. Por ejemplo, un número de aminoácidos o bases de nucleótido se pueden cambiar en las secuencias mostradas en el listado de secuencias de la solicitud, en particular en uno o más CDR, regiones de estructura, o ambos. De acuerdo con lo anterior, en algunas modalidades, una molécula de unión específica CD20 de la invención tiene una secuencia de

aminoácido que es por lo menos 80% de identidad a una secuencia como se establece en la SEQ ID NOs 1-59. En otras modalidades, la secuencia aminoácido es 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad a una secuencia de la secuencia de como se establece en SEQ ID NOs 1-59. Cualquier ligador adecuado se puede utilizar en el contexto de la presente invención, ejemplos de que son se describe en WO 2007/146968.

[0076] Las secuencias sustancialmente idénticas u homólogas (por ejemplo, por lo menos aproximadamente 85% de identidad de secuencia) en las secuencias descritas aquí también son parte de esta solicitud. En alguna modalidad, la identidad de secuencia puede ser aproximadamente 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más. Alternativamente, en conexión con ácidos nucleicos, la identidad sustancial u homología existe cuando los segmentos de ácido nucleico hibridarán bajo condiciones de hibridación selectivas (por ejemplo, condiciones de hibridación altamente exigentes), al complemento de la hebra. Los ácidos nucleicos pueden estar presentes en células completas, en un lisato celular, o en una forma parcialmente purificada o sustancialmente pura.

[0077] Los cambios a la secuencia de aminoácido se puede generar al cambiar la secuencia de ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácido. Una secuencia de ácido nucleico que codifica una variante de un CDR dado se puede preparar mediante métodos conocidos en la técnica utilizando la guía de la especificación presente para secuencias particulares. Estos métodos incluyen, pero no se limitan a, preparación de mutagenia dirigida a sitio (o mediada por oligonucleótido), mutagenia PCR, y mutagenia de casete de un ácido nucleico preparado temprano que codifica el CDR, todas las cuales son técnicas bien conocidas en la técnica. Por ejemplo, se puede utilizar mutagenia dirigida a sitio

para preparar variantes de sustitución (ver, por ejemplo, Carter et al., (1985) Ácidos nucleicos Res. 13: 4431- 4443 y Kunkel et. al., (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 488-492, ambos las cuales se incorporan aquí como referencia).

[0078] En otro aspecto, la invención proporciona ácidos nucleicos que codifican una anti- molécula de unión CD20 de la invención. En algunas modalidades, el ácido nucleico codifica un polipéptido que comprende el V_H o V_L, la secuencia de aminoácido establecida en una cualquiera de las SEQ ID NOS: 1-59, o que codifica un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácido de una cualquiera de las SEQ ID NOS: 1-59. En algunas modalidades, el ácido nucleico es una cualquiera de SEQ ID NOS: 67-126 o un fragmento de una de aquellas secuencias que codifican una región V_H o una región V_L.

III. Producir moléculas de unión CD20

[0079] Las moléculas de unión específica humanizadas CD20 de la invención se pueden preparar, por ejemplo, mediante tecnologías de ADN recombinante. Por ejemplo, en el caso de un anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo de la invención, una célula anfitriona se puede transfectar con uno o más vectores de expresión recombinante que llevan fragmentos de ADN que codifican las cadenas pesada y liviana de inmunoglobulina del anticuerpo, o un fragmento de unión a antígeno del anticuerpo, de tal manera que las cadenas pesada y liviana se expresan en la célula anfitriona y, preferiblemente, secretan en el medio en el que la célula anfitriona se cultiva, de cuyo medio el anticuerpo se puede recuperar. En el caso de un SMIP, un ácido nucleico que codifica el SMIP se introduce en y se expresa en una célula anfitriona.

[0080] Las metodologías de ADN recombinante estándar se pueden utilizar para obtener genes de cadena liviana y pesada de anticuerpo o un ácido nucleico que codifica el SMIP, que incorpora estos genes en vectores de expresión recombinante e introducen los vectores en células anfitrionas, tal como aquellas descritas en Sambrook, Fritsch y Maniatis (eds), Molecular Cloning; A Laboratory Manual, Segunda Edición, Cold Spring Harbor, N. Y., (1989), Ausubel, F. M. et al. (eds.) Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates, (1989) y en Pat. Estadounidense No. 4,816, 397 por Boss et al. , todas las cuales se incorporan aquí como referencia.

[0081] Por ejemplo, para expresar un anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, de la invención, primero se pueden obtener los ácidos nucleicos que codifican la región variable de cadena pesada y de cadena liviana. Estos ácidos nucleicos se pueden obtener mediante amplificación y modificación de los genes de región variable de cadena pesada y liviana de línea germinal humana utilizando la reacción de cadena polimerasa (PCR). Las secuencias de ADN de línea germinal para los genes de región variable de cadena liviana y pesada humanos se conocen en la técnica. Una vez se obtienen los fragmentos V_H y V_L, estas secuencias se pueden construir genéticamente por ingeniería para codificar, por ejemplo, una o más de las secuencias SMIP, los fragmentos VH y V_L de las secuencias SMIP, o los CDR de las secuencias SMIP descritas aquí (ver, por ejemplo, el listado de secuencias de la solicitud).

[0082] Para expresar los anticuerpos de la invención o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, uno o más ácidos nucleicos que codifican las cadenas liviana y pesada de longitud completa o parcial o en el caso de los SMIP, se puede insertar un ácido nucleico que codifica el SMIP en un vector de expresión o

vectores de tal manera que los ácidos nucleicos se ligan operablemente a las secuencias de control transcripcional y traduccional. El vector de expresión y las secuencias de control de expresión se seleccionan generalmente por ser compatibles con la expresión de la célula anfitriona utilizada.

[0083] Adicionalmente para los genes de cadena liviana y/o de cadena pesada del anticuerpo, los vectores de expresión recombinante de la invención pueden llevar adicionalmente secuencias reguladoras que controlan la expresión de las cadenas de anticuerpo (o fragmentos) o SMIP en una célula anfitriona, tal como promotores, mejoradores o otros elementos de control de expresión (por ejemplo, señales de poliadenilación) que controlan la transcripción o traducción del ácido nucleico que codifica la molécula de unión de la invención. Tales secuencias reguladoras se conocen en la técnica (ver, por ejemplo, Goeddel, Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego,Calif. (1990), incorporadas aquí como referencia). Se apreciará por aquellos expertos en la técnica que el diseño del vector de expresión, que incluye la selección de las secuencias reguladoras puede depender de tales factores como la selección de la célula anfitriona a ser transformada, el nivel de expresión de la proteína deseada, etc. Las secuencias reguladoras de ejemplo para la expresión de célula anfitriona de mamífero que incluye elementos víricos que dirige altos niveles de expresión de proteína en células de mamífero, tal como promotores y/o mejoradores derivados de citomegalovirus (CMV) (tal como el promotor/mejorador de CMV), Virus 40 del simio (SV40) (tal como el promotor/mejorador de SV40), adenovirus, (por ejemplo, el promotor tardío principal de adenovirus (AdMLP)) y virus polioma. Para descripción adicional de los elementos reguladores víricos, y las secuencias de los mismos, ver por ejemplo, Pat. Estadounidense No. 5,168, 062 por Stinski, Pat. Estadounidense No. 4,510, 245 por Bell et al. y Pat.

Estadounidense No. 4,968, 615 por Schaffner et al., todas las cuales se incorporan aquí como referencia.

[0084] Adicionalmente a las secuencias que codifican la cadena liviana y/o cadena pesada de anticuerpo o SMIP de la invención y las secuencias reguladoras, los vectores de expresión recombinante de la invención pueden llevar secuencias adicionales, tal como las secuencias que regulan la replicación del vector en células anfitrionas (por ejemplo, orígenes de replicación) y genes de marcador seleccionable. El gen de marcador seleccionable facilita la selección de células anfitrionas en las que se ha introducido el vector (ver por ejemplo, Pat. Estadounidense Nos. 4,399, 216,4, 634.665 y 5,179, 017, todas por Axel et al.). Por ejemplo, típicamente el gen de marcador seleccionable confiere resistencia a los fármacos, tal como G418, higromicina o metotrexato, en una célula anfitriona en la que se ha introducido el vector. Otros genes de marcador seleccionable adecuados incluyen el gen de reductosa dihidrofolato (DHFR) (para uso en células anfitrionas dhfr con selección/amplificación de metotrexato) y el gen neomicina (para selección G418).

[0085] Para expresión, el vector de expresión que codifica las cadena liviana y pesada de anticuerpo o el SMIP se puede transfectar en una célula anfitriona mediante técnicas estándar, tal como electroporación, precipitación de fosfato de calcio, o transfección de DEAE-dextrano. En ciertas modalidades, el vector de expresión utilizado para expresar las moléculas de unión específicas CD20 de la invención son vectores víricos, tal como vectores retrovíricos. Tales vectores víricos también se pueden utilizar para generar estirpes celulares estables (como una fuente de suministro continuo de las moléculas de unión específicas CD20).

[0086] Las células anfitrionas de mamífero adecuadas para expresar las moléculas de unión anti-CD20 humanizadas recombinantes de la invención incluyen células PER.C6 (Crucell, Holanda), células de ovario de Hámster Chino (células CHO) (que incluyen células dhfr-CHO, se describe en Urlaub y Chasin, (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 4216-4220, utilizadas con un marcador seleccionable DHFR, por ejemplo, como se describe en R. J. Kaufman y P. A. Sharp (1982) Mol. Biol. 159: 601-621), células de mieloma NSO, células COS y células SP2. Adicionalmente, las células anfitrionas expresan GnTin (se describe en W09954342 y Pat. Estadounidense Pub. 20030003097, ambas incorporadas aquí como referencia) también se pueden utilizar, de tal manera que se expresan moléculas de unión específicas CD20 han incrementado la actividad ADCC.

[0087] Cuando los vectores de expresión recombinante que codifican el anticuerpo o SMIP se introducen en células anfitrionas de mamífero, los anticuerpos y SMIP se producen generalmente al cultivar las células anfitrionas durante un periodo suficiente para permitir la expresión de la proteína en las células anfitrionas o, más preferiblemente, secreción del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno o el SMIP en el medio de cultivo en el que crecen las células anfitrionas. La molécula de unión ati-CD20 se puede recuperar del medio de cultivo utilizando métodos de purificación de proteína estándar.

[0088] Se entenderá que variaciones del procedimiento anterior están dentro del alcance de la presente invención. Por ejemplo, se puede utilizar tecnología de ADN para remover algo o todo del ADN que codifica una o las cadenas pesada y liviana que no se necesita para unir un CD20. Adicionalmente, los anticuerpos bifuncionales se pueden producir en los que una cadena liviana y una cadena pesada son un anticuerpo de la invención y las otras cadenas liviana y pesada son

específicas para un antígeno diferente a CD20 (por ejemplo, al reticular un anticuerpo de la invención a un segundo anticuerpo mediante métodos de reticulación química estándar).

[0089] Se han descrito métodos para elaborar SMIP en la Publicación de Patente Estadounidense Nos. 2003/0133939, 2003/01 18592, y 2005/0136049, que se incorporan aquí como referencia en su totalidad. En ciertas modalidades, los SMIP de la invención son proteínas de fusión de inmunoglobulina de dominio de unión que caracterizan (1) un dominio de unión para una estructura cognato (tal como un antígeno, un contrareceptor o similares), (2) una región de bisagra IgG1, IGA o IgE o una región de bisagra mutante IgG1 que tiene cero, uno o dos residuos cisteína, y (3) dominios de inmunoglobulina C_H2 y C_H3. En ciertas modalidades, el dominio de unión comprende uno o dos residuos cisteína (Cys) en la región de bisagra. En ciertas modalidades, cuando el dominio de unión comprende dos residuos Cys, el primer Cys, que se involucra en la unión entre la cadena pesada y cadena liviana, no se elimina o se sustituye con otro aminoácido.

[0090] El SMIP humanizado anti-CD20 de la invención se relaciona con un SMIP anti-CD20 quimérico, TRU-015, que es una proteína monocatenaria recombinante (murino/humano) que une al antígeno CD20, como se describe en US 2007/0213293. El dominio de unión de TRU- 015 se basa en los dominios de unión 2H7 públicamente disponibles. El dominio de unión se conecta al dominio efector, los dominios C_H2 y C_H3 de IgG1 humano a través de una región de bisagra CSS modificada.

IV. Usos Terapéuticos

[0091] En otro aspecto, la invención proporciona un método para tratar un sujeto que tiene o se sospecha de tener una enfermedad asociada con actividad de células B aberrante, que comprende administrar a un paciente una cantidad terapéuticamente efectiva de una molécula de unión específica CD20 humanizada de la invención. En una modalidad, la molécula de unión específica CD20 es un inmunofarmacéutico modular, pequeño específico CD20 (SMIP).

[0092] "Actividad aberrante de células B " se refiere a la actividad celular que desviar del curso normal, propio, o esperado. Por ejemplo, la actividad celular aberrante puede incluir proliferación inapropiada de células cuyo ADN u otros componentes celulares han llegado a dañarse o ser defectuosos. La actividad de células B aberrante pueden incluir proliferación celular cuyas características se asocian con una enfermedad originada por, mediada por, o que resulta en niveles inapropiadamente altos de división celular, niveles inapropiadamente bajos de apoptosis, o ambos. Tales enfermedades se pueden caracterizar, por ejemplo, mediante una única proliferación anormal o múltiples proliferaciones anormales de células, grupos de células o tejidos, si es canceroso o no canceroso, benigno o maligno, se describe más completamente adelante. La actividad de células B aberrante también puede incluir producción de anticuerpo aberrante, tal como producción de autoanticuerpos, o la sobreproducción de anticuerpos típicamente deseable a niveles normal. Se contempla que la actividad de células B aberrante puede ocurrir en ciertas subpoblaciones de células B y no en otras subpoblaciones. La actividad de células B aberrante también puede incluir estimulación inapropiada de células T, tal como mediante la presentación de antígeno de células B inapropiada a células T o mediante otras rutas que involucran células B.

[0093] "Un sujeto que tiene o se sospecha que tiene una enfermedad asociada con actividad de células B aberrante" es un sujeto en el que una enfermedad o un síntoma de una enfermedad se puede originar por la actividad de células B aberrante, se puede exacerbar mediante la actividad de células B aberrante, o se puede aliviar mediante la regulación de la actividad de célula B. Ejemplos de tales enfermedades son cánceres de células B (tal como linfoma de célula B, una leucemia de célula B, un mieloma de célula B), una enfermedad caracterizada por la producción de autoanticuerpo o una enfermedad caracterizada por estimulación de célula T inapropiada, tal como mediante la presentación de antígeno de células B inapropiada a células T o mediante otras rutas que involucran células B.

[0094] En un aspecto, un individuo tratado mediante los métodos de la invención demuestran una respuesta mejorada para tratamiento con la molécula de unión específica CD20 descrita aquí, que se mejora sobre la respuesta a otros tratamientos, tal como por ejemplo, ENBREL® (Amgen/Wyeth), HUMIRA® (Abbott), REMICADE® (Johnson&Johnson/Schering-Plough), RITUXAN® (Genentech/Roche), ocrelizumab (Genentech/Roche), ORENCIA® (BMS), ACTEMRA® (Roche/Chugai), CIMZIA® (UCB Pharma) para el tratamiento de RA y RITUXAN® (Genentech/Roche), ocrelizumab (Genentech/Roche), belimumab (HGS), epratuzumab (Immunomedics/UCB), Humax CD20® (Genmab/GSK), atacicept (Zymogenetics), ORENCIA® (BMS), y ACTEMRA® (Roche/Chugai) para el tratamiento de lupus (SLE). Una respuesta que se mejora sobre otros tratamientos se refiere a una respuesta clínica en donde el tratamiento mediante los resultados del método de la invención en una respuesta clínica en un paciente que es mejor que otra terapia, sola o en combinación con otros agentes. Se evalúa una respuesta mejorada mediante la comparación de criterios clínicos bien conocidos en la técnica y descritos aquí. Los criterios de ejemplo incluyen, pero no

se limitan a, la duración del agotamiento de célula B, reducción en números de células B generales, reducción en números de células B en una muestra biológica, reducción en el tamaño del tumor, Reducción en el número de los tumores que existen y/o aparecen después de tratamiento, y respuesta general mejorada como se evalúa por los mismos pacientes y médicos, por ejemplo, utilizando un Índice de Pronóstico Internacional. El mejoramiento puede estar en uno o más de uno de los criterios clínicos. Una respuesta mejorada con el método de la invención puede ser debido a una respuesta inadecuada para tratamiento previo o actual, por ejemplo, debido a aquel de toxicidad (por ejemplo, eventos adversos relacionados con infusión) y/o eficacia inadecuada de otro tratamiento. Adicionalmente, se pueden mejorar los esquemas o regímenes de dosificación del presente invento que unen a las moléculas (por ejemplo, administración subcutánea).

[0095] Por ejemplo, el tratamiento con un CD20 SMIP humanizado produce una reducción significativa en células CD 19+ B en la médula ósea y ganglios linfáticos veintidós días después de tratamiento con el CD20 SMIP humanizado comparado con RITUXAN®. Ver Figuras 9 y 10 y Ejemplo 4.

[0096] En artritis reumatoide, los tipos celulares principales responsables de la inflamación crónica y la destrucción de cartílago posterior y erosión ósea en las articulaciones son macrófagos, fibroblastos sinoviales, neutrófilos, y linfocitos (Marrack et al., Nat Med. 2001;7:899-905). Se ha demostrado que los linfocitos B y T que infiltran los tejidos sinoviales inflamados se organizan frecuentemente en estructuras que restauran los folículos linfoides (Berek & Kim, Semin Immunol. 1997;9:261-268; Berek &, Schroder, Ann N Y Acad Sci. 1997;815:211-217; Kim & Berek, Arthritis Res. 2000;2:126-131). El análisis molecular de células B aisladas de estructuras foliculares sinoviales durante artritis reumatoide demuestran la

importancia de células B en las respuestas inmunes específicas conducidas a antígeno local y en producción incrementada del factor reumatoide (RF), los anticuerpos de alta afinidad con autoreactividad (Weyand & Goronzy, Ann N Y Acad Sci. 2003;987: 140-149; Gause et al, BioDrugs. 2001; 15:73-79). La forma positiva para el RF se asocia con enfermedad articular más agresiva y una frecuencia mayor de manifestaciones extra-articulares (van Zeben et al., Ann Rheum Dis. 1992;51 :1029-1035)

[0097] La evidencia con respecto a la patogenicidad de células B en RA se ha obtenido recientemente de ensayos clínicos en los pacientes con enfermedad refractaria al utilizar ablación de células B con rituximab (Rituxan®), un anticuerpo monoclonal quimérico anti-CD20 humano (Leandro et al, Ann Rheum Dis. 2002;61:883-888; Edwards et al., N Engl J Med. 2004;350:2572-2581). En todos los grupos tratados con rituximab, una producción significativamente mayor de los pacientes tiene un 20% de mejoramiento en los síntomas de la enfermedad de acuerdo con los criterios de ACR. Se mantienen todas las respuestas ACR en la semana 48 en el grupo rituximab-metotrexato. En este estudio que involucra 161 pacientes con RA activo, ocurren infecciones serias en un paciente (2.5 por ciento) en el grupo de control y en cuatro pacientes (3.3 por ciento) en los grupos rituximab, lo que indica que el agotamiento de células B es una terapia relativamente segura en RA.

[0098] El CD20 es una fosfoproteína embebida en membrana celular de tetraexpansión no glucosilada de 35KD, se restringe en el linaje de células B y se expresa en células pre-B, células inmaduras B, células neófitas maduras y células de memoria B, pero no en células pro-B tempranas y células de plasma. Un mecanismo actual, por el que la remoción de de células B patogénicas y sus

precursores, pero no células de plasma que secretan anticuerpo, conduce a mejoramiento clínico que permanece elusivo (Cragg et al., Terapia. Curr Dir Autoimmun 2005; 8:140-17410). Dado que las células B existen como agregados linfoides dentro de la membrana sinovial de pacientes RA, las funciones de células B diferentes a la producción de anticuerpo (por ejemplo, producción de citoquina, presentación de antígeno, provisión de señales coestimuladoras para células T) también pueden jugar un papel importante en la patogenia de la enfermedad (Martin & Chan, Immunity. 2004;20:517-527).

[0099] Estudios in vitro sugieren que el rituximab induce lisis de células de linfoma positivas CD20 a través de tres mecanismos posibles: ADCC, CDC y señalización directa que conduce a apoptosis (Clark & Ledbetter, Ann Rheum Dis 2005; 64:77-8012). La evidencia en humanos sugiere que la lisis de la células B en SLE ocurre de forma similar por vía de ADCC y apoptosis mediante conexión de FcγRIIIa (CD 16) en células asesinas naturales y macrófagos, a pesar del grado de agotamiento de células B en SLE así como también la respuesta clínica de linfoma, depende del polimorfismo de FcγRIIIa (Anolik et al., Arthritis Rheum 2003; 48:455-459).

[0100] La terapia anti-CD20 también se ha probado en otros trastornos autoinmunes, que incluyen Lupus Eritematoso Sistémico (SLE), proporcionados en el proceso novedoso en el papel de células B en autoinmunidad (Eisenberg R., Arthritis Res Ther. 2003;5: 157-159). La mayoría de los pacientes SLE que reciben rituximab demuestran agotamiento de células B completa y mejoramiento clínico (Anolik et al., Curr Rheumatol Rep. 2003;5:350- 356). En contraste, aquellos sin agotamiento de células B no responden al tratamiento. El número de células B es usualmente inferior a 1-3 meses después de la dosis inicial y este agotamiento finaliza durante 3-12 meses.

[0101] Los pacientes pueden desarrollar anticuerpo antiquimérico humano (HACA) después de tratamiento, como rituximab es un anticuerpo quimérico. En un estudio, 33% de los pacientes tratados con rituximab tienen altos títulos de HACA (Looney et al., Curr Opin Rheumatol. 2004; 16: 180- 185). De forma interesante, estos incluyen los pacientes quienes reciben solo una dosis única de rituximab. Los HACA se encuentran que están asociados con menos agotamiento de células B efectiva, y niveles inferiores de suero de rituximab a 2 meses después de la infusión inicial.

[0102] El tratamiento de Rituximab induce un agotamiento casi completo de todas las poblaciones de células B sanguínea periférica en los pacientes con RA (Leandro et al., Arthritis Rheum 2006; 54:613- 620). La falla para alcanzar 97% de agotamiento de células B circulantes B durante por lo menos 3 meses en 1 paciente se asocia con una carencia de respuesta para el tratamiento. La repoblación de células B de la sangre periférica es dependiente luego de la formación de de células neófitas B, que la expansión de memoria de células B. Los pacientes quienes experimentan un recaída de enfermedad temprano, un tiempo de regreso de célula B, tiende a mostrar un alto número de repoblación de células B de memoria circulantes, cuando se compara con los pacientes cuyo recaída ocurre después. El agotamiento celular B menos extensiva en tejidos sólidos así se puede asociar con un recaída temprano de RA.

[0103] Los sucesos clínicos recientes de rituximab en autoinmunidad indican que existe necesidad de desarrollar terapéuticos objetivadores de células B alternativos que sería menos inmunogénicos y pueden eliminar potencialmente

todos los residuos clonales de células B autoreactivas patológicas en la esperanza de restablecer la tolerancia inmune.

[0104] A pesar de las respuestas clínicas significativas vistas en los pacientes tratados con terapias objetivadas CD20 existentes, los efectos terapéuticos de estos agentes no son durables, y la frecuencia de recaída de enfermedad, particularmente en pacientes con linfoma, permanece alto. Las terapias objetivadas de CD20 son altamente efectivas para agotar células B normales y transformadas de circulación. Sin embargo, su capacidad de ablación de las células B embebidas en tejidos o en los linfáticos es más limitada, posiblemente debido a la capacidad reducida de grandes biomoléculas para tener acceso a estos sitios o para incrementar la resistencia celular objetivada proporcionada por el microambiente de tejido. Cualquiera que sea la razón, estos ambientes pueden proporcionar un reservorio protegido para la supervivencia de células B o células de linfoma que pueden volver a surgir posteriormente en un régimen de tratamiento evidentemente exitoso y da recaída de enfermedad.

[0105] El tratamiento de primates no humanos con el SMIP humanizado seguido por resección y análisis de tejidos ha demostrado una capacidad superior del CD20 SMIP para eliminar células B embebidas de tejido comparado con los tratamientos de control. Esto, combinado con una capacidad clara para eliminar células B de la circulación, sugiere que los pacientes tratados con esta agente responderán favorablemente en el término cercano para ablación de células B efectiva, pero más aún que la eficacia luego de tratamiento será de mayor duración significativa cuando se compara con terapias objetivas CD20 actuales. Para estos agentes, parece que la profundidad del agotamiento en médula ósea y tejido de ganglio linfático es significativo, lo que indica que estas moléculas

pueden ser capaces de agotar células B eficientemente en áreas relevantes, inmunológicamente activas. Así, estas moléculas pueden proporcionar una terapia preferida para tratar un conjunto más amplio de pacientes, que incluye aquellos quienes existen una necesidad para mejorar tal eficacia.

[0106] En un aspecto relacionado, los individuos tratados mediante los métodos de la invención también se les administra RITUXAN. En una modalidad, el RITUXAN se ha administrado como una primera línea de tratamiento y continúa cuando el tratamiento con un método de la invención ha empezado. En otra modalidad, ha empezado el tratamiento de RITUXAN se discontinúa después de tratamiento con un método de la invención.

[0107] "Un sujeto que tiene o se sospecha que tiene una enfermedad reumática" es un sujeto o individuo afectado por una enfermedad o trastorno de origen articular o del sistema musculoesquelético, afectando tales áreas como articulaciones, cartílago, músculos, nervios, y tendones. Se contempla adicionalmente que el sujeto que tiene o se sospecha que tiene una enfermedad reumática puede haber recibido previamente la terapia para tratar una enfermedad reumática. En una modalidad, la enfermedad reumática incluye, pero no se limita a, artritis reumatoide, espondilitis anquilosante, dermatomiositis, púrpura de Henoch Schonlein, artritis reumatoide juvenil, artritis soriática, síndrome de Raynaud, síndrome de Reiter, sarcoidosis, espondiloartropatías, esclerosis sistémica progresiva y miositis.

[0108] "Un sujeto que tiene o se sospecha que tiene una enfermedad autoinmune del sistema nervioso central" o "trastorno del sistema nervioso central" es un sujeto o individuo afectado por una enfermedad o trastorno que afecta el sistema

nervioso central, que incluye el cerebro y médula ósea, o tales áreas como el nervio óptico. Se contempla adicionalmente que el sujeto tiene o se sospecha que tiene un trastorno del sistema nervioso central puede haber recibido previamente terapia para tratar un trastorno del sistema nervioso central. En una modalidad, la enfermedad autoinmune del sistema nervioso central incluye, pero no se limita a, esclerosis múltiple, encefalomielitis alérgica, neuromielitis óptica, lupus mielitis y lupus cerebritis.

[0109] "Vasculitis" se refiere a una enfermedad o trastorno asociado con inflamación en un vaso sanguíneo. Trastornos vasculitis de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, enfermedad de Behcet, vasculitis del sistema nervioso central, síndrome de Churg-Strauss, crioglobulinemia, arteritis de célula gigante, púrpura Henoch Schonlein, vasculitis/angitis hipersensible, enfermedad de Kawasaki, vasculitis leucocitoclástica, poliantitis, poliarteritis nodosa, polimialgia, policondritis, vasculitis reumatoide, arteritis de Takayasu, granulomatosis de Wegene, vasculitis debido a hepatitis, fiebre mediterránea familiar, poliangiitis microscópica, síndrome de Cogan, síndrome de Whiskott-Aldrich y thromboangiitis obliterans.

[0110] Los métodos contemplados por la invención son útiles para tratar enfermedades tal como cánceres de células B (por ejemplo, linfoma de célula B, leucemias de célula B, linfoma de célula B), enfermedades caracterizadas por producción de autoanticuerpo, o enfermedades caracterizadas por estimulación de células T inapropiadas de células T, tal como mediante antígeno de células B inapropiada para células T o mediante otras rutas que involucran células B.

[0111] Los cánceres de células B incluyen linfoma de células B (tal como varias formas de enfermedad de Hodgkin, linfoma no Hodgkins (NHL) o linfomas del

sistema nervioso central), leucemias (tal como leucemia linfoblástica aguda (ALL), leucemia linfocítica crónica (CLL), leucemia de célula Hairy y leucemia mioblástica crónica) y mielomas (tal como mieloma múltiple). Los cánceres de células B adicionales incluyen linfoma linfocítico pequeño, leucemia prolinfocítica de célula B, linfoma linfoplasmacítica, linfoma de zona marginal esplénica, mieloma de célula de plasma, plasmacitoma solitario de hueso, plasmacitoma extraóseo, linfoma de células B de zona marginal extranodosa de tejido linfoide asociado con mucosa (MALT), linfoma de células B de zona marginal nodosa, linfoma folicular, linfoma de célula de manto, linfoma de células B grande difusa, linfoma de células B grande mediastinal (tímica), linfoma de células B grande intravascular, linfoma de efusión primaria, linfoma/leucemia de Burkitt, proliferaciones de células B de potencial maligno incierto, granulomatosis linfomatoide, y trastorno linfoproliferativo post-trasplante.

[0112] Los trastornos caracterizados por producción de autoanticuerpo se consideran frecuentemente enfermedades autoinmunes. Las enfermedades autoinmunes incluyen, pero no se limitan a: artritis, artritis reumatoide, artritis reumatoide juvenil, osteoartritis, policondritis, artritis soriática, soriasis, dermatitis, polimiositis/dermatomiositis, miositis de cuero de inclusión, miositis inflamatoria, necrolisis epidérmica tóxica, escleroderma sistémico y esclerosis, síndrome de CREST, respuestas asociadas con enfermedad inflamatoria del intestino, enfermedad de Crohn, colitis ulcerativa, síndrome de distensión respiratoria, síndrome de distensión respiratorio de adulto (ARDS), meningitis, encefalitis, uveitis, colitis, glomerulonefritis, afecciones alérgicas, eczema, asma, afecciones que involucran infiltración de células T y respuestas inflamatorias crónicas, aterosclerosis, miocarditis autoinmune, deficiencia de adhesión de leucocito, Lupus Eritematoso Sistémico (SLE), lupus eritematoso cutáneo subagudo, lupus

discoide, lupus mielitis, lupus cerebritis, diabetes de inicio juvenil, esclerosis múltiple, encefalomielitis alérgica, neuromielitis óptica, fiebre reumática, cólera de Sydenham, respuestas inmunes asociadas con hipersensibilidad retrasada y aguda mediada por citoquinas y linfocitos T, tuberculosis, sarcoidosis, granulomatosis que incluye granulomatosis de Wegener y enfermedad de Churg-Strauss, agranulocitosis, vasculitis (que incluye vasculitis/angitis hipersensible, ANCA y vasculitis reumatoide), anemia aplásica, anemia de Diamond Blackfan, anemia hemolítica inmune que incluye anemia hemolítica autoinmune (AIHA), anemia perniciosa, aplasia de glóbulo rojo pura (PRCA), deficiencia del Factor VIII, hemofilia A, neutropenia autoinmune, pancitopenia, leucopenia, enfermedades que involucran diapedesis de leucocito, trastornos inflamatorios del sistema nervioso central (SNC), síndrome de lesión múltiple de órgano, miastenia gravis, enfermedades mediadas por complejo de antígeno-anticuerpo, enfermedad de membrana base anti-glomerular, síndrome de anticuerpo antifosfolípido, neuritis alérgica, enfermedad de Behcet, síndrome de Castleman, síndrome de Goodpasture, síndrome de Lambert-Eaton Miasténico, síndrome de Reynaud, síndrome de Sjorgen, síndrome de Stevens-Johnson, rechazo de trasplante de órgano sólido, enfermedad de anfitrión versus injerto (GVHD), penfigoide bulloso, pénfigo, poliendocrinopatías autoinmunes, espondiloartropatías ceroinmunes, enfermedad de Reiter, stiff-man, síndrome de arteritis de célula gigante, nefritis de complejo inmune, neuropatía IgA, polineuropatías IgM o neuropatía mediada por IgM, púrpura trombocitopénica idiopática (ITP), púrpura trombocitopénica trombótica (TTP), púrpura de Henoch-Schonlein, trombocitopenia autoinmune, enfermedad autoinmune de los testículos y ovario que incluye orquitis y ooforitis autoinmune, hipotiroidismo primario; enfermedades endocrinas autoinmunes que incluye tiroiditis autoinmunes, tiroiditis crónica (Tiroiditis de Hashimoto), tiroiditis subaguda, hipotiroidismo idiopático, enfermedad de Addison, enfermedad de

Grave, síndromes poliglandulares autoinmunes (o síndromes de endocrinopatía poliglandular), diabetes Tipo I también denominado como diabetes mellitas dependiente de insulina (IDDM) y síndrome de Sheehan; hepatitis autoinmune, neumonitis intersticial linfoide (HIV), bronquiolitis obliterans (sin trasplante) vs NSIP, síndrome de Guillain-Barre, vasculitis de vaso grande (que incluye polimialgia reumática y célula gigante (arteritis de Takayasu), vasculitis de vaso medio (que incluye enfermedad de Kawasaki y poliarteritis nodosa), espondilitis alquilosante poliarteritis nodosa (PAN), enfermedad de Berger (neuropatía IgA), glomerulonefritis rápidamente progresiva, cirrosis biliar primaria, Celiac sprue (enteropatía gluten), crioglobulinemia, crioglobulinemia asociada con hepatitis, esclerosis lateral amiotrófica (ALS), enfermedad de arteria coronaria, fiebre mediterránea familiar, poliangiitis microscópica, síndrome de Cogan, síndrome de Whiskott-Aldrich y thromboangiitis obliterans.

[0113] La artritis reumatoide (RA) es una enfermedad crónica caracterizada por inflamación de las articulaciones, que conduce a hinchamiento, dolor, y pérdida de la función. Los pacientes que tiene RA durante un periodo extendido que exhibe usualmente la destrucción de la articulación, deformidad, discapacidad y aún muerte prematura.

[0114] El Lupus Eritematoso Sistémico (SLE) es una enfermedad autoinmune originada por lesiones recurrentes en los vasos sanguíneos en múltiples órganos, que incluye el riñón, piel, y articulaciones. En los pacientes con SLE, una interacción defectuosa entre las células T y células B los resultados en la producción de los autoanticuerpos que atacan el núcleo de la célula. Existe consenso general en que los autoanticuerpos son responsables de por lo menos algunos aspectos de SLE. Se contempla que nuevas terapias que agotan el linaje

de célula B, permite al sistema inmune para restablecer como se generan nuevas células B de los precursores, ofrecerían durante un largo tiempo beneficio en pacientes SLE.

[0116] La enfermedad de Crohn y una enfermedad relacionada, colitis ulcerativa, son las dos categorías de enfermedad principales que pertenecen a un grupo de enfermedades llamadas enfermedad inflamatoria del intestino (IBD). La enfermedad de Crohn es un trastorno crónico que causa inflamación del tubo digestivo o gastrointestinal (GI). Aunque este puede involucrar cualquier área del tubo GI desde la boca al ano, este afecta más comúnmente el intestino delgado y/o colon. En colitis ulcerativa, el involucramiento del GI se limita al colon. La esclerosis múltiple (MS) también es una enfermedad autoinmune. Esta se caracteriza por inflamación del sistema nervioso central y destrucción de mielina, que aísla las fibras de la célula nerviosa en el cerebro, médula ósea, y cuerpo. Aunque se desconoce el origen de MS, se considera ampliamente que las células T autoinmunes son contribuidores principales para la patogenia de la enfermedad. Sin embargo, están presentes altos niveles de anticuerpos en el fluido cerebro espinal de los pacientes con MS, y algunas teorías predicen que la respuesta de célula B- que conduce a la producción de anticuerpo es importante para mediar la enfermedad. El curso del MS es difícil de predecir, y la enfermedad puede algunas veces encontrarse inactiva o en progreso constante. Se han descritos subtipos severos, o patrones de progresión, que son relevante no solo para pronóstico sino también para decisiones terapéuticas. Recidivante-remitente describe el curso inicial de 85% a 90% de individuos con MS. Este subtipo se caracteriza por ataques impredecibles (recaídas) seguido por periodos de meses a años de descanso relativo (remisión) sin nuevos signos de actividad de la enfermedad. Los déficits sufridos durante los ataques pueden ser resueltos o pueden ser

permanentes. Cuando los déficits siempre se resuelven entre los ataques, esto se refiere como MS "benigno". El progreso secundario describe alrededor de 80% de aquellos con MS que remite recaída inicial, quien luego empieza a tener decline neurológico entre sus ataques agudos sin ninguno de los periodos definidos de remisión. Este decline pueden incluir nuevos síntomas neurológicos, función cognitiva empeorada, u otros déficits. El progreso secundario es el tipo más común de MS y origina la cantidad mayor de discapacidad. El progreso primario describe aproximadamente 10% de individuos quienes nunca tienen remisión después de sus síntomas MS iniciales. El decline ocurre continuamente sin ataques claros. El subtipo progresivo primario tiende a afectar personas mayores con inicio de la enfermedad. La recaída progresiva describe aquellos individuos quienes, a partir del inicio de su MS, tienen un declinamiento neurológico constante pero también sufren de ataques sobrepuestos; y es por lo menos común en todos los subtipos.

[0117] La enfermedad de Crohn se puede caracterizar por anticuerpos contra antígenos de neutrófilo, es decir, el "anticuerpo perinuclear anti-neutrófilo" (pANCA), y Saccharomyces cervisiae, es decir el "anticuerpo anti-Saccharomyces cervisiae " (ASCA). Muchos pacientes con colitis ulcerativa tienen el anticuerpo pANCA en su sangre, pero no el anticuerpo ASCA, aunque muchos pacientes con Crohn exhiben anticuerpos ASCA, y no anticuerpos pANCA. Un método para evaluar la enfermedad de Crohn es utilizar el Índice de Actividad de la enfermedad de Crohn (CDAI), con base en 18 clasificaciones variables predictoras por los médicos. Los valores CDAI de 150 y más se asocian con enfermedad latente; los valores anteriores que indican enfermedad activa, y valores anteriores 450 se ven con enfermedad extremadamente severa (Best, et al., "Development of a Crohn's disease activity index." Gastroenterology 70:439-444, 1976. Sin embargo, a pesar

del estudio original, algunos investigadores utilizan un 'valor subjetivo' de 200 a 250 como un puntaje saludable.

[0118] Los resultados de la enfermedad tiroidea autoinmune de la producción de autoanticuerpos que estimulan la tiroides para originar hipertiroidismo (enfermedad de Graves) o destruir la tiroides para originar hipotiroidismo (toroiditis de Hashimoto). La estimulación de la tiroides se origina por autoanticuerpos que unen y activan el receptor de la hormona que estimula la tiroides (TSH). La destrucción de la tiroides se origina por autoanticuerpos que reaccionan con otros antígenos tiroideos.

[0119] El síndrome de Sjogren es una enfermedad autoinmune caracterizada por la destrucción de las glándulas que producen humectación en el cuerpo.

[0120] El púrpura trombocitopénico inmune (ITP) se origina por autoanticuerpos, que unen a las plaquetas sanguíneas y originan su destrucción.

[0121] Miastenia Gravis (MG) es un trastorno neuromuscular autoinmune crónico caracterizado por autoanticuerpos que unen a los receptores acetilcolina que expresan junciones neuromusculares que conducen a debilitamiento de los grupos de músculos voluntario.

[0122] Soriasis, se caracteriza por inflamación autoinmune en la piel y también asociado con artritis en 30% de los casos.

[0123] También se contempla el tratamiento de miopatía inflamatoria idiopática (IIM), que incluye dermatomiositis (DM) y polimiositis (PM). Las miopatías

inflamatorias se han categorizado utilizando un número de esquemas de clasificación. El esquema de clasificación Miller (Miller, Rheum Dis Clin North Am. 1994, 20:811-826) identifica 2 miopatías inflamatorias idiopáticas (IIM), polimiositis (PM) y dermatomiositis (DM).

[0124] La Polimiositis y dermatomiositis son enfermedades inflamatorias debilitantes crónicas que involucran el músculo, en el caso de DM, la piel. Estos trastornos son raros, con una incidencia anual reportada de aproximadamente 5 a 10 casos por millón de adultos y 0.6 a 3.2 casos por millón de niños por año en los Estados Unidos (Targoff, Curr Probl Dermatol. 1991, 3:131-180). La miopatía inflamatoria idiopática se asocia con morbilidad y mortalidad significativa, con hasta la mitad de adultos afectados notados por tener deterioro significativo sufrido (Gottdiener et al., Am J Cardiol. 1978, 41:1141-49). Miller (Rheum Dis Clin North Am. 994, 20:81 1-826 y Arthritis and Allied Conditions, Ch. 75, Eds. Koopman y Moreland, Lippincott Williams y Wilkins, 2005) establece cinco grupos de criterios utilizados para diagnosticar HM, es decir, evaluación de Criterios de Miopatía Inflamatoria Idiopática (IIMC), que incluye debilidad del músculo, evidencia de biopsia de músculo de degeneración, elevación de niveles de suero de enzimas asociadas con músculo, triada electromagnética de miopatía, evidencia de erupciones en dermatomiositis, y también incluye evidencia de autoanticuerpos como un criterio secundario.

[0125] Los factores asociados IIM, que incluyen enzimas asociadas con músculo y autoanticuerpos incluyen, pero no se limitan a, quinasa creatina (CK), deshidrogenasa lactato, aldolasa, proteína reactiva C, aminotransferasa aspartato (AST), aminotransferasa alanina (ALT), y autoanticuerpo antinuclear (ANA),

anticuerpos específicos miositis (MSA), y anticuerpo para extraer antígenos nucleares de la tabla.

V. Composiciones Farmacéuticas y Métodos de Administración

[0126] En otro aspecto de la invención, una molécula de unión específica CD20 de la invención se administra como una composición farmacéutica. Para administrar una molécula de unión específica CD20 a humanos o animales de prueba, es preferible formular la molécula de unión en una composición que comprende uno o más portadores farmacéuticamente aceptables. La frase "farmacéuticamente o farmacológicamente aceptable" se refiere a entidades moleculares y composiciones que no producen reacciones alérgicas, u otras reacciones cuando se administra utilizando rutas bien conocidas en la técnica, como se describe adelante. "portadores farmacéuticamente aceptables " incluyen cualquiera y todos los disolventes clínicamente útiles, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes de retraso de la absorción e isotónicos y similares.

[0127] Adicionalmente, los compuestos puede formar solvatos con agua o disolventes orgánicos comunes. Tales solvatos se contemplan bien.

[0128] Las composiciones de molécula de unión específica CD20 se pueden administrar oralmente, tópicamente, transdérmicamente, parenteralmente, mediante rociado por inhalación, vaginalmente, rectalmente, o mediante inyección intracraneal. El término parenteral como se utiliza aquí incluye inyecciones subcutáneas, intravenosas, intramusculares, inyección intracisternal, o técnicas de infusión. La administración mediante inyección intravenosa, intradérmica,

intramuscular, intramamaria, intraperitoneal, intratecal, retrobulbar, intrapulmonar y o implantación quirúrgica a un sitio particular se contempla bien. Generalmente, las composiciones están esencialmente libres de pirógenos, así como también otras impurezas que pueden ser perjudiciales para el receptor. En ciertas modalidades, se prefiere inyección, especialmente intravenosa.

[0129] Las composiciones farmacéuticas de la presente invención contienen una molécula de unión específica CD20 que se utiliza en un método de la invención pueden contener portadores o aditivos farmacéuticamente aceptables que dependen de la ruta de administración. Ejemplos de tales portadores o aditivos incluyen agua, un disolvente orgánico farmacéuticamente aceptable, colágeno, alcohol polivinílico, povidona, un polímero carboxivinilo, carboximetilcelulosa de sodio, sodio poliacrílico, alginato de sodio, dextrano soluble en agua, almidón de sodio carboximetilo, pectina, metilcelulosa, etilcelulosa, goma xantano, goma arábiga, caseína, gelatina, agar, diglicerina, glicerina, propilenglicol, polietilenglicol, Vaselina, parafina, alcohol estearilo, ácido esteárico, albúmina de suero humana (HSA), manitol, sorbitol, lactosa, un tensoactivo farmacéuticamente aceptable y similares. Los aditivos utilizados se seleccionan de, pero no se limitan a, los anteriores o combinaciones de los mismos, como sea apropiado, que depende de la forma de dosificación de la presente invención.

[0130] La Formulación de la composición farmacéutica variará de acuerdo con la ruta de administración seleccionada (por ejemplo, solución, emulsión). Por ejemplo, una composición apropiada que comprende un anticuerpo anti-CD20 (o el fragmento de unión CD20 del mismo, tal como un SMIP) a ser administrado se puede preparar en una vehículo o portador fisiológicamente aceptable. Para soluciones o emulsiones, los portadores adecuados incluyen, por ejemplo,

soluciones acuosas o alcohólicas/acuosas, emulsiones o suspensiones, que incluye solución salina y medio amortiguado. Los vehículos parenterales pueden incluir solución de cloruro de sodio, dextrosa de Ringer, dextrosa y cloruro de sodio. Ringer lactado o aceites fijos. Los vehículos intravenosos pueden incluir varios aditivos, conservantes, o fluido, nutrientes o reforzadores de electrolito.

[0131] Una variedad de portadores acuoso, por ejemplo, agua, agua amortiguada, 0.4% de solución salina, 0.3% glicina, o las suspensiones acuosas pueden contener el compuesto activo en mezcla con excipientes adecuados para la fabricación de suspensiones acuosas. Tales excipientes son agentes de suspensión, por ejemplo carboximetilcelulosa de sodio, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, alginato de sodio, povidona, goma tragacanto y goma acacia; agentes humectantes o de dispersión pueden ser una fosfatida de ocurrencia natural, por ejemplo lecitina, o productos de condensación de un óxido alquileno con ácidos grasos, por ejemplo estearato polioxietileno, o productos de condensación de óxido de etileno con alcoholes alifáticos de cadena larga, por ejemplo heptadecaetil-eneoxicetanol, o productos de condensación de óxido de etileno con ésteres parciales derivados de ácidos grasos y un hexitol tal como polioxietilen sorbitol monooleato, o productos de condensación de óxido de etileno con ésteres parciales derivados de ácidos grasos y anhídridos hexitol, por ejemplo polietileno monooleato sorbitan. Las suspensiones acuosas también pueden contener uno o más conservantes, por ejemplo etilo, o n-propilo, p-hidroxibenzoato.

[0132] La composición de la molécula de unión específica CD20 se puede liofilizar para almacenamiento y reconstituir en un portador adecuado antes de uso. Esta técnica se ha mostrado por ser efectiva con inmunoglobulinas convencionales. Se

pueden emplear cualesquier técnicas de reconstitución y liofilización adecuadas. Se apreciará por aquellos expertos en la técnica que la liofilización y reconstitución puede conducir a varios grados de pérdida de actividad de anticuerpo y que los niveles utilizados se pueden ajustar para compensar.

[0133] Los polvos dispersables y gránulos adecuados para la preparación de una suspensión acuosa mediante la adición de agua proporciona el compuesto activo en mezcla con un agente humectante o de dispersión, agente de suspensión y uno o más conservantes. Los agentes humectante o de dispersión adecuados y agentes de suspensión se ejemplifican por aquellos ya mencionados anteriormente.

[0134] La concentración de la molécula de unión específica CD20 en estas formulaciones puede variar ampliamente, por ejemplo de menos de aproximadamente 0.5%, usualmente a o por lo menos aproximadamente 1% a tanto como 15 o 20% en peso y se seleccionará principalmente con base en volúmenes de fluido, viscosidades, etc., de acuerdo con el modo particular de administración seleccionado. Así, una composición farmacéutica típica para inyección parenteral se puede hacer por contener 1 ml de agua amortiguada estéril, y 50 mg de anticuerpo. Una composición típica para infusión intravenosa se puede hacer por contener 250 ml de solución de Ringer estéril, y 150 mg de anticuerpo. Los métodos actuales para preparar composiciones administrables parenteralmente se conocerán o serán evidentes para aquellos expertos en la técnica y se describen en más detalle en, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Science, 15th ed., Mack Publishing Company, Easton, Pa. (1980). Una dosificación efectiva de anticuerpo está dentro del rango de 0.01 mg a 1000 mg por kg de peso corporal por administración.

[0135] Las composiciones farmacéuticas pueden estar en la forma de una suspensión oleaginosa, acuosa inyectable estéril, dispersiones o polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. La suspensión se puede formular de acuerdo con la técnica conocida utilizando aquellos agentes humectantes o de dispersión adecuados y agentes de suspensión que se han mencionado anteriormente. La preparación inyectable estéril también puede ser una solución o suspensión inyectable estéril en un diluyente o disolvente parenteralmente no tóxico, por ejemplo como una solución en 1,3-butane diol. El portador puede ser un disolvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, y polietilenglicol líquido, y similares), mezclas adecuadas de los mismos, aceites vegetales, solución de Ringer y solución de cloruro de sodio isotónica. Adicionalmente, los aceites fijos, estériles se emplean convencionalmente como un disolvente o medio de suspensión. Para este propósito cualquier aceite fijo blanda se puede emplear que incluye mono- o diglicéridos sintéticos. Adicionalmente, los ácidos grasos tal como ácido oleico encuentran uso en la preparación de inyectables.

[0136] En todos los casos la forma puede ser estéril y puede ser fluida al grado que existe sociabilidad fácil. Se puede mantener fluidez propia, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento, tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersión y mediante el uso de tensoactivos. Esto debe ser estable bajo las condiciones de fabricación y almacenamiento y se puede preservar contra la acción contaminante de microorganismos, tal como bacterias y hongos. La prevención de la acción de los microorganismos se puede traer aproximadamente mediante varios agentes

antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal, y similares. En muchos casos, será deseable incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares o cloruro de sodio. La absorción prolongada de las composiciones inyectables se puede lograr aproximadamente mediante el uso en las composiciones de agentes de retraso de la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

[0137] Las composiciones útiles para administración se pueden formular con toma o mejoradores de absorción para incrementar su eficacia. Tales mejoradores incluyen por ejemplo, salicilato, glicocolato/linoleato, glicolato, aprotinina, bacitracina, SDS, caprato y similares. Ver, por ejemplo, Fix (J. Pharm. ScL, 85:1282-1285, 1996) y Oliyai y Stella (Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol., 32:521-544, 1993).

[0138] Adicionalmente, las propiedades de hidrofilicidad e hidrofobocidad de las composiciones contempladas para uso en la invención son bien balanceadas, por lo tanto mejoran su utilizada para usos in vitro y especialmente in vivo, aunque otras composiciones que carecen de tal balance son de sustancialmente menos utilidad. Específicamente, las composiciones contempladas para uso en la invención tienen un grado apropiado de solubilidad en medio acuoso que permite la absorción y biodisponibilidad en el cuerpo, aunque también tiene un grado de solubilidad en los lípidos que permite a los compuestos recorrer la membrana celular a un sitio putativo de acción. Así, las composiciones de anticuerpo composiciones contempladas son de forma máxima efectivas cuando ellos se pueden suministrar al sitio de actividad de antígeno objetivo.

[0139] En un aspecto, los métodos de la invención incluyen una etapa de administración de una composición farmacéutica que comprende una molécula de unión específica CD20 de la invención.

[0140] Los métodos de la invención se desarrollan utilizando cualquier medio médicamente aceptado para introducir un terapéutico directamente o indirectamente en un sujeto mamífero, que incluye pero no se limita a inyecciones, ingestión oral intranasal, administración tópica, transdérmica, parenteral, rociado por inhalación, vaginal, o rectal. El término parenteral como se utiliza aquí incluye inyecciones subcutáneas, intravenosas, intramusculares, e intracisternales, así como también catéter o técnicas de infusión. La administración mediante, inyección intradérmica, intramamaria, intraperitoneal, intratecal, retrobulbar, intrapulmonar, epidural, y o implante quirúrgico en un sitio particular se contempla bien. Las composiciones farmacéuticas para administración oral o transmucosal pueden estar en forma de composición sólida o líquido.

[0141] En ciertas modalidades, una composición farmacéutica se formula por ser compatible con su ruta pretendida de administración. Las soluciones o suspensiones utilizadas para aplicación parenteral, intradérmica, o subcutánea puede incluir los siguientes componentes: un diluyente estéril tal como agua para inyección, solución salina, aceites fijos, polietilenglicoles, glicerina, propilenglicol o otros disolventes sintéticos; agentes antibacterianos tal como alcohol bencilo o parabenos metilo; antioxidantes tal como ácido ascórbico o bisulfito de sodio; agentes quelantes tal como ácido etilenodiaminatetraacético; amortiguadores tal como acetatos, citratos o fosfatos y agentes para el ajuste de tonicidad tal como cloruro de sodio o dextrosa. El pH se puede ajustar con ácidos o bases, tal como ácido clorhídrico o hidróxido de sodio. La preparación parenteral se puede

encerrar en ampollas, jeringas desechables o frascos de múltiples dosis hechas de vidrio o plástico.

[0142] Las soluciones o suspensiones utilizadas para aplicación subcutánea incluyen típicamente uno o más de los siguientes componentes: un diluyente estéril tal como agua para inyección, solución salina, aceites fijos, polietilenglicoles, glicerina, propilenglicol o otros disolventes sintéticos; agentes antibacterianos tal como alcohol bencilo o metil parabenos; antioxidantes tal como ácido ascórbico o bisulfito de sodio; agentes quelantes tal como ácido etilenodiaminatetraacético; amortiguadores tal como acetatos, citratos o fosfatos; y agentes para el ajuste de la tonicidad tal como cloruro de sodio o dextrosa. El pH se puede ajustar con ácidos o bases, tal como ácido clorhídrico o hidróxido de sodio. Tales preparaciones se pueden encerrar en ampollas, jeringas desechables o frascos de múltiples dosis hechos de vidrio o plástico. En algunas modalidades, la molécula de unión CD20 está en forma de dosificación liofilizada y puede comprender adicionalmente uno o más de los siguientes excipientes: L-histidina, L-metionina, sacarosa, y polisorbato 80.

[0143] También se contempla la terapia subcutánea utilizando una composición farmacéutica de la presente invención. Estas terapias se pueden administrar diariamente, semanalmente, o, más preferiblemente, bisemanalmente, o mensualmente. Ultimadamente el médico que atiende decidirá la duración apropiada de terapia intravenosa, o subcutánea, o terapia con una molécula pequeña, y el tiempo de administración de la terapia, utilizando la composición farmacéutica de la presente invención.

[0144] En una modalidad de ejemplo, para suministrar una dosificación alta subcutánea, en la que la limitación de volumen es pequeña (por ejemplo, aproximadamente 1-1.2 ml por inyección), la concentración de molécula de unión CD20 es generalmente 100 mg/ml o más.

[0145] En otras modalidades, se desarrolla administración en el sitio de un cáncer o tejido afectado que necesita tratamiento mediante inyección directa en el sitio o por vía de un mecanismo de liberación sostenida o liberación sostenida, que puede suministrar la Formulación internamente. Por ejemplo, microesferas biodegradables o cápsulas u otras configuraciones de polímero biodegradables capaces de liberación sostenida de una composición (por ejemplo, un polipéptido soluble, anticuerpo, o molécula pequeña) se puede incluir en las Formulaciones de la invención implantadas cerca al cáncer.

[0146] Las composiciones terapéuticas también se pueden suministrar al paciente en múltiples sitios. Las múltiples administraciones se pueden presentar simultáneamente o se pueden administrar durante un periodo continuo.

[0147] También se contempla en la presente invención la administración de una composición de molécula de unión específica CD20 en conjunto con un segundo agente. Los segundos agentes contemplados por la invención se listan en los párrafos adelante.

[0148] Un segundo agente puede ser una molécula asociada con célula B. Otras moléculas asociadas con células B contempladas por la invención incluyen moléculas de unión que unen a moléculas de superficie de células B que no son CD20. Las moléculas asociadas con células B incluyen, pero no se limitan a, CD

19 (antígeno CD19 de linfocito B, también denominado como antígeno B4 de superficie de linfocito B, o Leu- 12), CD21 , CD22 (CD22 de receptor de célula B, también denominado como Leu- 14, molécula de adhesión celular de linfocito B, o BL-CAM), CD23, CD37, CD40 (antígeno CD40 de superficie celular, también denominado como miembro de la superfamilia del receptor de Necrosis de tumor 5, receptor CD40L, o Bp50), CD80 (antígeno CD80 de activación de linfocito T, también denominado como Antígeno de activación B7-1, B7, B7-1, o BBI), CD86 (antígeno CD86 de activación de linfocito T, también denominado como Antígeno de activación B7-2, B70, FUN-I, o BU63), CD137 (también denominado como Miembro de la superfamilia del receptor del Factor de Necrosis de Tumor 9), CD 152 (también denominado como proteína 4 de linfocito T citotóxica o CTLA-4), L6 (antígeno L6 asociado a tumor, también denominado como Miembro 1 de la superfamilia 4 de transmembrana, componente de membrana de marcador de superficie 1, o M3S1), CD30 (antígeno de activación de linfocito CD30, también denominado como Miembro de la superfamilia del receptor del Factor de Necrosis de Tumor 8, CD30L receptor, o Ki-I), CD50 (también denominado como molécula-3 de adhesión intracelular (ICAM3), o ICAM-R), CD54 (también denominado como molécula- 1 de adhesión intracelular (ICAMI), o receptor rinovirus del grupo principal), B7- HI (ligando para un receptor inmunoinhibidor expresado por células T activado, células B, y células mieloides, también denominado como PD-LI; ver Dong, et al., "B7-H1, a third member of the B7 family, co-stimulates T-cell proliferation and interleukin-10 secretion," Nat. Med. 1999, 5:1365-1369), CD134 (también denominado como Miembro de la superfamilia del receptor del Factor de Necrosis de Tumor 4, OX40, receptor OX40L, antígeno ACT35, o receptor 1 de glucoproteína activada transcripcionalmente TAX), 41BB (receptor de ligando 4-IBB, antígeno 4- IBB de célula T, o antígeno ILA de célula T), CD 153 (también denominado como Miembro de la superfamilia de ligando de Factor de Necrosis

de Tumor 8, ligando CD30, o CD30-L), CD 154 (también denominado como Miembro de la superfamilia de ligando de Factor de Necrosis de Tumor 5, proteína de activación relacionada con TNF, TRAP, o antígeno Gp39 de célula T) y receptores Toll. La lista anterior de objetivos de construcción y/o antígenos objetivo es de ejemplo solamente y no es exhaustivo.

[0149] Ejemplos de agentes quimioterapéuticos contemplados como segundos agentes incluyen, pero no se limitan a agentes alquilatantes, tal como mostazas de nitrógeno (por ejemplo, mecloretamina, ciclofosfamida, ifosfamida, melfalan, y clorambucil); nitrosoureas (por ejemplo, carmustina (BCNU), lomustina (CCNU), y semustina (metil-CCNU)); etileniminas y metil-melaminas (por ejemplo, trietilenomelamina (TEM), trietileno tiofosforamida (tiotepa), y hexametilmelamina (HMM, altretamina)); sulfonatos alquilo (por ejemplo, buslfan); y triazinas (por ejemplo, dacabazina (DTIC)); antimetabolitos, tal como análogos de ácido fólico (por ejemplo, metotrexato, trimetrexato, y pemetrexed (antifolato multiobjetivo)); análogos pirimidina (tal como 5-fluorouracil (5-FU), fluorodeoxiuridina, gemcitabina, citosina arabinosida (AraC, citarabina), 5-azacitidina, y 2,2'-difluorodeoxicitidina); y análogos purina (por ejemplo, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, azatioprina, 2'-deoxicoformicina (pentostatin), eritrohidroxinoniladenina (EHNA), fludarabina fosfato, 2-clorodeoxiadenosina (cladribina, 2-CdA)); inhibidores topoisomerasa tipo I tal como camptotecina (CPT), topotecan, y irinotecan; ciertos productos naturales, tal como epipodofilotoxinas (por ejemplo, etoposida y teniposida); y alcaloides vinca (por ejemplo, vinblastina, vincristina, y vinorelbina); antibióticos anti-tumor tal como actinomicina D, doxorubicina, y bleomicina; ciertos radiosensibilizadores tal como 5-bromodeoziuridina, 5-yododeoxiuridina, y bromodeoxicitidina; complejos de coordinación de platino tal como cisplatina, carboplatina, y oxaliplatina; ureas sustituidas, tal como

hidroxiurea; y derivados metilhidrazina tal como N-metilhidrazina (MIH) y procarbazina.

[0150] Ejemplos no limitantes de agentes quimioterapéuticos, agentes radioterapéuticos y otros agentes activos y ancilares también se muestran en la Tabla 1.

TABLA 1

Agentes alquilatantes	Productos Naturales
Mostazas de nitrógeno	Fármacos antimicóticos
mecloretamina	
ciclofosfamida	
ifosfamida	Taxanos
melfalán	paclitaxel
clorambucil	alcaloides vinca
	vinblastina (VLB)
Nitrosoureas	vincristina
carmustina (BCNU)	vinorelbina
lomustina (CCNU)	Taxotere ® (docetaxel)
semustina (metil-CCNU)	estramustina
	fosfato de estramustina
Etilenimina/Metil-melamina	
trietilenomelamina (TEM)	Epipodofilotoxinas
trietileno tiofosforamida (tiotepa)	etoposida
hexametilmelamina	teniposida
(HMM, altretamina)	
	Antibióticos
Sulfonatos alquilo	actimomicina D
busulfan	daunomicina (rubido-micina)
	doxorubicina (adria-micina)
Tazinas	mitoxantroneidarubicina
dacarbazina (DTIC)	bleomicina

splicamicina (mitramicina)
mitomicinaC
dactinomicina
afidicolina

Antimetabolitos
Análogos de ácido fólico
metotrexato
Trimetrexato
Pemetrexed
(antifolato multiobjetivo)

Enzimas
L-asparaginasa
L-arginasa

Análogos pirimidina
5-fluorouracilo
fluorodeoxiuridina
gemcitabina
citosina arabinosida
(AraC, citarabina)
5-azacitidina
2,2'- difluorodeoxi-citidina

Radiosensibilizadores
metronidazol
misonidazol
desmetilmisonidazol
pimonidazol
etanidazol
nimorazol
RSU 1069
EO9
RB 6145
SR4233
nicotinamida
5-bromodeoziuridina
5 -yododeoxiuhdina
bromodeoxicitidina

Análogos purina
6-mercaptopurina
6-tioguanina
azatioprina
2'-deoxicoformicina
(pentostatina)
eritrohidroxinonil-adenina (EHNA)
fosfato de fludarabina
2-clorodeoxiadenosina
(cladribina, 2-CdA)

Agentes misceláneos
Complejos de coordinación de platino
cisplatina
Carboplatina
oxaliplatina
Antracenediona
Mitoxantrona

Inhibidores topoisomerasa tipo I
Camptotecina
topotecán
irinotecán

Urea sustituida
hidroxiurea

Modificadores de la respuesta biológica
G-CSF

GM-CSF

Agentes de diferenciación
Derivados de ácido retinoico

Hormonas y antagonistas
Adrenocorticosteroides/antagonistas
prednisona y equivalentes
dexametasona
ainoglutetimida

Progestinas
Caproato hidroxiprogesterona
Acetato de medroxiprogesterona
Acetato de megestrol

Estrógenos
dietilestilbestrol
etinil estradiol/ equivalentes

Antiestrógeno
tamoxifen

Andrógenos
Propionato de testosterona
fluoximesterona/equivalentes

antiandrógenos
flutamida
gonadotropina liberada
análogos de hormona
leuprolida

Antiandrógenos no esteroides
Flutamida

Derivados metilhidrazina
N-metilhidrazina (MIH)
Procarbazina

Supresores adrenocorticales
mitotana (o,p'- DDD)
ainoglutetimida

citoquinas
interferón (α, β, γ)
interleuquina-2

Fotosensibilizadores
Derivados hematoporfirina
Photofrin®
Derivados benzoporfirina
Npe6
Etioporfirina estaño (SnET2)
feoborida-a
bacterioclorófilo-a
naftalocianinas
ftalocianinas
ftalocianinas de zinc

Radiación
Rayos x
Luz ultravioleta
Radiación gama
Luz visible
Radiación infrarrojo
Radiación de microondas

[0151] Los segundos agentes contemplados por la invención para el tratamiento de enfermedades autoinmunes también pueden incluir agentes inmunosupresores, que actúan para suprimir o enmascarar el sistema inmune del individuo a ser tratado. Los agentes inmunosupresores incluyen, por ejemplo, fármacos antiinflamatorios no esteroides (NSAID), analgésicos, glucocorticoides, fármacos que modifican la enfermedad (DMARD) para el tratamiento de artritis, o modificadores de la respuesta biológica. Las composiciones en la descripción DMARD son también útiles en el tratamiento de muchas otras enfermedades autoinmunes de RA.

[0152] Los NSAID de ejemplo se seleccionan del grupo que consiste de ibuprofeno, naproxeno, naproxeno sodio, inhibidores Cox-2 tal como VIOXX® y CELEBREX®, y sialilatos. Los analgésicos de ejemplo se seleccionan del grupo que consiste de acetaminofén, oxicodona, clorhidrato de tramadol de propoxifeno. Los glucocorticoides de ejemplo se seleccionan del grupo que consiste de de cortisona, dexametosona, hidrocortisona, metilprednisolona, prednisolona, o prednisona. Modificadores de la respuesta biológica de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, moléculas dirigidas contra marcadores de la superficie celular (por ejemplo, CD4, CD5, CTLA4, etc.), abatacept, inhibidores de citoquina, tal como los antagonistas TNF (por ejemplo etanercept (ENBREL®), adalimumab (HUMIRA®), y infliximab (REMICADE®)), inhibidores quimioquina e inhibidores de molécula de adhesión. Los modificadores de la respuesta biológica incluyen anticuerpos monoclonales así como también formas recombinantes de moléculas. Los DMARD de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, azatioprina, ciclofosfamida, ciclosporina, metotrexato, penicilamina, leflunomida, sulfasalazina, hidroxicloroquina, Gold [(auranofina)oral e intramuscular] y minociclina. Así, por ejemplo, las proteínas de unión de la presente invención se pueden utilizar para el tratamiento de RA en

combinación con DMARD tal como metotrexato (MTX), sulfasalazina (SSZ) o leflunomida (LEF); para el tratamiento de lupus (SLE) con DMARD, esteroides, ciclofosfamida o CELLCEPT®; y para el tratamiento de MS con varios agentes que modifican la enfermedad tal como interferones (interferón beta- la (AVONEX® y REBIF®) o interferón beta- Ib (BETASERON® o BETAFERON®)), acetato de glatiramer (COPAXONE®), mitoxantrona, o natalizumab (TYSABRI®).

[0153] Se contempla que la composición de molécula de unión específica CD20 y el segundo agente se puede dar simultáneamente en la misma formulación. Alternativamente, los agentes se administran en una formulación separada y se administran concurrentemente, con concurrentemente se refiere a los agentes dados dentro de los 30 minutos una con la otra.

[0154] En otro aspecto, el segundo agente se administra antes de la administración de la composición de molécula de unión específica CD20. Antes de administración se refiere a la administración del segundo agente dentro del rango de una semana antes de tratamiento con el anticuerpo, hasta 30 minutos antes de la administración del anticuerpo. Se contempla adicionalmente que el segundo agente se administra posterior a la composición de administración de la molécula de unión específica CD20. La administración posterior significa describir la administración de 30 minutos después de tratamiento con anticuerpo hasta una semana después de la administración del anticuerpo.

[0155] Se contempla adicionalmente que cuando la molécula de unión específica CD20 se administra en combinación con un segundo agente, en donde el segundo agente es una citoquina o factor de crecimiento, o un agente quimioterapéutico, la administración también incluye el uso de un agente radioterapéutico o terapia de

radiación. La necesidad para una terapia de radiación, en combinación con la administración de una composición de la molécula de unión específica CD20 y el segundo agente, se puede determinar por el médico que trata.

[0156] Los candidatos de la composición de molécula de unión específica CD20 en una dosificación dada variará de acuerdo con el tamaño del individuo a quien la terapia se administra así como también las características del trastorno a ser tratado. En tratamientos de ejemplo, es necesario administrar aproximadamente 1 mg/día, aproximadamente 5 mg/día, aproximadamente 10 mg/día, aproximadamente 20 mg/día, aproximadamente 50 mg/día, aproximadamente 75 mg/día, aproximadamente 100 mg/día, aproximadamente 150 mg/día, aproximadamente 200 mg/día, aproximadamente 250 mg/día, aproximadamente 400 mg/día, aproximadamente 500 mg/día, aproximadamente 800 mg/día, aproximadamente 1000 mg/día, aproximadamente 1600 mg/día o aproximadamente 2000 mg/día. Las dosis también se pueden administrar con base en el peso del paciente, en una dosis de 0.01 a 50 mg/kg. En una modalidad relacionada, la molécula de unión específica CD20 se puede administrar en un rango de dosis de 0.015 a 30 mg/kg. En una modalidad adicional, la molécula de unión específica CD20 se administra en una dosis de aproximadamente 0.015, aproximadamente 0.05, aproximadamente 0.15, aproximadamente 0.5, aproximadamente 1.5, aproximadamente 5, aproximadamente 15 o aproximadamente 30 mg/kg.

[0157] Los estudios de respuesta de dosis estándar, primero en modelos de animal y luego en prueba clínico, puede revelar las dosificaciones óptimas para enfermedades particulares y poblaciones de pacientes.

[0158] En ciertas modalidades, la administración de la composición de molécula de unión específica CD20 decrece o reduce la población de células B mediante por lo menos aproximadamente 20% después de tratamiento. En una modalidad, la población de células B se decrece o reduce mediante por lo menos aproximadamente 20, aproximadamente 30, aproximadamente 40, aproximadamente 50, aproximadamente 60, aproximadamente 70, aproximadamente 80, aproximadamente 90 o aproximadamente 100%. El agotamiento células B se define como una reducción en el conteo de células B absoluto por debajo del límite inferior del rango normal. La recuperación de células B se define como un regreso de conteo de células B absoluto de lo siguiente: 1) 70% de valores iniciales del sujeto; o 2) rango normal.

[0159] En ciertas modalidades, la administración de la composición de molécula de unión específica CD20 también resulta en mejoramiento de apoptosis en particular los subconjuntos de célula B. Apoptosis se refiere a la inducción de muerte celular programa de una célula, manifestado y evaluado mediante fragmentación de ADN, contracción celular, fragmentación celular, formación de vesículas de membrana, o alteración de composición lípida de membrana como se evalúa por teñido V anexina.

[0160] En ciertas modalidades, la administración de la composición de molécula de unión específica CD20 resulta en efectos clínicos deseados en la enfermedad o trastorno a ser tratado. Por ejemplo, en los pacientes afectados por artritis reumatoide, la administración de una molécula CD20 de la invención mejora la afección del paciente mediante una cantidad clínicamente significativa [por ejemplo, lograda por the American College of Rheumatology Preliminary Detection of Improvement (ACR20)], y/o un mejoramiento de 20% en articulaciones

inflamadas y sensibles y 20% mejoramiento en 3/5 de las mediciones ACR restantes (Felson et al., Arthritis Rheum. 1995, 38:727- 35). Las mediciones biológicas para el mejoramiento en un paciente RA después de la administración de una molécula de unión específica CD20 incluye la medición de cambios en los niveles de citoquina, medido por vía de proteína o niveles de ARN. Las citoquinas de interés incluyen, pero no se limitan a, TNF-α, IL-I, interferones, Blys, y APRIL. Los cambios de citoquina pueden ser debido a la reducción del número de células B o reducir las células T activadas. En pacientes RA, los marcadores relevantes para renovación ósea (resorpción o erosión ósea) se miden antes de y después de la administración de la molécula de unión específica CD20. Los marcadores relevantes incluyen, pero no se limitan a, fosfatasa alcalina, osteocalcina, fragmentos de rompimiento de colágeno, hidroxiprolina, fosfatasa de ácido resistente a tartrato, y ligando RANK (RANKL). Otras lecturas relevantes para el mejoramiento de RA incluyen la medición de los niveles de proteína reactiva C (CRP), velocidad de sedimentación de eritrocito (ESR), factor reumatoide, CCP (péptido citrulinado cíclico) anticuerpos y evaluación de niveles de células B sistémicos y conteo de linfocito por vía de citometría de flujo. Los factores específico también se pueden medir de la membrana sinovial de pacientes RA, que incluye la evaluación de los niveles de células B en membrana sinovial de biopsia de membrana sinovial, niveles de RANKL y otras factores óseos y las citoquinas establecidas anteriormente. Los biomarcadores adicionales para RA incluyen CRP y SAA.

[0161] En un aspecto relacionado, los efectos de la molécula de unión específica de tratamiento CD20 en otras enfermedades se mide de acuerdo con estándares conocidos en la técnica. Por ejemplo, se contempla que los pacientes con enfermedad de Crohn que reciben tratamiento con una molécula de unión

específica CD20 alcanzan un mejoramiento en el Índice de Actividad de Enfermedad de Crohn (CDAI) en el rango de aproximadamente 50 a aproximadamente 70 unidades, en donde la remisión es a 150 unidades (Simonis et al, Scand. J Gastroent. 1998, 33:283-8). Se considera un puntaje de 150 o 200 normal, aunque un puntaje de 450 se considera un puntaje de enfermedad severa. Es deseable adicionalmente que los resultados de la administración de la molécula de unión específica CD20 en una reducción en anticuerpo antineutrófilo perinuclear (pANCA) y anticuerpo anti-Saccharomyces cervisiae (ASCA) en individuos afectados por enfermedad inflamatoria del intestino.

[0162] Se contempla adicionalmente que pacientes adultos o juveniles con miositis que reciben tratamiento con una molécula de unión específica CD20 de la invención alcanzan un mejoramiento en el establecimiento central de evaluaciones, tal como de 3 a 6 de la medición establecida central mejorada mediante aproximadamente 20%, con no más de 2 de las mediciones centrales empeoradas mediante aproximadamente 25% (ver Rider et al., Arthritis Rheum. 2004, 50:2281-90).

[0163] Se contempla adicionalmente que los pacientes SLE que reciben tratamiento con una molécula de unión específica CD20 de la invención alcanzan un mejoramiento en la Medición de la clasificación de Actividad de Lupus Sistémico (SLAM) o Índice de Actividad de Enfermedad SLE (SLEDAI) de por lo menos 1 punto (Gladman et al, J Rheumatol 1994, 21:1468-71) (Tan et al., Arthritis Rheum. 1982, 25:1271- 7). Un puntaje de SLAM de >5, o puntaje de SLEDAI >2, se considera enfermedad clínicamente activa. Una respuesta al tratamiento se puede definir como el mejoramiento o estabilización sobre 2 mediciones de actividad de la enfermedad (el Índice de Actividad de Enfermedad SLE [SLEDAI] y

la Medición de Actividad de Lupus Sistémico) y 2 mediciones de calidad de vida (evaluación global del paciente y la Escala de Severidad de Fatiga Krupp) (Petri et al., Arthritis Rheum. 2004, 50:2858-68.) Es deseable adicionalmente que la administración de la molécula de unión específica CD20 para pacientes SLE resulte en una reducción de anticuerpos de ADN anti-bicatenarios. Alternativamente, el mejoramiento se puede calibrar utilizando los Criterios de Grupo de Evaluación de Lupus British Isles (BILAG). Los biomarcadores adicionales para SLE incluyen subconjuntos de células B (neófito, memoria, transicional); CD40L; complemento, anti ds-DNA, CIQ; biomarcadores urinarios (TWEAK, MIF). Adicionalmente, con respecto a marcadores de diferenciación, estado FcgammaRIII (alta o baja afinidad) se puede utilizar para correlacionar el agotamiento y eficacia de célula B. La activación de complemento reducido también puede conferir una ventaja segura (con base en la unión de C3a, C4a, Bb).

[0164] Se contempla adicionalmente que pacientes con esclerosis múltiple que reciben tratamiento con una molécula de unión específica CD20 de la invención logran un mejoramiento en la clasificación clínica en la escala de estado de Discapacidad Expandida Kurtzke (EDSS) (Kurtzke, F., Neurology 1983, 33:1444-52) de por lo menos 0.5, o un retraso en el empeoramiento de enfermedad clínica de por lo menos 1.0 en la escala Kurtzke (Rudick et al., Neurology 1997, 49:358-63).

[0165] Se contempla adicionalmente que los pacientes que sufren de HM que reciben tratamiento de una molécula de unión específica CD20 de la invención logran una reducción en por lo menos uno de los cinco criterios establecidos en la evaluación del Criterio de Miopatía Inflamatoria Idiopática (IIMC) (Miller, F., supra).

Se contempla adicionalmente que la administración de una molécula de unión específica CD20 de la invención a pacientes HM resulta en una reducción en factores asociados IIM seleccionados del grupo que consiste de quinasa creatina (CK), dehidrogenasa lactato, aldolasa, proteína reactiva C, aminotransferasa aspartato (AST), aminotransferasa alanina (ALT), y autoanticuerpo antinuclear (ANA), anticuerpo específicos de miositi (MSA), y anticuerpo para anticuerpos nucleares extraíbles. Alternativamente, los pacientes que encuentran 3 de los 6 criterios establecidos en Rider et al., Arthritis Rheum. 2004, 50:2281-90, se pueden someter al tratamiento de acuerdo con la invención, con empeoramiento en no más de 2 criterios.

[0166] En una modalidad todavía adicional, los pacientes que sufren de un cáncer de células B reciben tratamiento con una molécula de unión específica CD20 de la invención y demuestran una respuesta benéfica general a la molécula de unión específica CD20, con base en los criterios clínicos bien conocidos y se utilizan comúnmente en la técnica, y como se describe adelante, tal como una reducción en el tamaño del tumor, reducción en el número de tumor y/o un mejoramiento en los síntomas de la enfermedad.

[0167] Por ejemplo, el Instituto de Cáncer Nacional de los Estados Unidos (NCI) ha dividido algunas de las clases de cánceres en las categorías clínicas de linfomas "indoloro" y "agresivo". Los linfomas indolente incluyen linfomas de célula folicular, separados en citología "grados," linfoma linfocítico pequeño difuso/leucemia linfocítica crónica (CLL), limfoplasmacitoide/Macroglobulinemia de Waldenstrom, linfoma de zona marginal y leucemia de célula Hairy. Los linfomas agresivos incluyen linfoma de célula grande y mezcla difusa, linfoma de Burkitt/linfoma de célula no dividida pequeña difusa, linfoma linfoblástico, linfoma

de célula Mantle y linfoma relacionado con AIDS. En algunos casos, se utiliza el Índice de Pronóstico Internacional (IPI) en casos de linfoma folicular y agresivo. Los factores a considerar en el IPI incluyen la edad (<60 años de edad versus >60 años de edad), deshidrogenada de lactato de suero (niveles normal versus elevado), estado de desempeño (0 o 1 versus 2-4) (ver definición adelante), etapa de la enfermedad (I o II versus III o IV), y involucramiento de sitio extranodal (0 o 1 versus 2-4). Los pacientes con 2 o más factores de riesgo tienen menos de un cambio de 50% de supervivencia general y libre de recaída a 5 años.

[0168] El estado de desempeño en el IPI agresivo se define como sigue: Grado de Descripción: 0 Completamente activo, capaz de llevar en todos el desempeño pre-enfermedad sin restricción; 1 Restringido en actividad físicamente intensa pero ambulatoria y capaz de llevar a cabo trabajo en una naturaleza sedentaria o liviana, por ejemplo, trabajo de casa liviano, trabajo de oficina; 2 Ambulatorio y capaz de autocuidado pero capaz de llevar a cabo cualesquier actividades de trabajo, hasta y aproximadamente más de 50% de horas de marcha; 3 Capaz de solo autocuidado limitado, confinado a cama o silla más de 50% de horas de marcha; 4 Completamente discapacitado, incapaz de llevar cualquier autocuidado, totalmente confinado a cama o silla; y, 5 Muerto. (Ver, The International Non-Hodgkin's Lymphoma Prognostic Factors Project. A predictive model for aggressive non-Hodgkin's Lymphoma. N Engl J Med. 329:987-94, 1993)

[0169] Típicamente, el grado de linfoma se evalúa clínicamente utilizando el criterio que presenta usualmente el linfoma de bajo grado como una enfermedad nodal y es frecuentemente indolente o de crecimiento lento. La enfermedad de alto grado e intermedio se presenta usualmente como una enfermedad mucho más agresiva con tumores abultados extranodales grandes.

[0170] El sistema de clasificación Ann Arbor también se utiliza para medir la progresión de tumores, especialmente linfomas non-Hodgkin. En este sistema, las etapas I, II, III, y IV de adulto NHL se pueden clasificar en categorías A y B dependiendo de si el paciente tiene síntomas generalizados bien definidos (B) o no (A). La designación B se da a los pacientes con los siguientes síntomas: pérdida inexplicable de más de 10% de peso corporal en los 6 meses antes de diagnóstico, fiebre inexplicable con temperaturas por encima de 38° C. y sudores nocturnos excesivos. Las definiciones de las etapas son como sigue: Etapa I-involucramiento de una región de ganglio linfático única o involucramiento localizado de un órgano o sitio extralinfático único. Etapa II-involucramiento de dos o más regiones de ganglio linfático en el mismo del diafragma o involucramiento localizado de un órgano o sitio extralinfático asociado único y sus ganglios linfáticos regionales con o sin otras regiones de ganglio linfático en el mismo lado del diafragma. Etapa III-involucramiento de regiones de ganglio linfático en ambos lados del diafragma, posiblemente acompañamiento localizado de un órgano o sitio extralinfático, involucramiento del bazo, o ambos. Etapa IV- involucramiento diseminado (multifocal) de uno o más sitios extralinfáticos con o sin involucramiento de ganglio linfático asociado o involucramiento de órgano extralinfático aislado con involucramiento nodal distante (no regional). Para detalles adicionales, ver The International Non- Hodgkin's Lymphoma Prognostic Factors Project: A predictive model for aggressive non- Hodgkin's Lymphoma, New England J. Med. (1993) 329:987-994.

[0171] En un aspecto, se determina un efecto terapéutico de la molécula de unión específica CD20 mediante el nivel de respuesta, por ejemplo una respuesta parcial se define como una reducción de tumor de menos de la mitad de su tamaño

original. Una respuesta completa se define como la eliminación total de la enfermedad confirmada por evaluación radiológica o clínica. En una modalidad, los individuos que reciben tratamiento con una molécula de unión específica CD20 de la invención demuestran por lo menos una respuesta parcial al tratamiento.

[0172] De acuerdo con el criterio de Cheson para evaluar el desarrollo de NHL en colaboración con el Instituto Nacional de Cáncer (Cheson et al., J Clin Oncol. 1999, 17:1244; Grillo-Lopez et al., Ann Oncol. 2000, 11 :399-408), se obtiene una respuesta completa cuando existe una desaparición completa de toda la evidencia radiográfica o clínica detectable de enfermedad y síntomas relacionados con la enfermedad, todos los ganglios linfáticos han regresado al tamaño normal, el bazo ha regresado en tamaño, y la médula ósea es clara del linfoma.

[0173] Una respuesta completa no confirmada se obtiene cuando un paciente muestra desaparición completa de la enfermedad y el bazo regresa en tamaño, pero ganglios linfáticos han regresado no más de 75% y la médula ósea es indeterminada. Una respuesta completa no confirmada y excede el criterio para la respuesta parcial. Una respuesta general se define como una reducción de por lo menos 50 por ciento de límite de tumor general.

[0174] Se han desarrollado criterios similares para varias otras formas de cánceres o enfermedades hiperproliferativas y están disponibles fácilmente por una persona experta en la técnica. Ver, por ejemplo, Cheson et al., Clin Adv Hematol Oncol. 2006, 4:4-5, que describe criterios para evaluar CLL; Cheson et al., J Clin Oncol. 2003, 21:4642-9, que describe criterios para AML; Cheson et al., Blood 2000, 96:3671-4, que describe criterios para síndromes mielodisplásicos.

[0175] En otro aspecto, una respuesta terapéutica a una molécula de unión CD20 en los pacientes que tiene cáncer de células B se manifiesta como un retraso de la progresión de la enfermedad comparado con los pacientes que no reciben terapia. La medición de la progresión de la enfermedad lenta o cualquiera de los factores anteriores se pueden llevar a cabo utilizando técnicas bien conocidas en el arte, que incluye exploración ósea, exploración CT, exploración de galio, linfangiograma, MRI, exploraciones PET, ultrasonido, y similares.

[0176] En un aspecto relacionado, para determinar la eficacia del tratamiento de la molécula de unión CD20, se mide el número de células B en una muestra biológica del individuo. En una modalidad, la muestra biológica se selecciona de sangre, biopsia de tumor, ganglios linfáticos, amígdalas, médula ósea, timo y otro tejido rico en linfocito. El tejido rico en linfocito es tejido particularmente rico en células de linfocito, que incluye pero no se limita a, ganglios linfáticos y órganos relacionados (bazo, médula ósea, amígdalas, timo, tejido linfoide mucosal), tumores y áreas de inflamación.

[0177] Será también evidente que dosificación se puede modificar si se administran terapéuticos tradicionales en combinación con terapéuticos de la invención.

[0178] Se contempla adicionalmente que un individuo tratado mediante un método de la invención se puede volver a tratar, por ejemplo, si los síntomas de la enfermedad reaparecen o las farmacocinéticas y/o farmacodinámicos del terapéutico hacen aconsejable el re-tratamiento. En una modalidad, los individuos tratados con una molécula de unión específica CD20 de la invención se administran otras moléculas de unión específica CD20. Con base en el

medianamente experto en la técnica, un médico sería capaz de identificar cuando se indica re-tratamiento con base en, por ejemplo, reaparición de los síntomas de la enfermedad o recuperación de las células B del individuo en un nivel que requiere re-tratamiento. Ejemplos de otras mediciones o marcadores de criterios clínicos y resultados se describen adicionalmente aquí. Un individuo tratado por un método de la invención se puede colocar en un esquema de mantenimiento de tratamiento, en donde el individuo se vuelve a tratar con la molécula de unión específica CD20 con base en propiedades farmacocinéticas/farmacodinámicas de la molécula de unión específica CD20. Tal un tratamiento de mantenimiento típicamente se administra en cualquier forma de aproximadamente tres meses a aproximadamente dos años después del tratamiento inicial. Los datos farmacodinámicos de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, mediciones biológicas para el mejoramiento de la enfermedad como se describe aquí, tal como los niveles de la molécula de unión específica CD20 en suero, mejoramiento en la evaluación de la enfermedad (por ejemplo, mediante ACR, SLAM o IPI), cambio en citoquina o expresión de marcador de superficie, niveles de autoanticuerpos, y cambio en el tamaño de tumor. Se entiende adicionalmente en la técnica que diferencias en las respuestas individuales para tratamiento mediante los métodos de la invención puede necesitar diferencias en el tiempo de re-tratamiento con la molécula de unión específica CD20.

[0179] Como un aspecto adicional, la invención incluye equipos que comprenden uno o más compuestos o composiciones empacadas en una forma que facilita su uso para practicar los métodos de la invención. En una modalidad, tal un equipo incluye un compuesto o composición de molécula de unión específica CD20 descrita aquí (por ejemplo, una composición que comprende una molécula de unión específica CD20 sola o en combinación con un segundo agente), empacada

en un recipiente tal como una botella o recipiente cerrado, con una etiqueta fijada en el recipiente o incluye en el empaque que describe el uso del compuesto o composición en la práctica del método. Preferiblemente, el compuesto o composición se empaca en una forma de dosificación unitaria. El equipo puede incluir adicionalmente un dispositivo adecuado para administrar la composición de acuerdo con una ruta específica de la administración o para practicar un ensayo de detección. Preferiblemente, el equipo contiene una marca que describe el uso de la composición de anticuerpo.

[0180] La presente invención también comprende artículos de fabricación. Tales artículos comprenden por lo menos una molécula de unión específica CD20, opcionalmente junto con un portador o diluyente farmacéutico, y por lo menos una marca que describe un método de uso de la molécula de unión específica CD20 de acuerdo con la invención. Tales artículos de fabricación también pueden comprender opcionalmente por lo menos un segundo agente para la administración en conexión con la molécula de unión específica CD20.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Unión de SMIP anti-CD20 a células B primarias

Células B humanas primarias

[0181] Para determinar la unión de SMIP anti-CD20 a células B primarias, aislamos las células B primarias de cubiertas amarillas utilizando empaque de aislamiento de células B de selección negativa (StemCell Technologies). Incubamos las células cosechadas con varias concentraciones de SMIP anti-CD20

durante 30 minutos en hielo. Las células luego se lavan en 0.5% BSA/PBS, y se tiñen con IgG-PE antihumano durante 30 minutos y se analizan mediante citometría de flujo (MFI) en FacsCalibur.

[0182] Como se demuestra en la Figura 1, todos los SMIP anti-CD20 analizados en este ejemplo (TRU- 015, 018008 esc, 018008sccp, 2LM 19-3 esc, 2LM 19-3 sccp, 2LM 20-4 esc, 2LM 16 esc, 2LM 16 sec, 2LM 16 sccp, 2LM 20-4 sccp, 009csc, 009 sec, 009 sccp, 018011 esc, 018011 sec, 018011 sccp) tienen afinidades de unión comparables a CD20 en células humanas B.

Tabla 2- Unión en células primarias B con SMIPS de mutación P/S

10 ug/ml		1.1ug/ml		0.37 ug/ml		0.12 ug/ml	
	MFI		MFI		MFI		MFI
Rituxan	198.7	Rituxan	172.9	Rituxan	137.3	Rituxan	105.7
TRU-015	149.3	TRU-015	88.0	TRU-015	64.8	TRU-015	42.8
2Lm 20-4 sccp	80.1	2Lm 20-4 sccp	66.0	2Lm 20-4 sccp	43.2	2Lm 20-4 sccp	25.6
18008 sccp	79.5	2LM 20-4 sccp p/s	48.8	2LM 20-4 sccp p/s	33.4	2Lm 19-3 sccp	17.7
2Lm 19-3 sccp	61.4	2Lm 19-3 sccp	48.7	2Lm 19-3 sccp	31.0	2LM 20-4 sccp p/s	17.6
2Lm 16 sccp p/s	54.3	18008 sccp	44.8	009 sccp	28.4	009 sccp	17.0
2Lm 16 csc p/s	52.2	2Lm 16 sccp p/s	42.8	2Lm 16 sccp p/s	25.0	2Lm 16 sccp p/s	13.5
009 sccp	51.9	2Lm 19-3 sccp p/s	41.8	18008 sccp	24.8	18008 sccp	13.0
2LM 20-4 sccp p/s	50.6	009 sccp	39.8	2Lm 19-3 sccp p/s	22.4	2Lm 19-3 sccp p/s	12.7
2Lm 19-3 sccp p/s	43.5	009 sccp p/s	32.7	009 sccp p/s	20.2	009 sccp p/s	10.4
009 csc p/s	42.2	009 csc p/s	31.6	009 csc p/s	19.0	009 csc p/s	9.6
009 sccp p/s	40.4	2Lm 16 csc p/s	30.5	2Lm 16 csc p/s	15.2	2Lm 16 csc p/s	9.3

10 ug/ml		1.1 ug/ml		0.12 ug/ml		0.04 ug/ml	
Rituxan	171.6	Rituxan	93.0	Rituxan	62.3	Rituxan	43.1
TRU-015	123.6	TRU-015	53.4	2LM 20-4 sccp p/s	38.3	TRU-015	19.9
2Lm 20-4 sccp	67.8	2LM 20-4 sccp p/s	39.2	TRU-015	31.4	2LM 20-4 sccp p/s	16.2
2LM 20-4 sccp p/s	66.8	2Lm 19-3 sccp p/s	35.9	2Lm 19-3 sccp p/s	31.0	2Lm 20-4 sccp	14.4
18008 sccp	64.7	2Lm 19-3 sccp	35.2	2Lm 20-4 sccp	27.8	2Lm 16 sccp p/s	14.0
2Lm 19-3 sccp	60.7	2Lm 16 sccp p/s	34.9	2Lm 16 sccp p/s	26.4	2Lm 19-3 sccp	13.4
2Lm 16 csc p/s	59.6	2Lm 20-4 sccp	34.1	2Lm 19-3 sccp	23.4	2Lm 19-3 sccp p/s	13.0
009 csc p/s	56.8	009 csc p/s	31.0	009 csc p/s	21.5	009 csc p/s	11.7
2Lm 19-3 sccp p/s	56.1	009 sccp p/s	28.1	009 sccp p/s	21.4	009 sccp p/s	10.2
009 sccp	50.7	2Lm 16 csc p/s	28.1	009 sccp	16.8	2Lm 16 csc p/s	8.8
2Lm 16 sccp p/s	48.2	009 sccp	25.1	2Lm 16 csc p/s	16.0	009 sccp	8.5
009 sccp p/s	46.9	18008 sccp	20.7	18008 sccp	12.9	18008 sccp	6.1

Células Linfoides B Malignas

[0183] La unión de anti-CD20 018011, TRU-015 y RITUXAN® se examina utilizando un panel de 5 estirpes celulares de linfoma B humana (BCL): NU-DHL1_5 Ramos, SU-DHL4, SU-DHL5, y WSU-DLCL2. Cada uno de estas estirpes celulares se deriva de un paciente con linfoma de células B no Hodgkin distinto. En resumen, las concentraciones incrementadas de ligadores CD20 se incuban con 100,000 BCL durante 30 min a 4°C. Las células luego se lavan dos veces con PBS que contiene 1 % BSA para remover anticuerpo no unido y luego un anticuerpo secundario antihumano de cabra marcado FITC (H+L) (dilución 100 veces) se agrega durante 30 min a 4°C. La células se lavan de nuevo dos veces para remover anticuerpo secundario no unido y luego se resuspenden en 1% de formaldehído (en PBS) con 1% BSA. La intensidad de fluorescencia de cada muestra utilizando un citómetro de flujo Becton Dickinson FACSORT. Los resultados se expresan como la media geométrica (GeoMean) de la intensidad fluorescente.

[0184] La Figura 2 muestra los resultados en cinco estirpes celulares. El 018011 demuestra la unión dependiente de dosis a cada uno de estas estirpes celulares. El 018008 y 2Lm20-4 también une a las cinco estirpes celulares (datos no mostrados). La unión de 018011 a células Ramos y SWU-DLCL2 se confirma por inmunofluorescencia (IFA) de acuerdo con el protocolo en el Ejemplo 5.

Ejemplo 2: Ensayo de Citotoxicidad dependiente de Complemento de SMIP anti-CD20

Células Ramos

[0185] Para determinar el nivel de citotoxicidad dependiente de complemento (CDC) del SMIP anti-CD20 humano, incubamos células Ramos con SMIP anti-CD20 en la presencia de 10% de suero humano (Quidel) durante 3.5 horas a 37°C. Evaluamos la muerte celular al medir la liberación de LDH de las células (Equipo Promega).

[0186] Como se muestra en la Figura 3 A, RITUXAN®, TRU-015, 2LM 20-4, 018008, y 018011 tienen actividad comparable CDC contra células humanas Ramos B.

Tabla 3. CDC en células Ramos con SMIPS de mutación P/S

10 ug/ml		1.1ug/ml		0.37 ug/ml		0.12 ug/ml	
	% lisis		% lisis		% lisis		% lisis
2Lm 16 sccp p/s	85.7	2Lm 19-3 sccp	58.1	Rituxan	60.2	Rituxan	56.5
009 sccp p/s	83.0	18008 sccp	57.1	18008 sccp	47.9	18008 sccp	32.2
Rituxan	82.5	Rituxan	57.1	2Lm 20-4 sccp	45.4	2Lm 19-3 sccp	30.5
2Lm 19-3 sccp p/s	80.3	TRU-015	56.1	2Lm 19-3 sccp	40.8	2Lm 20-4 sccp	20.0
18008 sccp	72.5	2Lm 20-4 sccp	52.9	TRU-015	38.8	TRU-015	16.3
TRU-015	67.7	009 sccp	50.3	009 sccp	26.1	009 sccp p/s	11.4
2Lm 20-4 sccp p/s	66.3	2Lm 20-4 sccp p/s	28.3	009 csc p/s	18.8	009 sccp	11.2
2Lm 20-4 sccp	63.2	009 sccp p/s	23.4	009 sccp p/s	12.7	2Lm 16 sccp p/s	9.5
2Lm 19-3 sccp	60.1	2Lm 19-3 sccp p/s	21.3	2Lm 19-3 sccp p/s	12.4	009 csc p/s	9.3
2Lm 16 csc p/s	56.6	2Lm 16 sccp p/s	18.3	2Lm 20-4 sccp p/s	12.3	2Lm 20-4 sccp p/s	8.9
009 sccp	56.4	2Lm 16 csc p/s	16.5	2Lm 16 sccp p/s	11.5	2Lm 16 csc p/s	8.9
009 csc p/s	40.9	009 csc p/s	16.2	2Lm 16 csc p/s	9.2	2Lm 19-3 sccp p/s	8.8

100 nm		11 nm		4 nm		1 nm	
	% lisis		% lisis		% lisis		% lisis
2Lm 16 sccp p/s	107.1	18008 sccp	68.7	Rituxan	65.1	Rituxan	67.6
009 sccp p/s	98.5	Rituxan	66.3	18008 sccp	61.4	18008 sccp	50.0
2Lm 19-3 sccp p/s	92.7	2Lm 20-4 sccp	65.5	2Lm 20-4 sccp	56.9	2Lm 20-4 sccp	36.1
009 sccp	88.3	2Lm 19-3 sccp	61.3	2Lm 19-3 sccp	51.7	2Lm 19-3 sccp	29.7
2Lm 20-4 sccp p/s	87.2	009 sccp	55.7	009 sccp	38.0	009 sccp p/s	27.0
TRU-015	86.1	TRU-015	49.7	TRU-015	26.2	2Lm 16 sccp p/s	22.9
2Lm 20-4 sccp	82.0	2Lm 20-4 sccp p/s	27.1	009 sccp p/s	21.3	2Lm 16 csc p/s	22.5
Rituxan	81.9	2Lm 16 sccp p/s	24.7	2Lm 16 sccp p/s	19.6	009 sccp	20.9
2Lm 19-3 sccp	79.7	009 sccp p/s	23.8	2Lm 19-3 sccp p/s	18.5	2Lm 19-3 sccp p/s	20.5
18008 sccp	73.9	2Lm 19-3 sccp p/s	22.2	2Lm 20-4 sccp p/s	17.4	TRU-015	19.8
2Lm 16 csc p/s	69.2	2Lm 16 csc p/s	17.0	009 csc p/s	16.4	009 csc p/s	18.7
009 csc p/s	64.3	009 csc p/s	16.0	2Lm 16 csc p/s	14.3	2Lm 20-4 sccp p/s	15.1

Células B primarias

[0187] También aislamos células B primarias de cubiertas amarillas utilizando equipo de aislamiento de células B de selección negativa (StemCell Technologies). Pre-incubamos $5x10^5$ células B con anticuerpo anti-hCD55 (2ug/ml) durante 10 min a 37°C. Luego agregamos SMIP anti-CD20 y suero (10%: Quidel). Después de 3.5 horas de incubación, evaluamos la muerte celular mediante teñido 7-AAD y análisis FAC.

[0188] Como se muestra en la Figura 3B, TRU-015, RITUXAN®, y 2LM 20-4 tiene actividad comparable CDC contra células B primarias. No se detecta actividad CDC contra las células B primarias cuando se agrega control IgG.

Células SU-DHL4 B y células BJAB

[0189] También investigamos la capacidad de SMIP anti-CD20 humanizado para mediar CDC contra células de linfoma de células B SU-DHL4, utilizando suero humano fresco como una fuente de complemento. Se recolecta sangre completa humana y se le permite coagular durante 60 min a temperatura ambiente después de que los tubos se centrifugan para recolectar suero para análisis CDC. Se utilizan CD20-específico TRU-015 y RITUXAN® como controles positivos y HER2-específico trastuzumab se utiliza como un control de no unión de concordancia de isotipo en este estudio.

[0190] Las células SU-DHL4B se colocan en placas en placas 96 de pozos con cantidades que varía de ligadores CD20. El complemento humano diluido (1: 100), preparado de la sangre de voluntarios saludables, se agrega a cada pozo. Se conducen pruebas en triplicado en un volumen final de 100 µl/pozo con medio solo, células solas, ligadores CD20 solos y complemento solo, todos utilizados

como controles. Después de 4 h incubación a 37 ° C, las placas se remueven del incubador y se equilibran a 22 ° C (aproximadamente 20-30 minutos).

Ensayo de Liberación de LDH

[0191] El método fluorométrico CYTOTOX-ONE™ estima el número de células no viables en un ensayo de citotoxicidad. Esto permite la medición de fluorescencia rápida de la liberación de deshidrogenasa lactato (LDH) de células con membranas celulares dañadas. La liberación LDH en el medio de cultivo se mide con un ensayo enzimático acoplado de 10-minutos que los resultados en la conversión de Resazurin en Resorufin. La regeneración del producto Resorufin fluorescente es proporcional a la cantidad de LDH.

En resumen, un volumen igual de CYTOTOX-ONE ™ se agrega a cada pozo, se agita gentilmente durante 30 segundos, y se incuba adicionalmente a 22 ° C durante 10 minutos. Como un control positivo, 2 µl de amortiguador de lisis por pozo (en triplicados) se agrega para generar un máximo de liberación de LDH de las células. Después de 10 minutos de incubación, se detiene la reacción enzimática al agregar 50 µl de solución de parada y las placas se agitan gentilmente durante 10 segundos. Se mide la fluorescencia con un fluorímetro a una longitud de onda de excitación de 560 nm y una longitud de onda de emisión de 590 nm.

El porcentaje de citotoxicidad se calcula mediante la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de lisis} = 100 \times \frac{\text{(liberación experimental – liberación de fondo)}}{\text{(liberación máxima – liberación de fondo)}}$$

[0192] Como se muestra en la Figura 4, el 018011 es capaz de mediar CDC con complemento humano de dos donantes separados y células SU-DHL4 B. Este efecto CDC es proporcional a concentraciones de 018011, TRU-015 y RITUXAN®. El complemento de uno de los dos donantes es menos soportado de la actividad CDC de 018011, que parece menor que el de RITUXAN®. La significancia de esta observación con 01801 1 no es clara.

[0193] En un estudio similar utilizando células BJAB como la población celular objetivo, el 018011 y TRU- 015 producen citotoxicidad mediada por complemento dependiente de concentración equivalente contra células BJAB (Figura 4).

Ejemplo 3: Ensayos de Citotoxicidad Dependiente de Anticuerpo (ADCC) de SMIP anti-CD20

[0194] Determinamos el nivel de citotoxicidad dependiente de anticuerpo (ADCC) (también denominado como FcCC) del SMIP anti-CD20 utilizando un número de diferentes células objetivo.

Células de linfoma BJAB

[0195] En un experimento, marcamos células de linfoma BJAB con 0.5uM CFSE. Las células marcadas luego se incuban con aglutinantes anti-CD20 durante 15 minutos, seguido por la adición de PBMC activado (que se estimulan previamente con IL-2 y IL- 12 durante la noche). Después de 6 horas de incubación, teñimos células objetivo CFSE ($CFSE^+$) con PI y se evalúa la muerte celular utilizando citometría de flujo.

[0196] Como se demuestra en a Figura 5, RITUXAN®, TRU-015 y 2LM20-4 mediada la actividad comparable ADCC. Experimentos adicionales utilizando células BJAB marcadas ^{51}Cr demuestran actividad ADCC de 018008 y 018011 (datos no mostrados).

Células Ramos B y SU-DHL4

Preparación de Células efectoras

[0197] Aislamos PBMNC mediante centrifugación de gradiente-densidad utilizando (Lymphoprep™ Axis-Shield PoC AS, Noruega). Se recolecta sangre completa en un tubo que contiene anticoagulante (heparina). La sangre se diluye mediante la adición de un volumen igual de 0.9% NaCl y luego 6 ml de sangre diluida se forman capas de 3 ml de solución Linfoprep en un tubo cónico de 15 ml y se centrifuga a 800 x g durante 20 minutos a temperatura ambiente. Los mononucleocitos recuperados de la interface se lavan y se utilizan en ensayos ADCC y FcCC.

Protocolo de ADCC

[0198] Se colocan en placas de células objetivo y efectoras en una relación de 50: 1 en placas de 96 pozos con concentraciones que varían del aglutinante CD20-agregado a placas apropiadas. Se conducen pruebas en triplicado en un volumen final de 100 µl/pozo con medio solo, células efectoras solas, células objetivo solas y aglutinante solo CD20 como controles. Se mide señal fluorescente como se describió anteriormente en el ensayo CDC.

Resultados

[0199] La capacidad de 018011 para facilitar citotoxicidad celular mediada por Fc (FcCC) se evalúa contra CD20+ SU-DHL4 y Ramos BCL. Adicionalmente, TRU-015, RITUXAN® y anti-HER2 trastuzumab (utilizado como un control Fc de no unión de concordancia de isotipo Fc) se utilizan en esta evaluación. El PBMNC frescamente aislado de donantes saludables normales se utiliza como una fuente de células efectoras en esta evaluación. El PBMNC incluyen células FcγR3/CD16+ NK capaz de mediar FcCC. Adicionalmente a células NK, los monocitos en el PBMNC también expresan FcγR y tienen la capacidad de llevar aproximadamente FcCC. La Figura 6 presenta los resultados de experimentos utilizando células de linfoma B CD20+ SU-DHL4 y Ramos. Cada uno de los agentes de unión CD20 es capaz de mediar FcCC en una forma dependiente de dosis utilizando células efectoras humanas.

[0200] Experimentos similares con moléculas de unión humanizadas adicionales CD20 muestran actividad ADCC en células B ramos [Figura 11].

Tabla 4 – Clasificación de SMIP anti-CD20 humanizado

240.

Ramos ADCC
TRU-015
2LM 19-3 SCCP
018008 SCCP
2LM 19-3 CSCS
2 LM 16 SCCS
2 LM 20-4 CSCS
2 LM 16 CSCS
RITUXIMAB
018009 SCCS
018009 CSCS
018009 SCCP
018011 SCCS
018011 CSCS
2 LM 16 SCCP
018011 SCCP
2 LM 20-4 SCCP
018008 CSCS

Farage ADCC
2 LM 16 SCCP
018008 SCCP
TRU-015
2 LM 19-3 CSCS
2 LM 19-3 SCCP
2 LM 20-4 CSCS
2 LM 16 CSCS
2 LM 16 SCCS
RITUXIMAB
018011 CSCS
2 LM 20-4 SCCP
018011 SCCS
018011 SCCP
018009 CSCS
018009 SCCS
018009 SCCP
018008 CSCS

Ejemplo 4 Estudio Farmacocinético y Farmacodinámico de SMIP anti-CD20.

[0201] Para investigar las farmacocinéticas y farmacodinámicas de SMIP anti-CD20, conducimos un estudio farmacocinética de bolo IV de 26 semanas en macacos. Tratamos macacos hembra adultos de acuerdo con lo siguiente:

TABLA 5

Grupo de tratamiento	Artículo de prueba	Nivel de Dosis (mg/kg)
1	Rituxan	1
2		10 (animales que experimentan aspirados BM, biopsias LN)
3		10
4	2LM 20-4	1
5		10 (animales que experimentan aspirados BM, biopsias LN)
6		10
7	2LM 20-4 mut Fc (CDC atenuado)	1
8		10 (animales que experimentan aspirados BM, biopsias LN)
9		10

[0202] Obtenemos muestras sanguíneas, biopsias de nodo linfático, y médula ósea aspiradas de los grupos de animal para estudiar las farmacocinéticas de artículo de prueba. Se someten muestras de suero y sangre completa a hematología, citometría de flujo, y análisis PK; biopsias de ganglio linfático a citometría de flujo y análisis inmunohistoquímico; la médula ósea aspirada se analiza mediante citometría de flujo.

[0203] Las observaciones clínicas de los animales son normales, ninguno de los artículos de prueba se asocia con signos adversos. Adicionalmente, notamos que los niveles de hemoglobina, y plaqueta, monocito, conteos eosinófilo y basófilo no se afectan por los artículos de prueba.

[0204] El análisis de citometría de flujo de sangre periférica muestra que aquellos grupos tratados con 10 mg/kg de 2LM 20-4 (tipo natural) o 2LM 20-4 mut Fc muestran eliminación larga y fuerte de células $CD19^+$ B (Figura 8). Los grupos tratados con 2LM 20-4, 2LM 20-4 mut Fc, y Rituxan muestran agotamiento comparable de células $CD19^+$ B periféricas.

[0205] El análisis de citometría de flujo de médula ósea revela que los grupos tratados con 2LM 20-4, 2LM 20-4 mut Fc, y Rituxan demuestran agotamiento comparable de células de médula ósea CD 19+ B en el día 8 (Figura 9). En el día 22, sin embargo, el grupo tratado con Rituxan tienen un número significativamente mayor de células CD 19+ B, cuando se compara cpm grupos tratados con 2LM 20-4 y 2LM 20-4 mut Fc (Figura 9).

[0206] El análisis de citometría de flujo de ganglios linfáticos revela que 2LM 20-4 demuestra mejor eficacia comparado con 2LM 20-4 mut Fc, en el día 8 y Día 22 (Figura 10). El 2LM 20-4 reduce significativamente el porcentaje de ganglio linfático relacionado con células $CD19^+$ B.

[0207] También obtenemos datos farmacocinéticos (PK) de 2LM 20-4 y 2LM 20-4 mut Fc en macacos después de Administración IV. El 2LM 20-4 y 2LM 20-4 muestran velocidad de eliminación lenta cuando se administra a 10g/kg, con una vida útil de 7.2 ± 0.6 días para 2LM 20-4, y 5.5 ± 2.4 días para 2LM 20-4 mut Fc (Figura 11). El volumen de distribución es pequeño, aproximadamente 40-70 ml/kg. Existe alguna evidencia de PK no lineal para el rango de dosis de 1-20 mg/kg. Los perfiles PK de 2LM 20-4 y 2LM 20-4 mut Fc son comparables aquellos de Rituxan y TRU-015.

[0208] En conclusión, demostramos que el SMIP anti-CD20 humanizado, en particular 2LM 20-4, muestra eficacia de eliminación de células B que es comparable, si no es mejor, que Rituxan.

Ejemplo 5. Estudios In Vivo

A. Evaluación In Vivo de CD20-específico 018011, Contra Xenoinjertos de Linfoma de Células B humanas Sistémicamente Diseminados o Subcutáneos

[0209] Se examina la eficacia anti-tumor preclínica de 018011 contra xenoinjertos de linfoma de células B humanos que crecen en ratones sin pelo. El 018011 inhibe el crecimiento de xenoinjertos de linfoma B subcutáneo establecido y origina

regresión de xenoinertos de linfoma de células B establecidos en ratones. No existe relación de respuesta de dosis clara en la actividad antineoplásica de 018011. En un modelo de ratón de linfoma de células B diseminado, cuando se administra temprano en el proceso de la enfermedad, el 018011 protege ratones scid con linfoma de células B sistémicamente diseminado de parálisis de pata trasera y muerte.

Moléculas de control y prueba

Moléculas de unión CD-20

[0210] El 018011 (3.1 mg/ml disuelto en 20 mM de fosfato de sodio, 240 mM sacarosa, pH 6.0 o 4.09 mg/ml, disuelto en 10 mM de histidina, 5 % sacarosa, pH 6.0) y TRU-015 se almacena a -80 °C. Se obtiene Rituximab (RITUXAN®) de MedWorld Pharmacy (Chestnut Ridge, NY). Se diluyen fármacos en solución salina amortiguada con fosfato antes de uso.

Estirpes celulares

[0211] La estirpe de linfoma de células B (BCL) Ramos (CRL-1596) se obtiene de the American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA). La estirpe linfoma de células B grande difusa WSU-DLCL2 (ACC-575) se obtiene de Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ Braunschweig, Alemania). Las células se determinan por estar libre de micoplasma mediante un ensayo de teñido de fluorocromo de ADN (Bionique Testing Laboratories, Saranac Lake, NY). Se mantienen células en medio RPMI 1640 complementado con 10% de suero bovino fetal (FBS), 10 mM HEPES (ácido N-2- hidroxietilpiperazina-N'-2-

etanosulfónico), 1 mM de piruvato de sodio, 0.2% de glucosa, penicilina G de sodio (100 U/ml), sulfato de estreptomicina (100 µg/m), y L-glutamina (2mM). Antes de uso, se aíslan células viables mediante centrifugación (30 min a 1000 x g) utilizando un gradiente de densidad Linfoprep (Axis Shield PoC AS, Oslo, Noruega).

Animales

[0212] Se obtienen ratones hembra, BALB/c y nu/nu (sin pelo) (18-23 g) y ratones macho CB 17 scid (18-23 g) de Charles River Laboratories, Wilmington, MA. Todos los ratones se alojan en unidades microaisladoras y se proporcionan con alimento y comida estéril ad libitum a través los estudios.

Xenoinjertos Subcutáneos BCL

[0213] Los ratones atímicos, hembra (sin pelo) se implantan con xenoinjertos subcutáneos Ramos o WSU-DLCL2. Un grupo adicional de ratones se exponen a irradiación de cuerpo total (400 rads) para suprimir adicionalmente su sistema inmune residual antes de implante de tumor de Ramos BCL. Los ratones se inyectan con $1x10^7$ células Ramos o $5x\ 10^6$ células WSU-DLCL2 suspendidas en Matrigel (Collaborative Biomedical Products, Belford, MA, diluido 1:1 en medio RPMI 1640) en el flanco derecho dorsal. Cuando los tumores alcanzan una masa apropiada (usualmente >100 mg), ellos se detienen para maximizar la uniformidad de la masa de tumor antes de la administración de la terapia (n=8 a 10 ratones/tratamiento grupo). Los compuestos se administran iv o ip en solución salina estéril (0.2 ml/ratón). Para contar la diferencia en el peso molecular entre 018011 y RITUXAN®, la dosificación de cada fármaco que se administra a los

ratones se ajusta para permitir la equivalencia molar de cada proteína. De acuerdo con lo anterior, la cantidad de RITUXAN® administrada es aproximadamente 137% de la cantidad de 018011 administrado. La longitud y ancho del tumor (en cm) se mide por lo menos una vez a la semana y la masa de tumor se calcula por lo siguiente: masa de tumor (g) = [0.5 x (ancho de tumor 2) (longitud de tumor)]. Media (± sem) masa de tumor para cada grupo de tratamiento grupo se calcula y se compara con los grupos tratados con vehículo para significancia estadística utilizando ANOVA y en forma de pares posterior en comparación con el grupo tratado con vehículo mediante una prueba t de una cola con el término de error para la prueba t con base en la varianza agrupada a través de todos los grupos de tratamiento. Los valores de masa de tumor para cada grupo de tratamiento se registran hasta 100 días después del inicio del tratamiento o hasta que los tumores crecen 15% de peso corporal en cuyo tiempo estos ratones se les practica la eutanasia de acuerdo con las regulaciones institucionales. Se registra el número de ratones libres de tumor al final de cada estudio. La supervivencia de los ratones se grafica y se determina por la masa de tumor; cualquier ratón con una masa de tumor > 1.5 g se considera muerte para el cálculo de la gráfica de supervivencia aunque los ratones no se maten hasta que la masa de tumor alcance 15% de peso corporal del ratón de acuerdo con las directrices institucionales.

Evaluación de Eficacia Anti-tumor Contra BCL Diseminado

[0214] Ratones macho scid se inyectan Intravenosamente con $3x10^6$ células Ramos o $5x10^6$ células WSU-DLCL2 en un volumen de 0.2 ml en la vena de la cola. La diseminación y el crecimiento de la células se permite ocurrir durante un periodo de 3 días (designado como el modelo de desarrollo), 6 días (designa el modelo intermedio) o 9 días (designado como el modelo establecido) antes del

inicio de terapia de fármaco. Los ratones con enfermedad diseminada (9 a 13 ratones/grupo de tratamiento) se administran vehículo (PBS), 018011, TRU-015 o RITUXAN® iv en los días designados. Los ratones con enfermedad diseminada se monitorean diariamente para la presencia de parálisis de pata trasera o muerte durante hasta 100 días. Los ratones que exhiben parálisis de pata trasera se les practica la eutanasia mediante asfixio con CO_2 de acuerdo con regulaciones institucionales.

[0215] El tiempo de supervivencia promedio (días ± SD) se calcula para cada grupo. La diferencia en la distribución de la supervivencia entre grupos se determina al utilizar métodos no paramétricos que compara la distribución de supervivencia de los ratones enfermos. Se desarrollan múltiples comparaciones utilizando el procedimiento de rango de transformación. El procedimiento de rango de transformación consiste de reemplazar los tiempos de supervivencia con sus rangos y aplicar la prueba F paramétrica usual para los rangos. Se desarrollan múltiples comparaciones utilizando el método de Tukey en los rangos. El método de Tukey indica la diferencia en los tiempos de supervivencia entre los ratones con significancia reportada al nivel 0.05. Se construyen curvas de supervivencia utilizando el método de Kaplan-Meier (J Am Stat Assoc 1958;53:457-81).

[0216] Se recolectan células de médula ósea del fémur de algunos ratones scid con Ramos BCL diseminadas y se evalúa para la expresión de antígeno CD 19 o murino CD45 humano al incubar con IgG2A de rata marcado con FITC de control, IgG1 marcado FITC, CD45 antiratón de rata marcado FITC o CD 19 antihumano de ratón marcado FITC (todos los reactivos marcados FIT de BD Pharmingen, San Diego, CA). Las células se peletizan, se lavan con PBS-I % BSA y luego se fijan con 1% de formaldehído. Se analizan muestras en un citómetro de flujo FACSort

para la presencia o ausencia de células que expresan CD 19 humano. El número de células CD 19+ humanas se exhibe como un por ciento del número total de la población celular puenteada con base en las propiedades de dispersión de luz lateral y delantera características de células linfoides identificadas por la expresión de antígeno de leucocito común CD45.

[0217] Los animales utilizados en este estudio se listan en la Tabla 5.

Tabla 6: Especificaciones de Ratones Utilizados

Características	Especificaciones
Especies:	Ratón
Cepa:	Balb/c, nu/un, CB17 scid
Fuente:	Charles River, Wilmington, MA
No. de Animales Por Grupo:	8 a 13
No. total de Animales:	492
Edad y Sexo:	6 a 8 semanas de edad, Balb/c, y nu/un (hembra)
Peso:	18g-25g
Datos Recibidos:	10 Abril 2006
Periodo de Aclimatación:	Mínimo 1 semana

Resultados

Efecto de 018011 en Xenoinjertos Subcutáneos Ramos

[0218] El vehículo, 018011 (4 mg/kg iv) o RITUXAN® (5.5 mg/kg iv) se administran en dosificaciones molares equivalentes a ratones Balb/c con xenoinjertos Ramos

establecidos. La masa de tumor de ratón individual durante el tiempo se muestra en la Figura 12 (los resultados graficados se agrupan de 2 estudios separados) y supervivencia (con base en masas de tumor <1.5 g) mostrado en la Figura 13. En otro estudio conducido utilizando Ratones sin Pelo nu/nu, vehículo, 018011 (8 mg/kg ip), TRU-015 (8 mg/kg ip) o RITUXAN® (11 mg/kg ip) se administran dosificaciones equivalentes molares para ratones nu/nu con xenoinjertos Ramos establecidos.

[0219] La actividad de respuesta de dosis de 018011 y RITUXAN® se examina en el modelo de xenoinjerto Ramos establecido en ratones Balb/c y de 01801 1, RITUXAN® y TRU- 015 en el modelo de xenoinjerto WSU-DLCL2 establecidos en ratones nu/nu (Tabla 7). En ambos estudios todos los compuestos se administran como 5 dosis cada día (excluyendo semanas) mediante la ruta ip de administración del fármaco. El número ratones libres de tumor se registra (día 50 para el estudio Ramos y día 100 para el estudio WSU-DLCL2).

Table 7 Efecto de xenoinjertos 018011, TRU-015 y Rituximab en Ramos y WSU-DLCL2

	Ramos Día 50		WSU-DLCL2 Día 100	
Tratamiento	Dosis (mg/kg ip)	Ratones Libres de Tumor (ratones libres de tumor/total)	Dosis (mg/kg ip)	Ratones Libres de Tumor (ratones libres de tumor/total)
Vehiculo		1/10		3/10
018011	2	3/10	1	7/9
	4	0/10	2	2/9
	8	5/10	4	7/8
	16	3/10	8	6/8
Rituximab	2.8	1/10	1.4	6/8
	5.5	3/10	2,5	4/8
	11	3/10	5	7/8
	22	3/10	11.6	5/8
TRU-015			1	4/8
			2	4/9
			4	6/8
			8	3/8

Efecto de 018011, TRU-015 y Rituximab en

Linfoma diseminado en Ratones Scid

[0220] Se evalúa la capacidad de 018011, TRU-015 y RITUXAN® para prolongar la supervivencia de ratones scid CB 17 con linfoma B sistémicamente diseminado. En este modelo, la inyección intravenosa de células de linfoma B CD 19+ CD20+ Ramos permite su rápida diseminación en varios órganos que incluye el sistema nervioso central, originando eventualmente parálisis de pata trasera y muerte (Clin Can Res 2004; 10: 8620-9). Se administran compuestos iv en ratones scid con linfoma B Ramos diseminad durante la fase de desarrollo (temprano) (terapia iniciada 3 días post-diseminación de células Ramos), durante la fase intermedia de la enfermedad (terapia iniciada día 6 después de diseminación celular de tumor) o la fase establecida (tardía) (terapia administrada 10 días post-diseminación) de la enfermedad diseminada. Como se muestra en la Figura 16 la administración de dosis equimolares de 018011, TRU-015 o RITUXAN® (2 mg/kg, 2 mg/kg y 2.8 mg/kg, respectivamente) durante la fase de desarrollo (inicio día 3) de la enfermedad diseminada que resulta en una protección significativa contra el desarrollo de la enfermedad desarrollada. El retraso de la administración de 018011, TRU-OI 5 o RITUXAN® a 10 días post-diseminación resulta en una pérdida significativa de la actividad protectora de cada proteína. Durante la fase establecida de la enfermedad, cada compuesto se da para 5 dosis (como lo opuesto a 3 dosis en la fase de desarrollo y 4 dosis en la fase intermedia) y dosificación de 4 tiempos (8 mg/kg, 8 mg/kg y 11.2 mg/kg para 018011, TRU-015 y RITUXAN®, respectivamente) como se administra en la fase de desarrollo. Aún estas dosificaciones más prolongadas y mayores, la actividad de cada uno de los compuestos en la enfermedad establecida es significativamente menor que

durante la fase de desarrollo del modelo diseminado. Estos resultados sugieren que 018011, TRU-015 y RITUXAN® son más eficaces contra la enfermedad desarrollado que la enfermedad establecida en el modelo de enfermedad diseminada Ramos.

[0221] La médula ósea recolectada de ratones con enfermedad diseminada Ramos se examina para la presencia de células CD 19+ Ramos humanas diseminadas. La mayoría de las células linfoides derivadas de médula ósea de ratones tratados con vehículo con antígeno humano CD 19 que expresa enfermedad diseminada de la presencia de células linfoides humanas en la médula ósea. El tratamiento con 018011, TRU-015 o RITUXAN® durante la fase temprana (inicio 3 días diseminación post-BCL) del proceso de enfermedad diseminada que reduce el porcentaje de células humanas CD 19+ en la médula ósea a <10% (Figura 17). Ninguno de estos ratones en el grupo de tratamiento temprano presentado con parálisis de pata trasera. Cerca a 30% de las células linfoides aisladas de la médula ósea de los ratones tratados durante la fase establecida (inicio 10 días diseminación post-BCL) del proceso de la enfermedad que expresa antígeno humano CD 19. Los ratones en este último grupo de tratamiento experimentan parálisis de pata trasera. La expansión de células de linfoma B humanas en la médula ósea puede ser una indicación del grado de progresión de la enfermedad en estos ratones enfermos.

[0222] El efecto de 018011, RITUXAN®, y TRU-015 se investiga en el linfoma de células B grande difuso WSU-DLCL2 del modelo de enfermedad diseminado. Se administran proteínas terapéuticas iv al inicio del día 3 de inyección de célula post-tumor para un total de 3 dosis para el modelo de desarrollo y al inicio día 10 para un total de 5 dosis para el modelo establecido. Se administran proteínas en

dosificaciones equivalentes molares. El 018011 significativo ($p<0.05$ vs ratones tratados con vehículo) protegen los ratones contra la parálisis de pata trasera inducida por célula de tumor (Figura 18) aunque el efecto de TRU-015 alcanza significancia estadística ($p=0.073$ vs ratones tratados con vehículo) cuando se administra temprano en el proceso de la enfermedad (fase de desarrollo). El efecto de RITUXAN® no es significativo en la fase de desarrollo ni es el efecto de cualquiera de las 3 proteínas significativo cuando se administra durante la fase establecida de la enfermedad. Estos resultados son similares a aquellos observados en el modelo diseminad Ramos cuando se administran compuestos durante la fase establecida de la enfermedad.

Efecto de 018011 Intravenosamente y Intraperitoneales administrados en Xenoinjertos Subcutáneos Ramos

[0223] La actividad anti-tumor de 018011 (8 mg/kg) se compara después de la administración de fármaco iv y ip. El 018011 se da 5 veces día de por medio después de etapas de tumor (ratones Balb/c) y se monitorea su actividad antineoplásica. Ambas rutas de administración de fármaco inhiben significativamente ($p<0.05$) el crecimiento de tumor (Figura 19). La actividad antineoplásica del 018011 administrado ip se mantiene durante una longitud mayor de tiempo que el del 01801 1 administrado iv. Este estudio demuestra que el 018011 administrado ip o iv es eficaz en inhibir el crecimiento de xenoinjertos de linfoma de células B humana.

Efecto de 018011 y Rituximab en Xenoinjertos Subcutáneos en Ratones sin pelo irradiados y no irradiados

[0224] La irradiación gama puede suprimir el sistema inmune innato que facilita el establecimiento de xenoinjertos de tumor ratones sin pelo inmunocomprometidos. En claridad de la posibilidad que la irradiación también puede impactar las células efectoras capaces de mediar la actividad antitumor de los anticuerpos terapéuticos, la actividad antineoplásica de 018011 y RITUXAN® contra xenoinjertos de linfoma B Ramos se evalúa en ratones sin pelo Balb/c irradiados i (4 Gy equivalente a 400 rads) o no irradiados. Se establecen xenoinertos Ramos en ratones irradiados y no irradiados. El 018011 (8 mg/kg ip) y RITUXAN® (11.2 mg/kg ip) son cada uno capaces de inhibir significativamente ($p<0.05$ vs ratones tratados con vehículo) el crecimiento de Xenoinjertos de linfoma B Ramos en ratones irradiados y no irradiados (Figura 20). Los tumores crecen más rápidamente y el efecto inhibidor de cada compuesto no es tan robusto en los ratones irradiados como el que se observa en ratones no irradiados. Estos resultados sugieren que la irradiación del anfitrión puede impactar negativamente la actividad terapéutica de agentesradioinmunoterapéuticos tal como 018011 o RITUXAN® que depende de la integridad funcional de las células efectoras del sistema inmune. No se han investigado los mecanismos por los cuales la irradiación afecta la actividad terapéutica 018011.

Conclusión

[0225] El 018011 es activo como un agente anti-tumor en modelos preclínicos. Este inhibe el crecimiento de xenoinjertos de linfoma B subcutáneos establecidos y protege los ratones con linfoma de células B diseminado cuando se administra temprano que después en el proceso de la enfermedad.

153

B. Eficacia de HuCD20 SMIPS en un Modelo de Xenoinjerto de Tumor Ramos Tumor Establecido en Ratones sin pelo

[0226] Los siguientes experimentos prueban la eficacia de SMIPS específico de CD20 humanizado (HuCD20 SMIPS) en un modelo de xenoinjertos de tumor Ramos establecidos en ratones sin pelo. Se llevan a cabo experimentos en triplicado (referido aquí como (A), (B) y (C)). Se utilizan ratones de 7.5-8 semanas de edad Atímicos Nude-Foxnl^{nu} (Harlan Livermore, CA).

Establecimiento de xenoinjertos de tumor Ramos y clasificación para grupos de tratamiento

[0227] Las células Ramos son derivados de estirpe celular linfoblastoide B CD20^{+} humano de un linfoma de Burkitt. Se inyectan cinco millones de células Ramos subcutáneamente en el flanco de ratones nu/nu atímicos hembra. En el día 6 de inoculación post-tumor, los tumores palpables son evidentes en la mayoría de los ratones. Se clasifican ratones que llevan tumor en grupos (n=8 por grupo; 2 cajas de 4 ratones para cada grupo) con volumen medio equivalente de los tumores. El día de la clasificación se define como Día 0 del estudio. Los tumores se miden con un calibrador y el volumen de los tumores se calculan utilizando la Fórmula: V= ½ [largo x (ancho)^2]. El volumen medio de valores iniciales de tumor para este experimento es 228 mm^3, (A) y (B), o 227 mm^3(C); el tamaño de tumor de valores iniciales es 228 mm^3 (A), 233 (B), o 225 mm^3 (C); y el rango es 180-281 mm^3 (A), 168-300 mm^3 (B) o 157-300 mm^3 (C).

Reactivos para uso in vivo.

Reactivo	Fuente y Lote No.	Concentración y endotoxina	Preparación para inyección
PBS	Gibco, 14190	1X Concentración <0.03 EU/mL	NA
IgG humano (huIgG)	Sigma, I 4506	10 mg/mL endotoxina = 10 EU/mg	Cada reactivo de proteína listado a la izquierda se diluye a 0.5 mg/mL en PBS en el día 0 del estudio.
018008	En casa	2.79 mg/mL endotoxina <0.25 EU/mg	
2Lm20-4	En casa	2.79 mg/mL endotoxina <0.25 EU/mg	
018011	En casa	3.1 mg/mL endotoxina <0.25 EU/mg	
TRU-015	En casa	10.2 mg/mL endotoxina <0.05 EU/mg	

Protocolo de unión

[0228] Las soluciones PBS y proteína (fármaco) se preparan en volúmenes similares y los contenidos de los tubos se anotan en marcas removibles. Un investigador quien no trata o evalúa los ratones pone un código de color en cada tubo y se anota el código y la identidad de los contenidos del tubo en una nota de laboratorio. La posibilidad de sesgo del investigador se reduce, pero no se elimina, con este diseño debido a que los investigadores desarrollan el estudio solo parcialmente "cegado" en que ellos no conocen que grupo de tratamiento particular de los ratones se recibe, pero no conoce que todos los ratones dentro de un grupo de 2 cajas que pertenecen al miso grupo. El código revela el final del estudio; sin embargo, el investigador quien está lejos del código es capaz de monitorear los resultados del estudio en una base interna.

Tratamiento In vivo

[0229] Los ratones se inyectan Intravenosamente (IV) en los días 0, 2, 4, 6, y 8 con 100 µg de IgG humano, TRU-015, 018008, 018011, o 2Lm20-4 en un volumen de 0.2 mL. PBS y las soluciones de fármaco se codifican por color como se describió anteriormente.

Monitoreo y puntos finales

[0230] Los ratones se monitorean diariamente mediante inspección visual. Se determinan los pesos, y los tumores se miden con un par de calibradores por lo menos 3 veces por semana (M, W, F) mediante un observador cegado (ver anterior) para los grupos de tratamiento. El volumen de los tumores se calcula como se describió anteriormente. También se expresa el volumen de los tumores en el último día que todos los ratones en todos los grupos estaban vivos en términos de volumen de los tumores con relación al día 0, utilizando la Fórmula:

[0231]

$$\text{Relación de volumen de tumor en día de interés} = \frac{\text{(volumen en día de interés-volumen en día 0)}}{\text{volumen en el día 0}}$$

[0232] El peso y el tumor monitoreado por días se cambian una vez a la semana durante las veces cuando los ratones que permanecen en el estudio tienen tumores no palpables. Los ratones se sacrifican si los tumores alcanzan más de 1500 mm^3. Note que la muerte no es un punto final en los protocolos de tumor, y a menos que se note otra cosa, la "supervivencia" de un ratón se determina por el tiempo de su sacrificio.

[0233] El estudio finaliza en el día 90.

Análisis estadístico

[0234] Todos los análisis estadísticos se desarrollan utilizando el software GraphPad Prism. Las diferencias significativas en el volumen medio de los tumores o medio con relación al volumen de los tumores en el día 8 se determinan utilizando a utilizando un ANOVA de una vía con post-prueba de comparación múltiple de Dunnett (para comparación con control hulgG) y post-prueba de comparación múltiple de Tukey (para todas las otras comparaciones en forma de pares). Las diferencias significativas en la supervivencia de los ratones durante el tiempo se determina utilizando análisis de supervivencia Kaplan-Meier con una prueba de rango log para comparar curvas de supervivencia. Las diferencias significativas en la incidencia de ratones Libres de Tumor al final del periodo de observación se determinan utilizando prueba exacta de Fisher, los valores $p < 0.05$ se consideran significativos.

Resultados

[0235] El tratamiento de los ratones con TRU-015 o con cualquiera de los tres HuCD20 SMIPS (018008, 018011, y 2Lm20-4) resulta en un crecimiento de tumor lento con relación a controles y/o reducción en el volumen de tumor con relación a las mediciones de valores iniciales (Figuras 21-23). El volumen de tumor medio y la media con relación al volumen de tumor de los grupos tratados hulgG difiere significativamente de los grupos tratados TRU-015, 018008 y 2Lm20-4 ((C) solo) en el día 8, que es el último día en el que todos los ratones estaban vivos (Figuras 22A-22B). No existen diferencias significativas en el volumen medio de los tumores o con relación al volumen de los tumores entre los grupos tratados hulgG y cualquier otro grupo tratado HuCD20 SMIP o entre cualesquier dos grupos

tratados HuCD20 SMIP. Los ratones se sacrifican partiendo del día 8; por lo tanto no se hacen comparaciones del volumen de los tumores en los últimos puntos de tiempo.

[0236] Los ratones se sacrifican cuando el volumen de tumor alcanza los límites mencionados anteriormente. No se encuentran ratones muertos y ninguno se sacrifica debido a la pérdida de peso extrema, ulceración de tumor o movilidad deteriorada, así el tiempo de "supervivencia" es otra medición de la velocidad de crecimiento de tumor. Como se muestra en las Figuras 23 y se resume en la Tabla 8, el tiempo de supervivencia medio en el grupo de control hulgG es 10 días. En contraste, los tiempos de supervivencia medios se incrementan significativamente con relación al grupo de control en cada uno de los otros grupos de ratones. Los tiempos de supervivencia media de los ratones en los grupos de tratamiento TRU-015, 018008, 018011, y 2Lm20-4 son 24.0, 88.5, 20.5 y 20.5 días (A), 22.0, 50.0, 11.5 y 13.5 días (B), o 40.5, 52, 16 y 83 días (C), respectivamente. No existe diferencia significativa en los tiempos de supervivencia medios entre cualquiera dos de estos grupos (Tabla 8).

[0237] Ninguno de los 8 ratones tratados con hulgG estaban vivos al final del periodo de observación de 90 días y así la incidencia libre de tumor de este grupo al día 90 es 0/8 (Figura 24 y Tabla 8). La incidencia de ratones Libres de Tumor al final del periodo de observación es 2/8 (25%) (A) o 1/8 (12.5%) (B) y (C), en los grupos tratados TRU-015; 4/8 (50%) (A), 3/8 (37.5%) (B) y (C), en los grupos tratados 018008; 1/8 (12.5%) (A) y (B), o 2/8 (25%) (C), en los grupos tratados 018011; y 1/8 (12.5%) (A) y (B), o 4/8 (50%) (C), en los grupos tratados 2Lm20-4. No existe diferencia significativa en la incidencia de ratones Libres de Tumor entre

el grupo de control hulgG y cualquiera de los grupos de tratamiento, o entre cualquiera dos otros grupos de ratones (Tabla 8 y 9).

[0238] No se observan signos manifiestos de toxicidad o pérdida de peso en cualquiera de los grupos de tratamiento (Figura 25).

Tabla 8 Tiempo de Supervivencia Medio e Incidencia de Ratones Libres de Tumor al final del Periodo de Observación

Grupo de tratamiento	Supervivencia Media Tiempo (días)	Valor p de Prueba Log Rank	Ratones libres de tumor en el día 90	Valor P de prueba Exacta de Fisher
HulgG (200 µg)	10	---	0/8 (0%)	---
TRU-015 (200 µg)	**24 (A)** **22 (B)[d]** **40.5 (C)**	**0.0023 (A)** **0.0001 (B)** **0.0006(C)**	**2/8 (25%)(A)** **1/8 (12.5%) (B)** **1/8 (12.5%)(C)**	**0.4667(A)** **1.0000(B, C)**
018008 (200 µg)	**88.5 (A)** **50 (B)** **52 (C)**	**0.0007 (A)** **0.0079 (B)** **0.0090(C)**	**4/8 (50%) (A)** **3/8 (37.5%)(B,C)**	**0.0769(A)** **0.2000(B, C)**
018011 (200 µg)	**20.5 (A)** **11.5 (B)** **16(C)**	**0.0470 (A)** **0.0198 (B)** **0.0006(C)**	**1/8 (12.5%)(A,B)** **2/8(25%)(C)**	**1.0000 (A,B)** **0.4667(C)**
2Lm20-4 (200 µg)	**20.5 (A)** **13.5 (B)** **83 (C)**	**0.0061 A)** **0.0198 (B)** **0.0001(C)**	**1/8 (12.5%)(A,B)** **4/8(50%)(C)**	**1.0000 (A,B)** **0.0769(C)**

[a] La "supervivencia" de un ratón se determina en el tiempo de su sacrificio debido al crecimiento de tumor. No se encuentran ratones muertos o sacrificados por otras razones. El estudio finaliza en el Día 90.

[b]Cada grupo se compara con los grupos tratados HulgG. Para otras comparaciones, ver Tabla 9 adelante.

[c] Ratones "Libres de tumor" tienen tumores no palpables. La ausencia de las células de tumor no se confirma mediante histología.

259

[d] Los valores en negrilla son significativamente diferentes de aquellos del grupo de control HuIgG.

Tabla 9 Valores p para comparación de Curvas de Supervivencia e Incidencia Libre de tumor Entre los grupos tratados TRU-015 y HuCD20 SMIP

	Valores P para Comparaciones Indicadas[d]	
Grupos **HuCD20 SMIP**	Prueba Log rank (comparación de curvas de supervivencia)	Prueba exacta de Fisher (comparación de incidencia libre de tumor) en el día 90
TRU-015 vs. 018008	**0.3594(A)** **0.4405(B)** **0.4452(C)**	**0.6084(A)** **0.5692(B)** **0.5692(C)**
TRU-015 vs. 018011	**0.6727(A)** **0.8367(B)** **0.9165(C)**	**1.0000(A,B,C)**
TRU-015 vs. 2Lm20-4	**0.4535(A)** **0.7089(B)** **0.1069(C)**	**1.0000(A,B)** **0.2821(C)**
018008 vs. 018011	**0.0806(A)** **0.2421(B)**	**0.2821(A)** **0.5692(B)**
	0.6302(C)	**1.0000(C)**
018008 vs. 2Lm20-4	**0.1225(A)** **0.2421(B)** **0.5243(C)**	**0.2821(A)** **0.5692(B)** **1.0000(C)**
018011 vs. 2Lm20-4	**0.7614(A)** **0.7766(B)** **0.1274(C)**	**1.0000(A,B)** **0.6084(C)**

"Ver leyenda para la Tabla 8 para información en los grupos

[0239] En el día de estudio 0, se clasifican ratones sin pelo que llevan tumores palpables Ramos en los grupos de tratamiento (n=8/grupo) de tal manera que el volumen de tumor medio para cada grupo es equivalente. Los ratones se tratan IV en los días 0, 2, 4, 6, y 8 con 100 µg de IgG humano, TRU- 015, 018008, 018011, o 2Lm20-4. Los tumores se miden en los días indicados con un calibrador y el volumen de tumor se calcula utilizando la Fórmula: V= ½ [largo x (ancho)2]. Una

260.

vez se toma un animal del estudio debido al volumen de tumor excedido se especifican los límites, el valor para el último volumen de tumor se lleva adelante. Los resultados se muestran solo a través de día 10, cuando se sacrifican los últimos ratones de control.

[0240] Los resultados se muestran en términos de volumen de tumor de los ratones individuales en el día 8 (el último punto de tiempo en el que todos los ratones estaban vivos) (A) o con relación al volumen de tumor de los ratones individuales en el día 8 con relación a día 0 (B). Las diferencias significativas entre grupos se determinan utilizando un ANOVA de una vía con Post-prueba de comparación múltiple de Dunnett (para comparación con controles tratados hulgG) y Post-prueba de comparación múltiple de Tukey (para todas las otras comparaciones en forma de pares); se indican los valores p para todas las comparaciones en forma de pares.

[0241] Los ratones se tratan y se monitorean, y el volumen de los tumores se determinan como se describe en la leyenda de Figura 21. El volumen de los tumores se determinan por lo menos 3 veces a la semana (M W F) con la excepción que monitorear se cambia a una vez por semana durante los periodos cuando todos los ratones permanecen en el estudio no tienen tumores palpables. Los ratones se sacrifican cuando el volumen de los tumores alcanza más de 1500 mm^3 (o 1200 mm^3 en Fridías). No se encuentran ratones muertos o sacrificados por otras razones.

C. Acumulación Intratumoral de Molécula de Unión CD20 Humanizada

[0242] La acumulación Intratumoral de 018011 en xenoinjertos subcutáneos de linfoma de células B humanas establecidos en ratones sin pelo se evalúa por análisis de inmunofluorescencia indirecto (IFA) y citometría de flujo y comparado con aquel de RITUXAN®, un anticuerpo terapéutico específico CD20 benchmark. Ambos agentes se administran como una dosis intravenosa única. Como se evalúa por citometría de flujo, el RITUXAN® unido a un grado mayor a células Ramos o WSDLCL2 in vitro. Esta diferencia no es evidente mediante análisis IFA. El análisis IFA de xenoinjertos subcutáneos WSU-DLCL2 (agentes administrados 0.5 mg iv) demuestran que el teñido para 018011 tienden a ser más difusos a través del tumor aunque el teñido de RITUXAN® parece más puntual y no tan difuso como aquel de 018011. Se observan resultados similares en xenoinjertos Ramos cuando se administran agentes en una dosis de 1 mg/ratón y se analizan 24h o 96h post administración. El análisis de citometría de flujo de células de linfoma aisladas de los xenoinjertos confirma esta observación.

Prueba y Artículos de Control

Moléculas de Unión CD-20

[0243] Se almacena 018011 (3.1 mg/ml disuelto en 20 mM fosfato de sodio, 240 mM sacarosa, pH 6.0 o L37852-001, 4.09 mg/ml, disuelto en 10 mM histidina, 5 % sacarosa, pH 6.0) a -80° C. Se obtienen Rituximab (RITUXAN®), trastuzumab (HERCEPTIN®), y cetuximab (ERBITUX®) de MedWorld Pharmacy (Chestnut Ridge, NY). Los fármacos se diluyen en solución salina amortiguada con fosfato antes de uso.

Estirpes celulares

[0244] La estirpe de linfoma de células B e Ramos (CRL- 1596) se obtiene de the American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA). Se obtiene una estirpe de linfoma de células B grande difusa WSU-DLCL2 (ACC-575) de Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ Braunschweig, Alemania). Todas las estirpes celulares se determinan por estar libres de micoplasma mediante un ensayo de teñido de fluorocromo de ADN (Bionique Testing Laboratories, Saranac Lake, NY). Cada estirpe celular se mantiene en medio RPMI 1640 complementado con 10% de suero bovino fetal (FBS), 10 mM HEPES (ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2-etanosulfónico), 1 mM de piruvato de sodio, 0.2% glucosa, penicilina G sodio (100 U/ml), sulfato de estreptomicina (100 µg/m), y L-glutamina (2mM). Antes de use, se aíslan células viables mediante centrifugación (30 min a 1000 x g) utilizando un gradiente de densidad Linfoprep (Axis Shield PoC AS, Oslo, Noruega).

Animales

[0245] Ratone hembra, BALB/c, nu/nu (sin pelo) (18-23 g) se obtienen de Charles River Laboratories, Wilmington, MA. Todos los ratones se alojan en unidades microaisladoras y se suministran con alimento estéril y agua ad libitum a través de los estudios.

Los animales utilizados en este estudio se listan en la Tabla 10.

Tabla 10: Especificaciones de Ratones Utilizados

Características	Especificaciones
Especies:	Ratón
Cepa:	Sin pelo Balb/c
Fuente:	Charles River, Wilmington, MA
No. de Animales Por Grupo:	1-4
No. total de Animales:	26
Edad y Sexo:	6 a 8 semanas de edad, si pelo Balb/c (hembra)
Peso:	18g-25g
Datos Recibidos:	5 Febrero 2007
Periodo de Aclimatación:	Mínimo 1 semana

Inmunofluorescencia (IFA)

[0246] Se colocan en placas células Ramos o WSU-DLCL2 a 500,000 células por pozo en portaobjetos de cultivo de 8 pozos Poli- D-Lisina (BD BioCoat cat # 354632) y se hacen crecer durante la noche. Al siguiente día, las células se incuban con 100nM RITUXAN®, trastuzumab, o 018011 durante 30 minutos a 37°C en la presencia de 5% CO_2. Las células luego se fijan con 3.75% formaldehído y 0.2M sacarosa en PBS. Las células se rehidratan al lavar con PBS (3x5 minutos) y luego incubar en 0.1 M de glicina en PBS durante 10 minutos. Las células se bloquean con 3% BSA/ PBS durante 1 hora. Se conducen todas las etapas posteriores en la oscuridad. Se analiza la unión específica utilizando IgG antihumano de cabra de fluoresceína (FITC), fragmento Fcγ específico en dilución 1:100 en 1% BSA/ PBS durante 30 minutos a 37° C (Jackson ImmunoResearch Labs cat# 109- 095-008). Algunos portaobjetos también se tiñen con antirratón

CD31 R-PE (Caltag Laboratories). Para separar la cámara y el portaobjetos, las cámaras se enjuagan en 70% MEOH durante 2 min teniendo cuidado de no exponer las células. Una gota de medio de montaje con contrateñido DAPI (reactivo ProLong anti-fade con DAPI, Invitrogen cat # P36931) se agrega a cada cámara con un portaobjetos. Se evalúa Inmunofluorescencia utilizando un microscopio fluorescente (Nikon Eclipse E400). Para permitir comparaciones directas, todas las imágenes se obtienen utilizando los mismos parámetros (brillo, contraste, 40 x magnificación, etc.). Las imágenes se adquieren con una cámara digital Spot RT Slider (Diagnostics Instruments, Sterling heights, MI) y se procesan utilizando el software digital Spot Advanced (versión 4.0.9)

Acumulación Intratumoral en Xenoinjertos Subcutáneos

[0247] Se inyectan ratones atímicos hembra (sin pelo) con $1x10^7$ células Ramos suspendidas en Matrigel (Collaborative Biomedical Products, Belford, MA, diluido 1:1 en medio RPMI 1640) en el flanco derecho dorsal. Cuando los tumores alcanzan un tamaño apropiado, vehículo (PBS), 018011, RITUXAN®, trastuzumab (utilizado como un isótopo emparejado, control sin unión) o cetuximab (utilizado como un isótopo emparejado, control sin unión) se administran iv (0.2 ml/ratón) en la vena de la cola del ratón. Los tumores se cortan después de 24 o 96 h para análisis. Los tumores se pesan al tiempo de la necropsia. Los tumores se cortan con veneno congelado en medio embebido (composición O.T.C, Tissue-Tek cat# 4583, Sakura Fintec Torrance, CA) y se almacenan a -80° C. Se cortan secciones de cuatro micrones congeladas con una microtoma (Tejido-Tek Cryo 2000). Las secciones se secan al aire durante treinta minutos y se almacenan a -80° C. las secciones luego se fijan y se procesan como se describió de acuerdo con el protocolo IFA (3.1).

Digestión del Tejido de Tumor y Citometría de flujo

[0248] Los tumores se cortan y maceran en 1-2 mm piezas. Las piezas de tumor se digieren con tratamiento de colagenasa tipo 4 (Worthington, Lakewood, NJ) al agregar 2 ml de una solución madre de 2 mg/ml para las piezas de tumor durante 30 min a 37° C. Las células se titulan, se centrifugan para recolectar las células, y luego se resuspenden en medio de cultivo fresco. La unión a las células de tumor dispersas por 018011, RITUXAN® o trastuzumab luego se evalúa mediante citometría de flujo como se describe en el Ejemplo 1.

Resultados

Acumulación Intratumoral en Xenoinjertos Subcutáneos

[0249] Los ratones con xenoinjertos subcutáneos WSU-DLCL2 (masa de tumor entre 130 mg to 270 mg) se administran 01801 1, RITUXAN®, o trastuzumab (0.5 mg/ratón iv) y los tumores se cortan para IFA 24 h después. El teñido de 018011 tiende a ser más difuso que aquel de RITUXAN®. El teñido de RITUXAN® parece ser más puntual e intenso y no tan difuso como aquel de 018011. Las secciones también se tiñen para los vasos sanguíneos (CD31).

Ningún agente parece estar acumulado alrededor de los vasos, ambos son capaces de difundirse en la profundidad del tumor. Los ratones también se tratan con una dosis de 0.2 mg/ratón iv de 018011 y RITUXAN®. El IFA de los tumores que toman de 0.2 mg de grupo de tratamiento demuestra teñido de 018011 y

RITUXAN® (datos no presentados) aunque el agente es tan intenso o difuso en su teñido como se observa en los grupos de tratamiento 0.5 mg.

[0250] Los ratones con tumores Ramos subcutáneos (masa de tumor entre 100 mg y 400 mg) se tratan con 018011, RITUXAN® o trastuzumab (todo el IgG1 humano) a 1 mg/ratón iv y los tumores se cortan 24 y 96 h después de la inyección de los agentes. La intensidad del teñido de 018011 y la intensidad de teñido de RITUXAN® parecen ser iguales después de 24 o 96 h. Se hacen observaciones similares utilizando xenoinjertos WSU-DLCL2, el teñido 018011 parece ser más difuso que aquel de RITUXAN®, que es más puntual e intenso. El Trastuzumab produce teñido antecedente muy mínimo. Parte de cada tejido de xenoinjerto utilizado para IFA se digiere al tiempo de corte y luego la presencia de 018011, RITUXAN®, o trastuzumab unido a células derivadas de xenoinjertos se analiza mediante citometría de flujo (Figura 26). El perfil de citometría de flujo sugiere que el 018011 y RITUXAN® se detectan unidos a la superficie celular de las células derivadas de xenoinjerto. La unión de 018011 y RITUXAN® es cuantitativamente similar. Las células de los xenoinjertos aislados 96 hr después de la inyección iv de 018011 o RITUXAN® tienen altos niveles del aglutinante CD20 que aquellos aislados 24 hr después del mismo tratamiento. No existe unión detectable de 018011 o RITUXAN® a células derivadas de xenoinjertos aisladas 2 hr después de la inyección iv del agente (datos no presentados). Cuando la dosis de cada agente se reduce a 0.5 mg/ratón iv, parece que la intensidad del teñido de 018011 es ligeramente mejorada en 2 estudios separados (evaluado a 24 h post dosis) con relación a RITUXAN®, aunque esto no es cuantificable bajo las condiciones del estudio. La masa de tumor está entre 290 mg y 420 mg para los ratones utilizados para generar los resultados en y entre 820 mg y 3000 mg para los ratones utilizados en generar los resultados. Parece, por lo tanto, que el tamaño

del tumor no afecta significativamente la acumulación de tumor de agente a pesar de los resultados observadas en que son comparables aunque las masas de tumor son considerablemente más grandes en el segundo de los estudios. Cuando los ratones se tratan con dosis menores de agente objetivo CD20 (0.05, 0.1, o 0.2 mg/ratón iv), no 01801 1 es detectable aunque el teñido mínimo de RITUXAN® se observa en los grupos de dosis 0.1 y 0.2 mg (datos no presentados).

Ejemplo 6. Inhibición de Crecimiento

Ensayo de inhibición de crecimiento

[0251] El crecimiento In vitro de BCL se evalúa utilizando MTS, un tinte vital (Promega, Madison, WI). Esta prueba depende de la conversión de MTS en un producto coloreado mediante mitocondria intacta de células viables y es un indicador confiable de células viables en el cultivo. Para cada una de la curva de calibración 6 BCL (el número de célula versus la densidad óptica del producto coloreado derivado después de aproximadamente 2h de tiempo de incubación con MTS) se establece para estimar una densidad de siembra inicial apropiada. Las células luego se siembran en platos de 96 multipozos en una densidad de 10,000 a 50,000 células por pozo que depende de la estirpe celular. Después de siembra, las células se exponen a varias concentraciones de 018011, TRU-015 o RITUX AN® y, después de un periodo de incubación de 96 hr, se determina el número de célula viable en cada cultivo.

[0252] El efecto de reticulación 018011 o RITUXAN® con anticuerpo Fc IgG anti-humano se evalúa utilizando exclusión de yoduro de propidio (PI) medida por citometría de flujo. Las membranas celulares de las células dañadas permiten PI

168

para ingresar las células y el teñido de ADN nuclear aunque las membranas celulares de células viables son impermeables a PI y así PI no puede teñir ADN nuclear. Para este fin, se colocan en placas treinta mil BCL en placas de microtítulo de 96 pozos con concentraciones incrementadas de 018011 o RITUXAN® seguido por la adición de anticuerpo Fc IgG anti-humano de cabra (Jackson Immunoresearch) a 1 o 10 µg/ml y incubación a 37° C durante 24 h. Después de la incubación, se mide la viabilidad celular por citometría de flujo mediante exclusión PI. Se conduce análisis de datos utilizando el programa CellQuest (Becton-Dickinson).

Efecto Inhibidor de Crecimiento de 018011 Contra Células de Linfoma B Humano

[0253] La capacidad de 018011 para inhibir el crecimiento de varias estirpes celulares de linfoma B se evalúa in vitro y se compara con aquel de RITUXAN® y TRU-015. Seis estirpes de células B CD20 humano+ se cultivan durante 96 hr con concentraciones incrementadas de aglutinantes individuales CD20 después de lo cual el número de célula viable en cada cultivo se enumera. Como se muestra en la Figura 27, ni 018011, TRU-015, ni RITUXAN® originan directamente inhibición de crecimiento biológicamente significativo en 5 de las 6 estirpes celulares de linfoma B estudiadas. La excepción es la estirpe celular B SU-DHL4 cuyo crecimiento se inhibe en una forma dependiente de dosis mediante TRU-015 y RITUXAN® pero no significativamente mediante 018011. Así, la expresión de CD20 es necesaria pero no suficiente para asegurar la inhibición directa de BCL por cualquiera de los aglutinantes CD20. Los factores diferentes del grado de expresión de superficie de gobierno CD20 la susceptibilidad de células de linfoma B a estos agentes anti-CD20. La reticulación de 018011 o RITUXAN® en la

SECUENCIAS

Cursivas Secuencia ligadora

Subrayado: secuencias CDR

Nombre de construcción

	VK3	VH5	
18011	**2Lm19-3**	**2H5m3**	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC**RASQSVSYI**V WYQQKPGQAPRLLIY**APSNLAS**GIPARFSGS GSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYC**QQWSFNPPT** FGQGTKVEIK*DGGGSGGGGSGGGGTG*EVQLV QSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFT**SYNMH**W VRQMPGKGLEWMG**AIYPGNGDTSYNQKFKG** QVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCAR **SYYSNSYWYFDL**WGRGTLVTVSS (SEQ ID NO:1)
18008	**2Lm5**	**2H5**	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC**RASQSVSYMH** WYQQKPGQAPRLLIY**APSNLAS**GIPARFSGSGS GTDFTLTISSLEPEDFAVYYC**QQWSFNPPT**FGQ GTKVEIK*DGGGSGGGGSGGGGTG*EVQLVQSGA EVKKPGESLKISCKGSGYSFT**SYNMH**WVRQMP GKGLEWMG**AIYPGNGDTSYNQKFKG**QVTISA DKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCAR **VVYYSNSYWYFDL**WGRGTLVTVSS (SEQ ID NO:2)
18010	**2Lm19-3**	**2H5**	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC**RASQSVSYIV** WYQQKPGQAPRLLIY**APSNLAS**GIPARFSGSG SGTDFTLTISSLEPEDFAVYYC**QQWSFNPPT**F GQGTKVEIK*DGGGSGGGGSGGGGTG*EVQLV QSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFT**SYNMH**W VRQMPGKGLEWMG**AIYPGNGDTSYNQKFKG** QVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCAR **VVYYSNSYWYFDL**WGRGTLVTVSS (SEQ ID NO:3)

18009	**2Lm5**	**2H5m3**	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC**RASQSVSYIV** WYQQKPGQAPRLLIY**APSNLAS**GIPARFSGS GSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYC**QQWSFNPPT** FGQGTKVEIK*DGGGSGGGGSGGGGTG*EVQLV QSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFT**SYNMH**W VRQMPGKGLEWMG**AIYPGNGDTSYNQKFKG** QVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCA R**VVYYSNSYWYFDL**WGRGTLVTVSS (SEQ ID NO:4)
2Lm5 2H3m3	**2Lm5**	**2H3m3**	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC**RASQSVSSYMH** WYQQKPGQAPRLLIY**APSNLAS**GIPARFSGSGS GTDFTLTISSLEPEDFAVYYC**QQWSFNPPT**FG QGTKVEIK*DGGGSGGGGSGGGGTG*EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS**SYNMH**WVR QAPGKGLEWVS**AIYPGNGDTSYNQKFKG**RFT ISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA K**SYYSNSYWYFDL**WGRGTLVTVSS (SEQ ID NO:5)

Nombre de Construcción

VK3	**VH1**	
2L	**2Hm**	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSVSSYMHW YQQKPGQAPRLLIYAPSNLASGIPARFSGSGSGTD FTLTISSLEPEDFAVYYCQQWSFNPPTFGQGTKV EIK*DGGGSGGGGSGGGGSS*QVQLVQSGAEVKKP GASVKVSCKASGYTFTSYNMHWVRQAPGQGLE WMGAIYPGNGDTSYNQKFKGRVTMTRDTSTST VYMELSSLRSEDTAVYYCARSVYYSN.YWYFDL WGRGTLVTVSS (SEQ ID NO:6)
2Lm	**2Hm**	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSVSYMIW YQQKPGQAPRLLIYAISNLASGIPARFSGSGSGT DFTLTISSLEPEDFAVYYCQQWISNPPTFGQGTK VEIK*DGGGSGGGGSGGGGSS*QVQLVQSGAEVK KPGASVKVSCKASGYTFTSYNMHWVRQAPGQ GLEWMGAIYPGNGDTSYNQKFKGRVTMTRDT STSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAR SVYYSN.YWYFDLWGRGTLVTVSS (SEQ ID NO:7)

2Lm **2H**

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSVSYMIW
YQQKPGQAPRLLIYAISNLASGIPARFSGSGSGT
DFTLTISSLEPEDFAVYYCQQWISNPPTFGQGTK
VEIK*DGGGSGGGGSGGGGSS*QVQLVQSGAEVK
KPGASVKVSCKASGYTFTSYNMHWVRQAPGQ
GLEWMGAIYPGNGDTSYNQKFKGRVTMTRDT
STSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAR
VVYYSNSYWYFDLWGRGTLVTVSS

(SEQ ID NO:8)

2Lm1 **2Hm**

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSSVSYMH
WYQQKPGQAPRLLIYAPSNLASGIPARFSGSGS
GTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQWISNPPTFGQG
TKVEIK*DGGGSGGGGSGGGGSS*QVQLVQSGAE
VKKPGASVKVSCKASGYTFTSYNMHWVRQAP
GQGLEWMGAIYPGNGDTSYNQKFKGRVTMTRD
TSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAR
SVYYSN.YWYFDLWGRGTLVTVSS

(SEQ ID NO:9)

2Lm1 **2H**

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSSVSYMH
WYQQKPGQAPRLLIYAPSNLASGIPARFSGSGSG
TDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQWISNPPTFGQGTK
VEIK*DGGGSGGGGSGGGGSS*QVQLVQSGAEVKKP
GASVKVSCKASGYTFTSYNMHWVRQAPGQGLEW
MGAIYPGNGDTSYNQKFKGRVTMTRDTSTSTVY
MELSSLRSEDTAVYYCARVVYYSNSYWYFDLW
GRGTLVTVSS

(SEQ ID NO:10)

2Lm2 **2Hm**

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSYMIW
YQQKPGQAPRLLIYAISNLASGIPARFSGSGSGT
DFTLTISSLEPEDFAVYYCQQWSFNPPTFGQGTK
VEIK*DGGGSGGGGSGGGGSS*QVQLVQSGAEVK
KPGASVKVSCKASGYTFTSYNMHWVRQA
PGQGLEWMGAIYPGNGDTSYNQKFKGRV
TMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCA
RSVYYSN.YWYFDLWGRGTLVTVSS

(SEQ ID NO:11)

2Lm3 **2Hm**

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSVSYMI
WYQQKPGQAPRLLIYAISNLASGIPARFSGSG
SGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQWTSNPPTF
GQGTKVEIK*DGGGSGGGGSGGGGSS*QVQLV
QSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYNMH
WVRQAPGQGLEWMGAIYPGNGDTSYNQKFKG

RVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCA
RSVYYSN.YWYFDLWGRGTLVTVSS

(SEQ ID NO:12)

		EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYMH WYQQKPGQAPRLLIYAPSNLASGIPARFSGSGS GTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQWTSNPPTFGQ GTKVEIK*DGGGSGGGGSGGGGSS*QVQLVQSGA EVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYNMHWVRQA
2Lm4	**2Hm**	PGQGLEWMGAIYPGNGDTSYNQKFKGRVTMT RDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAR SVYYSN.YWYFDLWGRGTLVTVSS

(SEQ ID NO:13)

		EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSYMH WYQQKPGQAPRLLIYAPSNLASGIPARFSGSG SGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQWSFNPPTFG QGTKVEIK*DGGGSGGGGSGGGGSS*QVQLVQS GAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYNMHWV
2Lm5	**2Hm**	RQAPGQGLEWMGAIYPGNGDTSYNQKFKGRV TMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCA RSVYYSN.YWYFDLWGRGTLVTVSS

(SEQ ID NO:14)

		EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSYMH WYQQKPGQAPRLLIYAPSNLASGIPARFSGSGS GTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQWSFNPPTFGQ GTKVEIK*DGGGSGGGGSGGGGSS*QVQLVQSGA EVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYNMHWVRQA
2Lm5-1	**2Hm3**	PGQGLEWMGAIYPGNGDTSYNQKFKGRVTMT RDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAR S.YYSNSYWYFDLWGRGTLVTVSS

(SEQ ID NO:15)

		EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSYMH WYQQKPGQAPRLLIYAPSNLASGIPARFSGSGS GTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQWSFNPPTFGQ GTKVEIK*DGGGSGGGGSGGGGSS*QVQLVQSGA EVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYNMHWVRQA
2Lm5-2	**2Hm4**	PGQGLEWMGAIYPGNGDTSYNQKFKGRVTMT RDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAR V.YYSNSYWYFDLWGRGTLVTVSS

(SEQ ID NO:16)

2Lm5-3	**2Hm5**	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSYMH WYQQKPGQAPRLLIYAPSNLASGIPARFSGSGS GTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQWSFNPPTFGQ GTKVEIK*DGGGSGGGGSGGGGSS*QVQLVQSGA EVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYNMHWVRQA PGQGLEWMGAIYPGNGDTSYNQKFKGRVTMT RDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAR SVYY.NSYWYFDLWGRGTLVTVSS

(SEQ ID NO:17)

2Lm6	**2Hm**	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSYMH WYQQKPGQAPRLLIYAPSNLASGIPARFSGSG SGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQWTSNPPTF GQGTKVEIK*DGGGSGGGGSGGGGSS*QVQLV QSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYNMH WVRQAPGQGLEWMGAIYPGNGDTSYNQKFKG RVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAR SVYYSN.YWYFDLWGRGTLVTVSS

(SEQ ID NO:18)

2Lm6-1	**2Hm3**	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSYMH WYQQKPGQAPRLLIYAPSNLASGIPARFSGSGS GTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQWTSNPPTFGQ GTKVEIK*DGGGSGGGGSGGGGSS*QVQLVQSGA EVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYNMHWVRQA PGQGLEWMGAIYPGNGDTSYNQKFKGRVTMT RDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAR S.YYSNSYWYFDLWGRGTLVTVSS

(SEQ ID NO:19)

2Lm6-2	**2Hm4**	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSYMH WYQQKPGQAPRLLIYAPSNLASGIPARFSGSGS GTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQWTSNPPTFGQ GTKVEIK*DGGGSGGGGSGGGGSS*QVQLVQSGA EVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYNMHWVRQA PGQGLEWMGAIYPGNGDTSYNQKFKGRVTMT RDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAR V.YYSNSYWYFDLWGRGTLVTVSS

(SEQ ID NO:20)

2Lm6-3	**2Hm5**	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSYMH WYQQKPGQAPRLLIYAPSNLASGIPARFSGSG SGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQWTSNPPTFG QGTKVEIK*DGGGSGGGGSGGGGSS*QVQLVQS GAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYNMHWV RQAPGQGLEWMGAIYPGNGDTSYNQKFKGR

VTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAR
SVYY.NSYWYFDLWGRGTLVTVSS

(SEQ ID NO:21)

		EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSVSYMH WYQQKPGQAPRLLIYATSNLASGIPARFSGSG SGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQWTSNPPTFG QGTKVEIK*DGGGSGGGGSGGGGSS*QVQLVQS GAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYNMHWV
2Lm7	**2Hm**	RQAPGQGLEWMGAIYPGNGDTSYNQKFKGR VTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAR SVYYSN.YWYFDLWGRGTLVTVSS

(SEQ ID NO:22)

		EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSVSYMI WYQQKPGQAPRLLIYAISNLASGIPARFSGSG SGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQWISNPYTF GQGTKVEIK*DGGGSGGGGSGGGGSS*QVQLV QSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYNMH
2Lm8	**2Hm**	WVRQAPGQGLEWMGAIYPGNGDTSYNQKFK(RVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCA RSVYYSN.YWYFDLWGRGTLVTVSS

(SEQ ID NO:23)

		EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSVSYMI WYQQKPGQAPRLLIYAISNLASGIPARFSGSG SGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQWISNPFTFG QGTKVEIK*DGGGSGGGGSGGGGSS*QVQLVQS GAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYNMHWV
2Lm9	**2Hm**	RQAPGQGLEWMGAIYPGNGDTSYNQKFKGR VTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAR SVYYSN.YWYFDLWGRGTLVTVSS

(SEQ ID NO:24)

		EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSVSYMI WYQQKPGQAPRLLIYAISNLASGIPARFSGSG SGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQWISNPLTFG QGTKVEIK*DGGGSGGGGSGGGGSS*QVQLVQS GAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYNMHWV
2Lm10	**2Hm**	RQAPGQGLEWMGAIYPGNGDTSYNQKFKGR VTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCA RSVYYSN.YWYFDLWGRGTLVTVSS

(SEQ ID NO:25)

2Lm11	**2Hm**	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSVSYMI WYQQKPGQAPRLLIYAISNLASGIPARFSGSG SGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQWISNPITFG QGTKVEIK*DGGGSGGGGSGGGGSS*QVQLVQS GAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYNMHWV RQAPGQGLEWMGAIYPGNGDTSYNQKFKGR VTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAR SVYYSN.YWYFDLWGRGTLVTVSS
		(SEQ ID NO:26)
2Lm12	**2Hm**	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSYMH WYQQKPGQAPRLLIYATSNLASGIPARFSGSG SGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQWSFNPPTFG QGTKVEIK*DGGGSGGGGSGGGGSS*QVQLVQS GAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYNMHWV RQAPGQGLEWMGAIYPGNGDTSYNQKFKGR VTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAR SVYYSN.YWYFDLWGRGTLVTVSS
		(SEQ ID NO:27)
2Lm13	**2Hm**	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSYMH WYQQKPGQAPRLLIYAPSNLASGIPARFSGSGS GTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQWISNPPTFGQG TKVEIK*DGGGSGGGGSGGGGSS*QVQLVQSGAE VKKPGASVKVSCKASGYTFTSYNMHWVRQAP GQGLEWMGAIYPGNGDTSYNQKFKGRVTMTR DTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAR SVYYSN.YWYFDLWGRGTLVTVSS
		(SEQ ID NO:28)
2Lm14	**2Hm**	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSYMH WYQQKPGQAPRLLIYATSNLASGIPARFSGSGS GTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQWISNPPTFGQ GTKVEIK*DGGGSGGGGSGGGGSS*QVQLVQSGA EVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYNMHWVRQA PGQGLEWMGAIYPGNGDTSYNQKFKGRVTMT RDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAR SVYYSN.YWYFDLWGRGTLVTVSS
		(SEQ ID NO:29)
2Lm15	**2Hm**	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSYIHW YQQKPGQAPRLLIYAPSNLASGIPARFSGSGSG TDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQWISNPPTFGQG TKVEIK*DGGGSGGGGSGGGGSS*QVQLVQSGA EVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYNMHWVRQ APGQGLEWMGAIYPGNGDTSYNQKFKGRVT

MTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAR
SVYYSN.YWYFDLWGRGTLVTVSS

(SEQ ID NO:30)

2Lm16	2Hm3	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSVSYMH WYQQKPGQAPRLLIYAPSNLASGIPARFSGSG SGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQWSFNPPTFG QGTKVEIK*DGGGSGGGGSGGGGSS*QVQLVQS GAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYNMHWV RQAPGQGLEWMGAIYPGNGDTSYNQKFKGR VTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAR S.YYSNSYWYFDLWGRGTLVTVSS

(SEQ ID NO:31)

2Lm17-3	2Hm3	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSYLS WYQQKPGQAPRLLIYAPSNLASGIPARFSGSG SGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQWSFNPPTFG QGTKVEIK*DGGGSGGGGSGGGGSS*QVQLVQS GAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYNMHWV RQAPGQGLEWMGAIYPGNGDTSYNQKFKGR VTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCA S.YYSNSYWYFDLWGRGTLVTVSS

(SEQ ID NO:32)

2Lm17-4	2Hm3	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSYLT WYQQKPGQAPRLLIYAPSNLASGIPARFSGSG SGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQWSFNPPTFG QGTKVEIK*DGGGSGGGGSGGGGSS*QVQLVQS GAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYNMHWV RQAPGQGLEWMGAIYPGNGDTSYNQKFKGR VTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAR S.YYSNSYWYFDLWGRGTLVTVSS

(SEQ ID NO:33)

2Lm17-6	2Hm3	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSYLY WYQQKPGQAPRLLIYAPSNLASGIPARFSGSGS GTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQWSFNPPTFGQ GTKVEIK*DGGGSGGGGSGGGGSS*QVQLVQSGA EVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYNMHWVRQA PGQGLEWMGAIYPGNGDTSYNQKFKGRVTMT RDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAR S.YYSNSYWYFDLWGRGTLVTVSS

(SEQ ID NO:34)

2Lm17-8	**2Hm3**	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSYLH WYQQKPGQAPRLLIYAPSNLASGIPARFSGSG SGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQWSFNPPTFG QGTKVEIK*DGGGSGGGGSGGGGSS*QVQLVQS GAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYNMHWV RQAPGQGLEWMGAIYPGNGDTSYNQKFKGR VTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAR S.YYSNSYWYFDLWGRGTLVTVSS (SEQ ID NO:35)
2Lm17-12	**2Hm3**	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSYLN WYQQKPGQAPRLLIYAPSNLASGIPARFSGSG SGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQWSFNPPTF GQGTKVEIK*DGGGSGGGGSGGGGSS*QVQLV QSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYNMH WVRQAPGQGLEWMGAIYPGNGDTSYNQKFK GRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCA RS.YYSNSYWYFDLWGRGTLVTVSS (SEQ ID NO:36)
2Lm17-14	**2Hm3**	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSYLA WYQQKPGQAPRLLIYAPSNLASGIPARFSGSG SGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQWSFNPPTFG QGTKVEIK*DGGGSGGGGSGGGGSS*QVQLVQS GAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYNMHWVR QAPGQGLEWMGAIYPGNGDTSYNQKFKGRVT MTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAR S.YYSNSYWYFDLWGRGTLVTVSS (SEQ ID NO:37)
2Lm18-2	**2Hm3**	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSVSYLA WYQQKPGQAPRLLIYAPSNLASGIPARFSGSG SGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQWSFNPPTFG QGTKVEIK*DGGGSGGGGSGGGGSS*QVQLVQS GAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYNMHWV RQAPGQGLEWMGAIYPGNGDTSYNQKFKGR VTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAR S.YYSNSYWYFDLWGRGTLVTVSS (SEQ ID NO:38)
2Lm18-3	**2Hm3**	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSVSYLN WYQQKPGQAPRLLIYAPSNLASGIPARFSGS GSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQWSFNPPT FGQGTKVEIK*DGGGSGGGGSGGGGSS*QVQLV QSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYNMH WVRQAPGQGLEWMGAIYPGNGDTSYNQKFKG

		RVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAR S.YYSNSYWYFDLWGRGTLVTVSS (SEQ ID NO:39)
2Lm18-4	2Hm3	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSVSYLD WYQQKPGQAPRLLIYAPSNLASGIPARFSGSG SGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQWSFNPPTFG QGTKVEIK*DGGGSGGGGSGGGGSS*QVQLVQS GAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYNMHWV RQAPGQGLEWMGAIYPGNGDTSYNQKFKGR VTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAR S.YYSNSYWYFDLWGRGTLVTVSS (SEQ ID NO:40)
2Lm18-5	2Hm3	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSVSYLSW YQQKPGQAPRLLIYAPSNLASGIPARFSGSGSG TDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQWSFNPPTFGQG TKVEIK*DGGGSGGGGSGGGGSS*QVQLVQSGAE VKKPGASVKVSCKASGYTFTSYNMHWVRQAP GQGLEWMGAIYPGNGDTSYNQKFKGRVTMTR DTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAR S.YYSNSYWYFDLWGRGTLVTVSS (SEQ ID NO:41)
2Lm18-14	2Hm3	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSVSYLHW YQQKPGQAPRLLIYAPSNLASGIPARFSGSGSGT DFTLTISSLEPEDFAVYYCQQWSFNPPTFGQGTK VEIK*DGGGSGGGGSGGGGSS*QVQLVQSGAEVKK PGASVKVSCKASGYTFTSYNMHWVRQAPGQGL EWMGAIYPGNGDTSYNQKFKGRVTMTRDTSTST VYMELSSLRSEDTAVYYCAR S.YYSNSYWYFDLWGRGTLVTVSS (SEQ ID NO:42)
2Lm19-1	2Hm3	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSYIDW YQQKPGQAPRLLIYAPSNLASGIPARFSGSGSGT DFTLTISSLEPEDFAVYYCQQWSFNPPTFGQGTK VEIK*DGGGSGGGGSGGGGSS*QVQLVQSGAEVK KPGASVKVSCKASGYTFTSYNMHWVRQAPGQG LEWMGAIYPGNGDTSYNQKFKGRVTMTRDTST STVYMELSSLRSEDTAVYYCAR S.YYSNSYWYFDLWGRGTLVTVSS (SEQ ID NO:43)

2Lm19-2	2Hm3	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSYISW YQQKPGQAPRLLIYAPSNLASGIPARFSGSGSG TDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQWSFNPPTFGQG TKVEIK*DGGGSGGGGSGGGGSS*QVQLVQSGAE VKKPGASVKVSCKASGYTFTSYNMHWVRQAP GQGLEWMGAIYPGNGDTSYNQKFKGRVTMTR DTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAR S.YYSNSYWYFDLWGRGTLVTVSS

(SEQ ID NO:44)

2Lm19-3	2Hm3	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSYIVW YQQKPGQAPRLLIYAPSNLASGIPARFSGSGSGT DFTLTISSLEPEDFAVYYCQQWSFNPPTFGQGT KVEIK*DGGGSGGGGSGGGGSS*QVQLVQSGAEV KKPGASVKVSCKASGYTFTSYNMHWVRQAPG QGLEWMGAIYPGNGDTSYNQKFKGRVTMTRD TSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAR S.YYSNSYWYFDLWGRGTLVTVSS

(SEQ ID NO:45)

2Lm19-4	2Hm3	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSYIAW YQQKPGQAPRLLIYAPSNLASGIPARFSGSGSG TDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQWSFNPPTFGQG TKVEIK*DGGGSGGGGSGGGGSS*QVQLVQSGAE VKKPGASVKVSCKASGYTFTSYNMHWVRQAP GQGLEWMGAIYPGNGDTSYNQKFKGRVTMTR DTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAR S.YYSNSYWYFDLWGRGTLVTVSS

(SEQ ID NO:46)

2Lm19-7	2Hm3	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSYITW YQQKPGQAPRLLIYAPSNLASGIPARFSGSGSG TDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQWSFNPPTFGQG TKVEIK*DGGGSGGGGSGGGGSS*QVQLVQSGAE VKKPGASVKVSCKASGYTFTSYNMHWVRQAP GQGLEWMGAIYPGNGDTSYNQKFKGRVTMTR DTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAR S.YYSNSYWYFDLWGRGTLVTVSS

(SEQ ID NO:47)

2Lm19-9	2Hm3	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSYIIW YQQKPGQAPRLLIYAPSNLASGIPARFSGSGSG TDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQWSFNPPTFGQG TKVEIK*DGGGSGGGGSGGGGSS*QVQLVQSGAE VKKPGASVKVSCKASGYTFTSYNMHWVRQAP GQGLEWMGAIYPGNGDTSYNQKFKGRVTMTR

DTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAR
S.YYSNSYWYFDLWGRGTLVTVSS

(SEQ ID NO:48)

2Lm19-12	2Hm3	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSYIPW YQQKPGQAPRLLIYAPSNLASGIPARFSGSGSG TDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQWSFNPPTFGQG TKVEIK*DGGGSGGGGSGGGGSS*QVQLVQSGAE VKKPGASVKVSCKASGYTFTSYNMHWVRQAP GQGLEWMGAIYPGNGDTSYNQKFKGRVTMTR DTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAR S.YYSNSYWYFDLWGRGTLVTVSS

(SEQ ID NO:49)

2Lm19-14	2Hm3	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSYINW YQQKPGQAPRLLIYAPSNLASGIPARFSGSGSG TDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQWSFNPPTFGQG TKVEIK*DGGGSGGGGSGGGGSS*QVQLVQSGAE VKKPGASVKVSCKASGYTFTSYNMHWVRQAP GQGLEWMGAIYPGNGDTSYNQKFKGRVTMTR DTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAR S.YYSNSYWYFDLWGRGTLVTVSS

(SEQ ID NO:50)

2Lm20-1	2Hm3	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSVSYISW YQQKPGQAPRLLIYAPSNLASGIPARFSGSGSG TDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQWSFNPPTFGQG TKVEIK*DGGGSGGGGSGGGGSS*QVQLVQSGAE VKKPGASVKVSCKASGYTFTSYNMHWVRQAP GQGLEWMGAIYPGNGDTSYNQKFKGRVTMTR DTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAR S.YYSNSYWYFDLWGRGTLVTVSS

(SEQ ID NO:51)

2Lm20-2	2Hm3	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSVSYIAW YQQKPGQAPRLLIYAPSNLASGIPARFSGSGSG TDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQWSFNPPTFGQG TKVEIK*DGGGSGGGGSGGGGSS*QVQLVQSGAE VKKPGASVKVSCKASGYTFTSYNMHWVRQAP GQGLEWMGAIYPGNGDTSYNQKFKGRVTMTR DTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAR S.YYSNSYWYFDLWGRGTLVTVSS

(SEQ ID NO:52)

182

2Lm20-4	2Hm3	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSVSYIVW YQQKPGQAPRLLIYAPSNLASGIPARFSGSGSG TDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQWSFNPPTFGQG TKVEIK*DGGGSGGGGSGGGGSS*QVQLVQSGAE VKKPGASVKVSCKASGYTFTSYNMHWVRQAP GQGLEWMGAIYPGNGDTSYNQKFKGRVTMTR DTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAR S.YYSNSYWYFDLWGRGTLVTVSS (SEQ ID NO:53)
2Lm20-8	2Hm3	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSVNYIYW YQQKPGQAPRLLIYAPSNLASGIPARFSGSGSG TDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQWSFNPPTFGQG TKVEIK*DGGGSGGGGSGGGGSS*QVQLVQSGAE VKKPGASVKVSCKASGYTFTSYNMHWVRQAP GQGLEWMGAIYPGNGDTSYNQKFKGRVTMTR DTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAR S.YYSNSYWYFDLWGRGTLVTVSS (SEQ ID NO:54)
2Lm20-11	2Hm3	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSVSYIDW YQQKPGQAPRLLIYAPSNLASGIPARFSGSGSG TDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQWSFNPPTFGQG TKVEIK*DGGGSGGGGSGGGGSS*QVQLVQSGAE VKKPGASVKVSCKASGYTFTSYNMHWVRQAP GQGLEWMGAIYPGNGDTSYNQKFKGRVTMTR DTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAR S.YYSNSYWYFDLWGRGTLVTVSS (SEQ ID NO:55)
2Lm20-12	2Hm3	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSVSYIIW YQQKPGQAPRLLIYAPSNLASGIPARFSGSGSG TDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQWSFNPPTFGQG TKVEIK*DGGGSGGGGSGGGGSS*QVQLVQSGAE VKKPGASVKVSCKASGYTFTSYNMHWVRQAP GQGLEWMGAIYPGNGDTSYNQKFKGRVTMTR DTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAR S.YYSNSYWYFDLWGRGTLVTVSS (SEQ ID NO:56)
2Lm20-13	2Hm3	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSVSYIYW YQQKPGQAPRLLIYAPSNLASGIPARFSGSGSG TDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQWSFNPPTFGQG TKVEIK*DGGGSGGGGSGGGGSS*QVQLVQSGAE VKKPGASVKVSCKASGYTFTSYNMHWVRQAP GQGLEWMGAIYPGNGDTSYNQKFKGRVTMTR

DTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAR
S.YYSNSYWYFDLWGRGTLVTVSS

(SEQ ID NO:57)

2Lm5 (18009)	**2H5m3**	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC**RASQSVSYMH** WYQQKPGQAPRLLIY**APSNLAS**GIPARFSGS GSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYC**QQWSFNPPT** FGQGTKVEIKDGGGSGGGGSGGGGTGEVQLV QSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFT**SYNMH**W VRQMPGKGLEWMG**AIYPGNGDTSYNQKFKG** QVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCA R**VVYYSNSYWYFDL**WGRGTLVTVSS

(SEQ ID NO:58)

2Lm5 (2Lm5 2H3m3)	**2H3m3**	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC**RASQSVSYMH** WYQQKPGQAPRLLIY**APSNLAS**GIPARFSGSGS GTDFTLTISSLEPEDFAVYYC**QQWSFNPPT**FG QGTKVEIKDGGGSGGGGSGGGGTGEVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS**SYNMH**WVR QAPGKGLEWVS**AIYPGNGDTSYNQKFKG**RFT ISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA K**SYYSNSYWYFDL**WGRGTLVTVSS

(SEQ ID NO:59)

IgG1	Bisagra **CSSS**	**DQEPKSCDKTHTSPPSS** (SEQ ID NO:60)
IgG1	**CH2CH3 WT**	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF N WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQV SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:61)
IgG1	**CH2CH3 P331S**	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF N WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPA**S**IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQV SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:62)

IgG1	Bisagra WT	DQEPKSCDKTHTCPPCP (SEQ ID NO:63)
IgG1	Bisagra CSCS	DQEPKSCDKTHTSPPCS (SEQ ID NO:64)
IgG1	Bisagra SCCS	DQEPKSSDKTHTCPPCS (SEQ ID NO:65)
IgG1	Bisagra SCCP	DQEPKSSDKTHTCPPCP (SEQ ID NO:66)

SECUENCIAS DE NUCLEÓTIDOS

2Lm1	gaaattgtgttgacacagtctccagccaccctgtctttgtctccaggggaaagagccaccctctcctgca gggccagtcagagtgttagcagctacatgcactggtaccaacagaaacctggccaggctcctaggctc ct catctatgccccatccaacctggcttctggaattccagccaggttcagtggcagtggatccgggacaga c ttcactctcaccatcagcagcctagagcctgaagattttgcagtttattactgtcagcagtggatttcta accctcccacgttcggccaagggaccaaggtggaaatcaaa (SEQ ID NO:67)
2Lm2	gaaattgtgttgacacagtctccagccaccctgtctttgtctccaggggaaagagccaccctctcctgca gggccagtcagagtgttagctacatgatctggtaccaacagaaacctggccaggctcctaggctcctca t ctatgccatatccaacctggcttctggaattccagccaggttcagtggcagtggatccgggacagacttc actctcaccatcagcagcctagagcctgaagattttgcagtttattactgtcagcagtggagttttaacc ctcccacgttcggccaagggaccaaggtggaaatcaaa (SEQ ID NO:68)
2Lm3	gaaattgtgttgacacagtccccagccaccccgtctttgtctccaggtgaaagagccaccctctcctgca gggccagttcaagtgttagctacatgatttggtaccaacagaaacctggccaggcacctaggctcctca t ctatgcaatctccaacctggcttctggaattccagccaggttcagtggcagtggatccgggacagacttc actctcaccatcagcagtctagagcctgaagattttgcagtttattactgtcagcagtggactagtaacc ctcccacgttcggccaagggaccaaggtggaaatcaaa (SEQ ID NO:69)

185.

2Lm4

gaaattgtgttgacacagtccccagccaccccgtctttgtctccaggtgaaagagccaccctctcctgca
gggccagttcaagtgttagctcctacatgatttggtaccaacagaaacctggccaggcacctaggctcc
t
catctatgcaatctccaacctggcttctggaattccagccaggttcagtggcagtggatccgggacaga
c
ttcactctcaccatcagcagtctagagcctgaagattttgcagtttattactgtcagcagtggactagta
accctcccacgttcggccaagggaccaaggtggaaatcaaa

(SEQ ID NO:70)

2Lm5

gaaattgtgttgacacagtctccagccaccctgtctttgtctccaggggaaagagccaccctctcctgca
gggccagtcagagtgttagctacatgcactggtaccaacagaaacctggccaggctcctaggctcctc
at
ctatgccccatccaacctggcttctggaattccagccaggttcagtggcagtggatccgggacagactt
c
actctcaccatcagcagcctagagcctgaagattttgcagtttattactgtcagcagtggagttttaacc
ctcccacgttcggccaagggaccaaggtggaaatcaaa

(SEQ ID NO:71)

2Lm5-1

gaaattgtgttgacacagtctccagccaccctgtctttgtctccaggtgaaagagccaccctctcctgca
gggccagtcagagtgttagctacatgcactggtaccaacagaaacctggccaggcacctaggctcctc
atctatgccccatccaacctggcttctggaattccagccaggttcagtggcagtggatccgggacagac
ttcactctcaccatcagcagtctagagcctgaagattttgcagtttattactgtcagcagtggagttttaacc
ctcccacgttcggccaagggaccaaggtggaaatcaaa

(SEQ ID NO:72)

2Lm5-2

gaaattgtgttgacacagtctccagccaccctgtctttgtctccaggtgaaagagccaccctctcctgca
gggccagtcagagtgttagctacatgcactggtaccaacagaaacctggccaggcacctaggctcctc
atctatgccccatccaacctggcttctggaattccagccaggttcagtggcagtggatccgggacagac
ttcactctcaccatcagcagtctagagcctgaagattttgcagtttattactgtcagcagtggagttttaacc
ctcccacgttcggccaagggaccaaggtggaaatcaaa

(SEQ ID NO:73)

2Lm5-3

gaaattgtgttgacacagtctccagccaccctgtctttgtctccaggtgaaagagccaccctctcctgca
gggccagtcagagtgttagctacatgcactggtaccaacagaaacctggccaggcacctaggctcctc
atctatgccccatccaacctggcttctggaattccagccaggttcagtggcagtggatccgggacagac
ttcactctcaccatcagcagtctagagcctgaagattttgcagtttattactgtcagcagtggagttttaacc
ctcccacgttcggccaagggaccaaggtggaaatcaaa

(SEQ ID NO: 74)

2Lm6

gaaattgtgttgacacagtctccagccaccctgtctttgtctccaggtgaaagagccaccctctcctgca
gggccagtcagagtgttagctacatgcactggtaccaacagaaacctggccaggcacctaggctcctc
at
ctatgccccatccaacctggcttctggaattccagccaggttcagtggcagtggatccgggacagactt
c
actctcaccatcagcagtctagagcctgaagattttgcagtttattactgtcagcagtggacttctaacc
ctcccacgttcggccaagggaccaaggtggaaatcaaa

(SEQ ID NO:75)

186.

2Lm6-1

gaaattgtgttgacacagtctccagccaccctgtctttgtctccaggtgaaagagccaccctctcctgca
gggccagtcagagtgttagctacatgcactggtaccaacagaaacctggccaggcacctaggctcctc
atctatgccccatccaacctggcttctggaattccagccaggttcagtggcagtggatccgggacagac
ttcactctcaccatcagcagtctagagcctgaagattttgcagtttattactgtcagcagtggactagtaac
ctcccacgttcggccaagggaccaaggtggaaatcaaa

(SEQ ID NO:76)

2Lm6-2

gaaattgtgttgacacagtctccagccaccctgtctttgtctccaggtgaaagagccaccctctcctgca
gggccagtcagagtgttagctacatgcactggtaccaacagaaacctggccaggcacctaggctcctc
atctatgccccatccaacctggcttctggaattccagccaggttcagtggcagtggatccgggacagac
ttcactctcaccatcagcagtctagagcctgaagattttgcagtttattactgtcagcagtggacttctaacc
ctcccacgttcggccaagggaccaaggtggaaatcaaa

(SEQ ID NO:77)

2Lm6-3

Gaaattgtgttgacacagtctccagccaccctgtctttgtctccaggtgaaagagccaccctctcctgca
gggccagtcagagtgttagctacatgcactggtaccaacagaaacctggccaggcacctaggctcctc
atctatgccccatccaacctggcttctggaattccagccaggttcagtggcagtggatccgggacagac
ttcactctcaccatcagcagtctagagcctgaagattttgcagtttattactgtcagcagtggactagtaac
ctcccacgttcggccaagggaccaaggtggaaatcaaa

(SEQ ID NO: 78)

2Lm7

gaaattgtgttgacacagtctccagccaccctgtctttgtctccaggtgaaagagccaccctctcctgca
gggccagttcaagtgttagctacatgcactggtaccaacagaaacctggccaggcacctaggctcctc
at
ctatgccacatccaacctggcttctggaattccagccaggttcagtggcagtggatccgggacagactt
c
actctcaccatcagcagtctagagcctgaagattttgcagtttattactgtcagcagtggactagtaacc
ctcccacgttcggccaagggaccaaggtggaaatcaaa

(SEQ ID NO:79)

2Lm8

gaaattgtgttgacacagtctccagccaccctgtctttgtctccaggtgaaagagccaccctctcctgca
gggccagttcaagtgttagctacatgatttggtaccaacagaaacctggccaggcacctaggctcctca
t
ctatgcaatctccaacctggcttctggaattccagccaggttcagtggcagtggatccgggacagacttc
actctcaccatcagcagtctagagcctgaagattttgcagtttattactgtcagcagtggatttctaacc
cttacactttcggccaagggaccaaggtggaaatcaaa

(SEQ ID NO:80)

2Lm9

gaaattgtgttgacacagtctccagccaccctgtctttgtctccaggtgaaagagccaccctctcctgca
gggccagttcaagtgttagctacatgatttggtaccaacagaaacctggccaggcacctaggctcctca
t
ctatgcaatctccaacctggcttctggaattccagccaggttcagtggcagtggatccgggacagacttc
actctcaccatcagcagtctagagcctgaagattttgcagtttattactgtcagcagtggatttctaacc
ctttcactttcggccaagggaccaaggtggaaatcaaa

(SEQ ID NO:81)

284.

2Lm10

gaaattgtgttgacacagtctccagccaccctgtctttgtctccaggtgaaagagccaccctctcctgca
gggccagttcaagtgttagctacatgatttggtaccaacagaaacctggccaggcacctaggctcctca
t
ctatgcaatctccaacctggcttctggaattccagccaggttcagtggcagtggatccgggacagacttc
actctcaccatcagcagtctagagcctgaagattttgcagtttattactgtcagcagtggatttctaacc
ctctcactttcggccaagggaccaaggtggaaatcaaa

(SEQ ID NO:82)

2Lm11

gaaattgtgttgacacagtctccagccaccctgtctttgtctccaggtgaaagagccaccctctcctgca
gggccagttcaagtgttagctacatgatttggtaccaacagaaacctggccaggcacctaggctcctca
tctatgcaatctccaacctggcttctggaattccagccaggttcagtggcagtggatccgggacagactt
cactctcaccatcagcagtctagagcctgaagattttgcagtttattactgtcagcagtggatttctaaccct
atcactttcggccaagggaccaaggtggaaatcaaa

(SEQ ID NO:83)

2Lm12

gaaattgtgttgacacagtctccagccaccctgtctttgtctccaggtgaaagagccaccctctcctgca
gggccagtcagagtgttagctacatgcactggtaccaacagaaacctggccaggcacctaggctcctc
at
ctatgccacatccaacctggcttctggaattccagccaggttcagtggcagtggatccgggacagactt
c
actctcaccatcagcagtctagagcctgaagattttgcagtttattactgtcagcagtggagttttaacc
ctcccacgttcggccaagggaccaaggtggaaatcaaa

(SEQ ID NO:84)

2Lm13

gaaattgtgttgacacagtctccagccaccctgtctttgtctccaggtgaaagagccaccctctcctgca
gggccagtcagagtgttagctacatgcactggtaccaacagaaacctggccaggcacctaggctcctc
at
ctatgccccatccaacctggcttctggaattccagccaggttcagtggcagtggatccgggacagactt
c
actctcaccatcagcagtctagagcctgaagattttgcagtttattactgtcagcagtggatcagtaacc
cacccacgttcggccaagggaccaaggtggaaatcaaa

(SEQ ID NO:85)

2Lm14

gaaattgtgttgacacagtctccagccaccctgtctttgtctccaggtgaaagagccaccctctcctgca
gggccagtcagagtgttagctacatgcactggtaccaacagaaacctggccaggcacctaggctcctc
at
ctatgccacatccaacctggcttctggaattccagccaggttcagtggcagtggatccgggacagactt
c
actctcaccatcagcagtctagagcctgaagattttgcagtttattactgtcagcagtggatcagtaacc
cacccacgttcggccaagggaccaaggtggaaatcaaa

(SEQ ID NO:86)

288

2Lm15

gaaattgtgttgacacagtctccagccaccctgtctttgtctccaggtgaaagagccaccctctcctgca
gggccagtcagagtgttagctacatacactggtaccaacagaaacctggccaggcacctaggctcctc
at
ctatgccccatccaacctggcttctggaattccagccaggttcagtggcagtggatccgggacagactt
c
actctcaccatcagcagtctagagcctgaagattttgcagtttattactgtcagcagtggatcagtaacc
cacccacgttcggccaagggaccaaggtggaaatcaaa

(SEQ ID NO:87)

2Lm16

gaaattgtgttgacacagtctccagccaccctgtctttgtctccaggtgaaagagccaccctctcctgca
gggccagttccagtgttagctacatgcactggtaccaacagaaacctggccaggcacctaggctcctc
at
ctatgccccatccaacctggcttctggaattccagccaggttcagtggcagtggatccgggacagactt
c
actctcaccatcagcagtctagagcctgaagattttgcagtttattactgtcagcagtggagttttaacc
ctcccacgttcggccaagggaccaaggtggaaatcaaa

(SEQ ID NO:88)

2Lm17-3

gaaattgtgttgacacagtctccagccaccctgtctttgtctccaggtgaaagagccaccctctcctgca
gggccagtcagagtgttagctacctgtcttggtaccaacagaaacctggccaggcacctaggctcctca
t
ctatgccccatccaacctggcttctggaattccagccaggttcagtggcagtggatccgggacagactt
c
actctcaccatcagcagtctagagcctgaagattttgcagtttattactgtcagcagtggagttttaacc
ctcccacgttcggccaagggaccaaggtggaaatcaaa

(SEQ ID NO:89)

2Lm17-4

gaaattgtgttgacacagtctccagccaccctgtctttgtctccaggtgaaagagccaccctctcctgca
gggccagtcagagtgttagctacctgacttggtaccaacagaaacctggccaggcacctaggctcctc
at
ctatgccccatccaacctggcttctggaattccagccaggttcagtggcagtggatccgggacagactt
c
actctcaccatcagcagtctagagcctgaagattttgcagtttattactgtcagcagtggagttttaacc
ctcccacgttcggccaagggaccaaggtggaaatcaaa

(SEQ ID NO:90)

2Lm17-6

gaaattgtgttgacacagtctccagccaccctgtctttgtctccaggtgaaagagccaccctctcctgca
gggccagtcagagtgttagctacctgtactggtaccaacagaaacctggccaggcacctaggctcctc
at
ctatgccccatccaacctggcttctggaattccagccaggttcagtggcagtggatccgggacagactt
c
actctcaccatcagcagtctagagcctgaagattttgcagtttattactgtcagcagtggagttttaacc
ctcccacgttcggccaagggaccaaggtggaaatcaaa

(SEQ ID NO:91)

2Lm17-8

gaaattgtgttgacacagtctccagccaccctgtctttgtctccaggtgaaagagccaccctctcctgca
gggccagtcagagtgttagctacctgcactggtaccaacagaaacctggccaggcacctaggctcctc
at
ctatgccccatccaacctggcttctggaattccagccaggttcagtggcagtggatccgggacagactt
c
actctcaccatcagcagtctagagcctgaagattttgcagtttattactgtcagcagtggagttttaacc
ctcccacgttcggccaagggaccaaggtggaaatcaaa

(SEQ ID NO:92)

2Lm17-12

gaaattgtgttgacacagtctccagccaccctgtctttgtctccaggtgaaagagccaccctctcctgca
gggccagtcagagtgttagctacctgaactggtaccaacagaaacctggccaggcacctaggctcctc
at
ctatgccccatccaacctggcttctggaattccagccaggttcagtggcagtggatccgggacagactt
c
actctcaccatcagcagtctagagcctgaagattttgcagtttattactgtcagcagtggagttttaacc
ctcccacgttcggccaagggaccaaggtggaaatcaaa

(SEQ ID NO:93)

2Lm17-14

gaaattgtgttgacacagtctccagccaccctgtctttgtctccaggtgaaagagccaccctctcctgca
gggccagtcagagtgttagctacctggcttggtaccaacagaaacctggccaggcacctaggctcctc
at
ctatgccccatccaacctggcttctggaattccagccaggttcagtggcagtggatccgggacagactt
c
actctcaccatcagcagtctagagcctgaagattttgcagtttattactgtcagcagtggagttttaacc
ctcccacgttcggccaagggaccaaggtggaaatcaaa

(SEQ ID NO:94)

2Lm18-2

gaaattgtgttgacacagtctccagccaccctgtctttgtctccaggtgaaagagccaccctctcctgca
gggccagttccagtgttagctacctggcctggtaccaacagaaacctggccaggcacctaggctcctc
at
ctatgccccatccaacctggcttctggaattccagccaggttcagtggcagtggatccgggacagactt
c
actctcaccatcagcagtctagagcctgaagattttgcagtttattactgtcagcagtggagttttaacc
ctcccacgttcggccaagggaccaaggtggaaatcaaa

(SEQ ID NO:95)

2Lm18-3

gaaattgtgttgacacagtctccagccaccctgtctttgtctccaggtgaaagagccaccctctcctgca
gggccagttccagtgttagctacctgaattggtaccaacagaaacctggccaggcacctaggctcctca
t
ctatgccccatccaacctggcttctggaattccagccaggttcagtggcagtggatccgggacagactt
c
actctcaccatcagcagtctagagcctgaagattttgcagtttattactgtcagcagtggagttttaacc
ctcccacgttcggccaagggaccaaggtggaaatcaaa

(SEQ ID NO:96)

2Lm18-4

gaaattgtgttgacacagtctccagccaccctgtctttgtctccaggtgaaagagccaccctctcctgca
gggccagttccagtgttagctacctggattggtaccaacagaaacctggccaggcacctaggctcctca
t
ctatgccccatccaacctggcttctggaattccagccaggttcagtggcagtggatccgggacagactt
c
actctcaccatcagcagtctagagcctgaagattttgcagtttattactgtcagcagtggagttttaacc
ctcccacgttcggccaagggaccaaggtggaaatcaaa

(SEQ ID NO:97)

2Lm18-5

gaaattgtgttgacacagtctccagccaccctgtctttgtctccaggtgaaagagccaccctctcctgca
gggccagttccagtgttagctacctgtcctggtaccaacagaaacctggccaggcacctaggctcctca
t
ctatgccccatccaacctggcttctggaattccagccaggttcagtggcagtggatccgggacagactt
c
actctcaccatcagcagtctagagcctgaagattttgcagtttattactgtcagcagtggagttttaacc
ctcccacgttcggccaagggaccaaggtggaaatcaaa

(SEQ ID NO:98)

2Lm18-14

gaaattgtgttgacacagtctccagccaccctgtctttgtctccaggtgaaagagccaccctctcctgca
gggccagttccagtgttagctacctgcattggtaccaacagaaacctggccaggcacctaggctcctca
t
ctatgccccatccaacctggcttctggaattccagccaggttcagtggcagtggatccgggacagactt
c
actctcaccatcagcagtctagagcctgaagattttgcagtttattactgtcagcagtggagttttaacc
ctcccacgttcggccaagggaccaaggtggaaatcaaa

(SEQ ID NO:99)

2Lm19-1

gaaattgtgttgacacagtctccagccaccctgtctttgtctccaggtgaaagagccaccctctcctgca
gggccagtcagagtgttagctacattgattggtaccaacagaaacctggccaggcacctaggctcctca
t
ctatgccccatccaacctggcttctggaattccagccaggttcagtggcagtggatccgggacagactt
c
actctcaccatcagcagtctagagcctgaagattttgcagtttattactgtcagcagtggagttttaacc
ctcccacgttcggccaagggaccaaggtggaaatcaaa

(SEQ ID NO:100)

2Lm19-2

gaaattgtgttgacacagtctccagccaccctgtctttgtctccaggtgaaagagccaccctctcctgca
gggccagtcagagtgttagctacatttcctggtaccaacagaaacctggccaggcacctaggctcctca
t
ctatgccccatccaacctggcttctggaattccagccaggttcagtggcagtggatccgggacagactt
c
actctcaccatcagcagtctagagcctgaagattttgcagtttattactgtcagcagtggagttttaacc
ctcccacgttcggccaagggaccaaggtggaaatcaaa

(SEQ ID NO:101)

291

2Lm19-3

gaaattgtgttgacacagtctccagccaccctgtctttgtctccaggtgaaagagccaccctctcctgca
gggccagtcagagtgttagctacattgtttggtaccaacagaaacctggccaggcacctaggctcctca
t
ctatgccccatccaacctggcttctggaattccagccaggttcagtggcagtggatccgggacagactt
c
actctcaccatcagcagtctagagcctgaagattttgcagtttattactgtcagcagtggagttttaacc
ctcccacgttcggccaagggaccaaggtggaaatcaaa

(SEQ ID NO:102)

2Lm19-4

gaaattgtgttgacacagtctccagccaccctgtctttgtctccaggtgaaagagccaccctctcctgca
gggccagtcagagtgttagctacattgcttggtaccaacagaaacctggccaggcacctaggctcctca
t
ctatgccccatccaacctggcttctggaattccagccaggttcagtggcagtggatccgggacagactt
c
actctcaccatcagcagtctagagcctgaagattttgcagtttattactgtcagcagtggagttttaacc
ctcccacgttcggccaagggaccaaggtggaaatcaaa

(SEQ ID NO:103)

2Lm19-7

gaaattgtgttgacacagtctccagccaccctgtctttgtctccaggtgaaagagccaccctctcctgca
gggccagtcagagtgttagctacattacctggtaccaacagaaacctggccaggcacctaggctcctc
at
ctatgccccatccaacctggcttctggaattccagccaggttcagtggcagtggatccgggacagactt
c
actctcaccatcagcagtctagagcctgaagattttgcagtttattactgtcagcagtggagttttaacc
ctcccacgttcggccaagggaccaaggtggaaatcaaa

(SEQ ID NO:104)

2Lm19-9

gaaattgtgttgacacagtctccagccaccctgtctttgtctccaggtgaaagagccaccctctcctgca
gggccagtcagagtgttagctacattatttggtaccaacagaaacctggccaggcacctaggctcctca
t
ctatgccccatccaacctggcttctggaattccagccaggttcagtggcagtggatccgggacagactt
c
actctcaccatcagcagtctagagcctgaagattttgcagtttattactgtcagcagtggagttttaacc
ctcccacgttcggccaagggaccaaggtggaaatcaaa

(SEQ ID NO:105)

2Lm19-12

gaaattgtgttgacacagtctccagccaccctgtctttgtctccaggtgaaagagccaccctctcctgca
gggccagtcagagtgttagctacattccctggtaccaacagaaacctggccaggcacctaggctcctc
at
ctatgccccatccaacctggcttctggaattccagccaggttcagtggcagtggatccgggacagactt
c
actctcaccatcagcagtctagagcctgaagattttgcagtttattactgtcagcagtggagttttaacc
ctcccacgttcggccaagggaccaaggtggaaatcaaa

(SEQ ID NO:106)

2Lm19-14

gaaattgtgttgacacagtctccagccaccctgtctttgtctccaggtgaaagagccaccctctcctgca
gggccagtcagagtgttagctacattaactggtaccaacagaaacctggccaggcacctaggctcctc
at
ctatgccccatccaacctggcttctggaattccagccaggttcagtggcagtggatccgggacagactt
c
actctcaccatcagcagtctagagcctgaagattttgcagtttattactgtcagcagtggagttttaacc
ctcccacgttcggccaagggaccaaggtggaaatcaaa

(SEQ ID NO:107)

2Lm20-1

gaaattgtgttgacacagtctccagccaccctgtctttgtctccaggtgaaagagccaccctctcctgca
gggccagttccagtgttagctacatttcttggtaccaacagaaacctggccaggcacctaggctcctcat
ctatgccccatccaacctggcttctggaattccagccaggttcagtggcagtggatccgggacagactt
c
actctcaccatcagcagtctagagcctgaagattttgcagtttattactgtcagcagtggagttttaacc
ctcccacgttcggccaagggaccaaggtggaaatcaaa

(SEQ ID NO:108)

2Lm20-2

gaaattgtgttgacacagtctccagccaccctgtctttgtctccaggtgaaagagccaccctctcctgca
gggccagttccagtgttagctacattgcctggtaccaacagaaacctggccaggcacctaggctcctca
t
ctatgccccatccaacctggcttctggaattccagccaggttcagtggcagtggatccgggacagactt
c
actctcaccatcagcagtctagagcctgaagattttgcagtttattactgtcagcagtggagttttaacc
ctcccacgttcggccaagggaccaaggtggaaatcaaa

(SEQ ID NO:109)

2Lm20-4

gaaattgtgttgacacagtctccagccaccctgtctttgtctccaggtgaaagagccaccctctcctgca
gggccagttccagtgttagctacattgtttggtaccaacagaaacctggccaggcacctaggctcctcat
ctatgccccatccaacctggcttctggaattccagccaggttcagtggcagtggatccgggacagactt
cactctcaccatcagcagtctagagcctgaagattttgcagtttattactgtcagcagtggagttttaaccc
tcccacgttcggccaagggaccaaggtggaaatcaaa

(SEQ ID NO:110)

2Lm20-8

gaaattgtgttgacacagtctccagccaccctgtctttgtctccaggtgaaagagccaccctctcctgca
gggccagttccagtgttaactacatttattggtaccaacagaaacctggccaggcacctaggctcctcat
ctatgccccatccaacctggcttctggaattccagccaggttcagtggcagtggatccgggacagactt
c
actctcaccatcagcagtctagagcctgaagattttgcagtttattactgtcagcagtggagttttaacc
ctcccacgttcggccaagggaccaaggtggaaatcaaa

(SEQ ID NO:111)

2Lm20-11

gaaattgtgttgacacagtctccagccaccctgtctttgtctccaggtgaaagagccaccctctcctgca
gggccagttccagtgttagctacattgattggtaccaacagaaacctggccaggcacctaggctcctca
t
ctatgccccatccaacctggcttctggaattccagccaggttcagtggcagtggatccgggacagactt
c
actctcaccatcagcagtctagagcctgaagattttgcagtttattactgtcagcagtggagttttaacc
ctcccacgttcggccaagggaccaaggtggaaatcaaa

(SEQ ID NO:112)

gaaattgtgttgacacagtctccagccaccctgtctttgtctccaggtgaaagagccaccctctcctgca
gggccagttccagtgttagctccattatctggtaccaacagaaacctggccaggcacctaggctcctcat
ctatgccccatccaacctggcttctggaattccagccaggttcagtggcagtggatccgggacagactt
c

2Lm20-12 actctcaccatcagcagtctagagcctgaagattttgcagtttattactgtcagcagtggagttttaacc
ctcccacgttcggccaagggaccaaggtggaaatcaaa

(SEQ ID NO:113)

gaaattgtgttgacacagtctccagccaccctgtctttgtctccaggtgaaagagccaccctctcctgca
gggccagttccagtgttagctacatttattggtaccaacagaaacctggccaggcacctaggctcctcat
ctatgccccatccaacctggcttctggaattccagccaggttcagtggcagtggatccgggacagactt
c

2Lm20-13 actctcaccatcagcagtctagagcctgaagattttgcagtttattactgtcagcagtggagttttaacc
ctcccacgttcggccaagggaccaaggtggaaatcaaa

(SEQ ID NO:114)

gaaattgtgttgacacagtctccagccaccctgtctttgtctccaggggaaagagccaccctctcctgca
gggccagtcagagtgttagctacatgatctggtaccaacagaaacctggccaggctcctaggctcctca
t
ctatgccatatccaacctggcttctggaattccagccaggttcagtggcagtggatccgggacagacttc

2Lm actctcaccatcagcagcctagagcctgaagattttgcagtttattactgtcagcagtggatttctaacc
ctcccacgttcggccaagggaccaaggtggaaatcaaa

(SEQ ID NO:115)

gaaattgtgttgacacagtctccagccaccctgtctttgtctccaggtgaaagagccaccctctcctgca
gggccagtcagagtgttagcagctacatgcactggtaccaacagaaacctggccaggcacctaggct
cctcatctatgccccatccaacctggcttctggaattccagccaggttcagtggcagtggatccgggac

2L agacttcactctcaccatcagcagtctagagcctgaagattttgcagtttattactgtcagcagtggagtttt
aaccctcccacgttcggccaagggaccaaggtggaaatcaaa

(SEQ ID NO: 116)

caggcttatctacagcagtctggggctgagctggtgaggcctggggcctcagtgaagatgtcctgcaa
gg
cttctggctacacatttaccagttacaatatgcactgggtaaagcagacacctagacagggcctggaatg
gattggagctatttatccaggaaatggtgatacttcctacaatcagaagttcaagggcaaggccacactg

2H7_mVK actgtagacaaatcctccagcacagcctacatgcagctcagcagcctgacatctgaagactctgcggtc
t
atttctgtgcaagagtggtgtactatagtaactcttactggtacttcgatgtctggggcacagggaccac
ggtcaccgtctct

(SEQ ID NO:117)

2H5m3

gaggtgcagctggtgcagtctggagcagaggtgaaaaagcccggagagtctctgaagatttcctgtaa
gg
gatccggatacagctttaccagctacaacatgcactgggtgcgccagatgcccgggaaaggcctcga
gtg
gatgggggctatctatcctggaaatggtgatacatcctacaatcagaagttcaagggccaggtcactatc
tcggccgacaagtccatcagcaccgcctacctgcaatggagcagcctgaaggcctcggacaccgcc
atgtattactgtgcacgcagcgtgtactatagtaactactggtacttcgatctctggggccgcggcaccct
ggt
cactgtctcctct

(SEQ ID NO:118)

2H5

gaggtgcagctggtgcagtctggagcagaggtgaaaaagcccggagagtctctgaagatttcctgtaa
gg
gatccggatacagctttaccagctacaacatgcactgggtgcgccagatgcccgggaaaggcctcga
gtg
gatgggggctatctatcctggaaatggtgatacatcctacaatcagaagttcaagggccaggtcactatc
tcggccgacaagtccatcagcaccgcctacctgcaatggagcagcctgaaggcctcggacaccgcc
atgtattactgtgcacgcgtcgtgtactatagtaactcttactggtacttcgatctctggggccgcggcacc
ct
ggtcactgtctcctct

(SEQ ID NO:119)

2H3m3

(CDR3 mutante en estructura huVH3-47 y JH2)

gaggtgcagctgttggagtctggtggaggcttggtacagcctggcggatccctgagactctcct
gtgcagcctctggattcacctttagcagctataacatgcactgggtccgccaggctccagggaagggca
ct
ggagtgggtctcagctatctatcctggaaatggtgatacatcctacaatcagaagttcaagggccggttc
accatctccagagacaattccaagaacacgctgtatctgcaaatgaacagcctgagagccgaggcacac
gg
ccgtatattactgtgcgaaaagctactatagtaactcctactggtacttcgatctctggggccgcggcac
cctggtcactgtctcctca

(SEQ ID NO:120)

2Hm

(CDR3 mutante en estructura huVH1 y JH2)

caggtgcagctggtgcagtctggtgctgagagcaagaagcctggggcctcagtgaaggtttcctgcaa
gg
ctagcggatacaccttcaccagctacaatatgcactgggtgcgacaggcgcctggacaagggctcga
gtg
gatgggagctatctatcctggaaatggtgatacatcctacaatcagaagttcaagggcagggtcaccat
g
accagagacacgtccacgagcacagtctacatggagctgagcagcctgagatctgaggacacggcc
gtgtattactgtgcccgaagcgtgtactatagtaactactggtacttcgatctctggggccgcggcaccct
ggt
cactgtctcctct

(SEQ ID NO:121)

195.

2H (CDR WT 2H7 en estructura huVH1 y JH2)	caggtgcagctggtgcagtctggtgctgagagcaagaagcctggggcctcagtgaaggtttcct gcaaggctagcggatacaccttcaccagctacaatatgcactgggtgcgacaggcgcctggacaagg gctcgagtggatgggagctatctatcctggaaatggtgatacatcctacaatcagaagttcaagggcag ggtc accatgaccagagacacgtccacgagcacagtctacatggagctgagcagcctgagatctgaggaca cggccgtgtatttctgtgcccgagtggtgtactatagtaactcttactggtacttcgatctctggggccgcg g caccctggtcactgtctcctct (SEQ ID NO:122)
2Hm3 (CDR mutante)	caggtgcagctggtgcagtctggtgctgagagcaagaagcctggggcctcagtgaaggtttcctgcaa gg ctagcggatacaccttcaccagctacaatatgcactgggtgcgacaggcgcctggacaagggctcga gtg gatgggagctatctatcctggaaatggtgatacatcctacaatcagaagttcaagggcagggtcaccat g accagagacacgtccacgagcacagtctacatggagctgagcagcctgagatctgaggacacggcc gtgtattactgtgcccgaagctactatagtaactcttactggtacttcgatctctggggccgcggcaccct ggtcactgtctcctct (SEQ ID NO:123)
2Hm4 (CDR mutante)	caggtgcagctggtgcagtctggtgctgagagcaagaagcctggggcctcagtgaaggtttcctgcaa gg ctagcggatacaccttcaccagctacaatatgcactgggtgcgacaggcgcctggacaagggctcga gtg gatgggagctatctatcctggaaatggtgatacatcctacaatcagaagttcaagggcagggtcaccat g accagagacacgtccacgagcacagtctacatggagctgagcagcctgagatctgaggacacggcc gtgtattactgtgcccgagtgtactatagtaactcttactggtacttcgatctctggggccgcggcaccct ggt cactgtctcctct (SEQ ID NO:124)
2Hm5 (CDR3 mutante en estructura huVH1 y JH2)	caggtgcagctggtgcagtctggtgctgagagcaagaagcctggggcctcagtgaaggtttcctgcaa gg ctagcggatacaccttcaccagctacaatatgcactgggtgcgacaggcgcctggacaagggctcga gtg gatgggagctatctatcctggaaatggtgatacatcctacaatcagaagttcaagggcagggtcaccat g accagagacacgtccacgagcacagtctacatggagctgagcagcctgagatctgaggacacggcc gtgtattactgtgcccgaagcgtgtactataactcttactggtacttcgatctctggggccgcggcaccct ggtcactgtctcctct (SEQ ID NO:125)
2H3 (CDR WT 2H7 en estructura huVH3-47 y JH2)	gaggtgcagctgttggagtctggtggaggcttggtacagcctggcggatccctgagactctcct gtacagcctctggattcacctttagcagctataacatgcactgggtccgccaggctccagggaagggca ct ggagtgggtctcagctatctatcctggaaatggtgatacatcctacaatcagaagttcaagggccggttc accatctccagagacaattccaagaacacgctgtatctgcaaatgaacagcctgagagccgaggacac gg ccgtatattactgtgcgaaagtcgtgtactatagtaactcctactggtacttcgatctctggggccgcgg caccctggtcactgtctcctct (SEQ ID NO:126)

2H7mVH

caggcttatctacagcagtctggggctgagctggtgaggcctggggcctcagtgaagatgtcctgcaa
gg
cttctggctacacatttaccagttacaatatgcactgggtaaagcagacacctagacagggcctggaatg
gattggagctatttatccaggaaatggtgatacttcctacaatcagaagttcaagggcaaggccacactg
actgtagacaaatcctccagcacagcctacatgcagctcagcagcctgacatctgaagactctgcggtc
t
atttctgtgcaagagtggtgtactatagtaactcttactggtacttcgatgtctggggcacagggaccac
ggtcaccgtctct

(SEQ ID NO:127)

IgG1
Bisagra y **CH2CH3**

EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT
CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY
RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK
GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG
NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

(SEQ ID NO:128)

CD20 Humano
(dominio extracelular
subrayado)

MTTPRNSVNGTFPAEPMKGPIAMQSGPKPLFRRMSSLVGPTQSFF
MRESKTLGAVQIMNGLFHIALGGLLMIPAGIYAPICVTVWYPLW
GGIMYIISGSLLAATEKNSRKCLVKGKMIMNSLSLFAAISGMILSI
MDILNI**KISHFLKMESLNFIRAHTPYINIYNCEPANPSEKNSPST**
QYCYSIQSLFLGILSVMLIFAFFQELVIAGIVENEWKRTCSRPKSNI
VLLSAEEKKEQTIEIKEEVVGLTETSSQPKNEEDIEIIPIQEEEEEET
ETNFPEPPQDQESSPIENDSSP

(SEQ ID NO: 129)

197.

REIVINDICACIONES

Lo que se reivindica es:

1. Una molécula de unión CD20 humanizada que comprende un dominio variable de cadena pesada de inmunoglobulina (VH) y un dominio variable de cadena liviana de inmunoglobulina (VL) que comprende regiones de estructura y regiones CDR1, CDR2 y CDR3, en donde dichas regiones de estructura son regiones de estructura de inmunoglobulina humana y en donde:

(a) la secuencia de aminoácido de dominio VH comprende la secuencia de aminoácido de un CDR3 de cadena pesada encontrado en una cualquiera de la SEQ ID NOS: 1-59; o

(b) la secuencia de aminoácido de dominio VL comprende la secuencia de aminoácido of un CDR3 de cadena liviana encontrado en una cualquiera de la SEQ ID NOS: 1-59; o

(c) la molécula de unión del CD20 humanizado comprende una secuencia de aminoácido VH de (a) y una secuencia de aminoácido VL de (b); o

(d) la molécula de unión del CD20 humanizado comprende una secuencia de aminoácido VH de (a) y una secuencia de aminoácido VL de (b) y en donde dichos VH y VL se encuentran en la misma secuencia de referencia,

o un fragmento de unión CD20 de dicha molécula de unión.

2. La molécula de unión del CD20 humanizado de la reivindicación 1, que comprende adicionalmente:

(a) una secuencia de aminoácido de dominio VH que comprende una secuencia de aminoácido que es por lo menos 90% idéntica a la secuencia de aminoácido de dominio VH encontrada en una cualquiera de la SEQ ID NOS: 1-59; o

(b) una secuencia de aminoácido de dominio VL que comprende una secuencia de aminoácido que es por lo menos 90% idéntica a la secuencia de aminoácido de dominio VL encontrada en una cualquiera de la SEQ ID NOS: 1-59; o

(c) un VH de (a) y un VL de (b); o

(d) el VH de (a) y el VL de (b), que se encuentran en la misma secuencia de referencia.

3. La molécula de unión del CD20 humanizado de la reivindicación 1, que comprende adicionalmente:

(a) una secuencia de aminoácido de dominio VH que comprende una secuencia de aminoácido que es por lo menos 95% idéntica a la secuencia de aminoácido de dominio VH encontrada en una cualquiera de la SEQ ID NOS: 1-59; o

(b) una secuencia de aminoácido de dominio VL que comprende una secuencia de aminoácido que es por lo menos 95% idéntica a la secuencia de aminoácido del dominio VL encontrada en una cualquiera de la SEQ ID NOS: 1-59; o

(c) un VH de (a) y un VL de (b); o

(d) el VH de (a) y el VL de (b), que se encuentran en la misma secuencia de referencia.

4. La molécula de unión del CD20 humanizado de la reivindicación 1, que comprende adicionalmente:

(a) una secuencia de aminoácido de dominio VH que comprende la secuencia de aminoácido de dominio VH encontrada en una cualquiera de la SEQ ID NOS: 1-59; o

(b) una secuencia de aminoácido de dominio VL que comprende la secuencia de aminoácido de dominio VL encontrada en una cualquiera de la SEQ ID NOS: 1-59; o

(c) un VH de (a) y un VL de (b); o

(d) el VH de (a) y el VL de (b), que se encuentran en la misma secuencia de referencia.

5. La molécula de unión del CD20 humanizado de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, que es un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo.

6. La molécula de unión del CD20 humanizado de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, que es un Inmunofarmacéutico Modular Pequeño humanizado (SMIP).

7. Un SMIP humanizado que une específicamente CD20.

8. El SMIP humanizado de la reivindicación 7 que une el mismo epítopo cuando, compite con o compite cruzado con una molécula de unión CD20 humanizada comprende la secuencia de aminoácido mostrada en una cualquiera de las SEQ ID NOS: 1-59.

9. El SMIP humanizado de una cualquiera de las reivindicaciones 6-8, que comprende un dominio de bisagra que tiene la secuencia de aminoácido mostrada en la SEQ ID NO: 60.

10. El SMIP humanizado de la reivindicación 9, que comprende un dominio efector que comprende la secuencia de aminoácido mostrada en la SEQ ID NO: 61.

11. El SMIP humanizado de la reivindicación 7, en donde el SMIP posee por lo menos una de las siguientes propiedades:

(a) actividad ADCC;

(b) actividad CDC;

(c) reduce el crecimiento de tumores de xenoinjerto;

(d) reduce la progresión de linfoma diseminado in vivo;

(e) agota las células CD 19+ B en la sangre periférica, médula ósea y ganglios linfáticos.

12. El SMIP humanizado de la reivindicación 11, en donde el SMIP posee por lo menos tres de las propiedades.

13. La molécula de unión CD20 de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6 o el SMIP humanizado de una cualquiera de las reivindicaciones 7-12 que se etiqueta de forma detectable.

14. Una composición que comprende la molécula de unión CD20 de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6 o el SMIP humanizado de una cualquiera de las reivindicaciones 7-12.

15. Un equipo que comprende la molécula de unión CD20 de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, el SMIP humanizado de una cualquiera de las reivindicaciones 7-12 o una composición de la reivindicación 14 e instrucciones para uso.

16. Un ácido nucleico que la molécula de unión CD20 o fragmento de unión a antígeno de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6 o el SMIP humanizado de una cualquiera de las reivindicaciones 7-12.

17. El ácido nucleico de la reivindicación 16 que codifica el dominio VH y comprende una secuencia de nucleótido que codifica la secuencia de aminoácido VH encontrada en una cualquiera de la SEQ ID NOS: 1-59.

18. El ácido nucleico de la reivindicación 17, que comprende la secuencia de nucleótido de una cualquiera de las SEQ ID NOS: 118-126.

19. El ácido nucleico de la reivindicación 16 que codifica el dominio VL y comprende una secuencia de nucleótido que codifica la secuencia de aminoácido VL encontrada en una cualquiera de la SEQ ID NOS: 1-59.

20. El ácido nucleico de la reivindicación 19, que comprende la secuencia de nucleótido de una cualquiera de las SEQ ID NOS: 67-116.

21. El ácido nucleico de una cualquiera de las reivindicaciones 16-20, ligado operablemente a una secuencia de control de expresión.

22. Un vector que comprende el ácido nucleico de una cualquiera de las reivindicaciones 16-21.

23. Una célula anfitriona que comprende el ácido nucleico de una cualquiera de las reivindicaciones 16-21 o el vector de la reivindicación 22.

24. Un método para producir una molécula de unión CD20 humanizada o fragmento de unión a antígeno de la misma que comprende la etapa de cultivar la célula anfitriona de la reivindicación 23 y recuperar la molécula de unión del CD20 humanizado o fragmento de unión a antígeno.

25. Un método para detectar CD20 en una muestra biológica de un sujeto que comprende la etapa de poner en contacto la muestra con la molécula de unión CD20 o el SMIP humanizado de la reivindicación 13 y detectar la unión.

26. Un método para tratar un sujeto que tiene o se sospecha de que tiene una enfermedad asociada con actividad de células B aberrante, que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva de la molécula de unión del CD20 humanizado de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, el SMIP humanizado de una cualquiera de las reivindicaciones 7-12 o la composición de la reivindicación 14.

27. El método de la reivindicación 26, en donde la enfermedad asociada con actividad de células B aberrante es artritis reumatoide, lupus eritematoso o esclerosis múltiple.

28. Un método para reducir el número de células B en un sujeto en necesidad de este, que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva de la molécula de unión del CD20 humanizado de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, el SMIP humanizado de una cualquiera de las reivindicaciones 7-12 o la composición de la reivindicación 14.

COMPOSICIONES Y MÉTODOS TERAPÉUTICOS ANTI-CD20

Resumen

La presente invención proporciona materiales y métodos para el tratamiento de enfermedades que involucran actividad aberrante de células B, utilizando una molécula de unión específica CD20, en particular, anticuerpos o el fragmento de unión a antígeno de los mismos. Las composiciones descritas aquí son útiles para el tratamiento y diagnóstico de Trastornos de célula B, tal como Malignidades de células B y enfermedades autoinmunes.

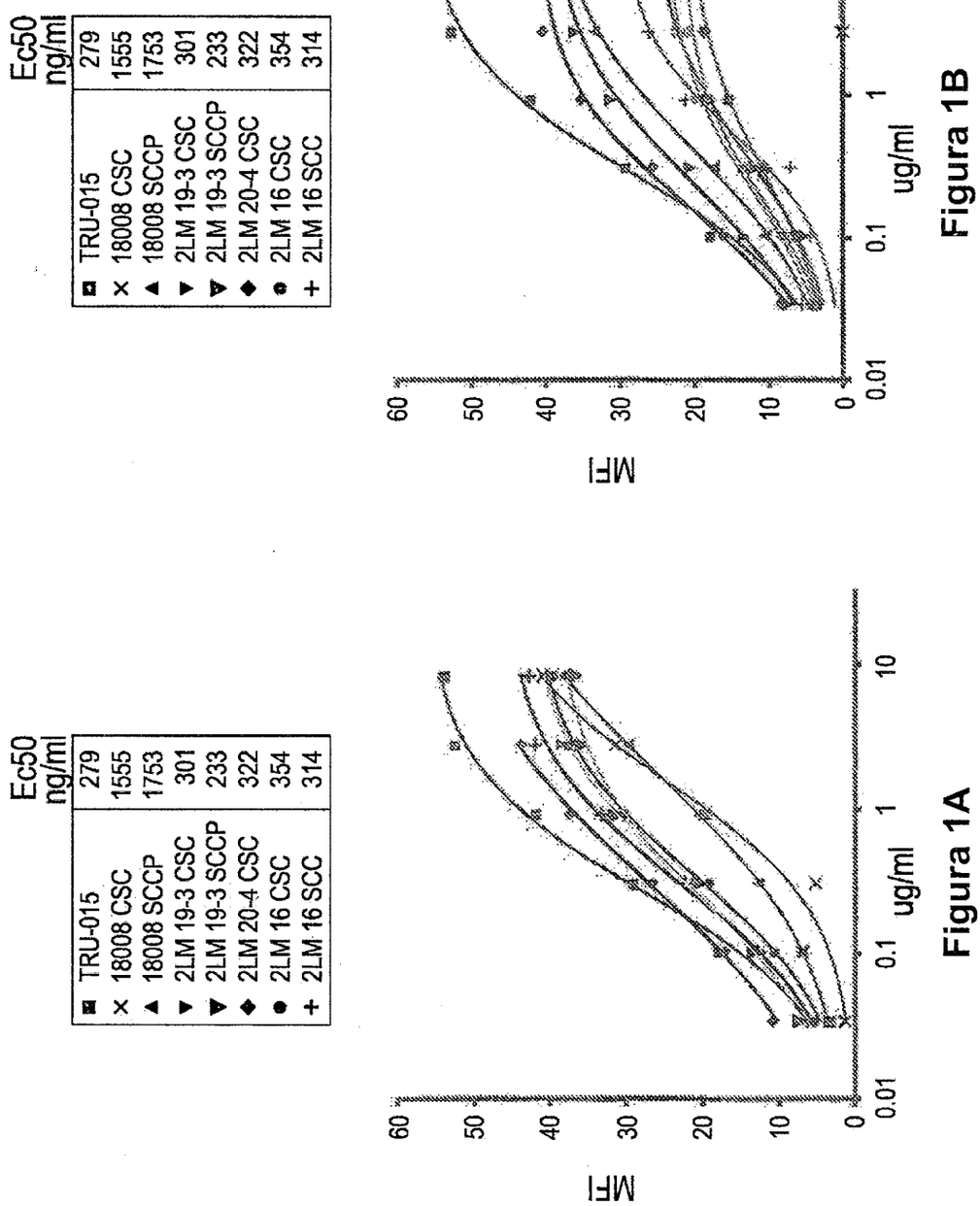


Figura 1B

Figura 1A

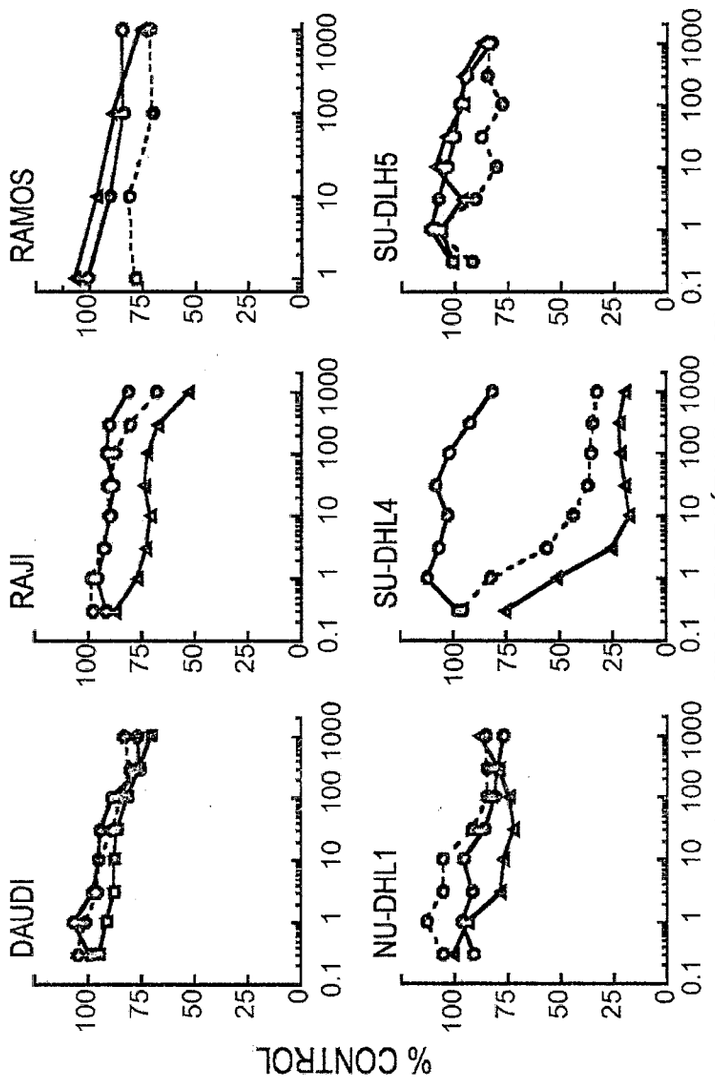
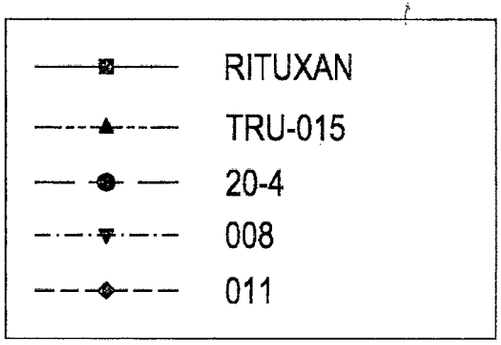

RAMOS
SU-DLH5
RAJI
SU-DHL4
DAUDI
NU-DHL1
% CONTROL
CD20-ESPECÍFICO Fc (nM)
018011
TRU-015
RITUXAN®

Figura 2


RITUXAN
TRU-015
20-4
008
011

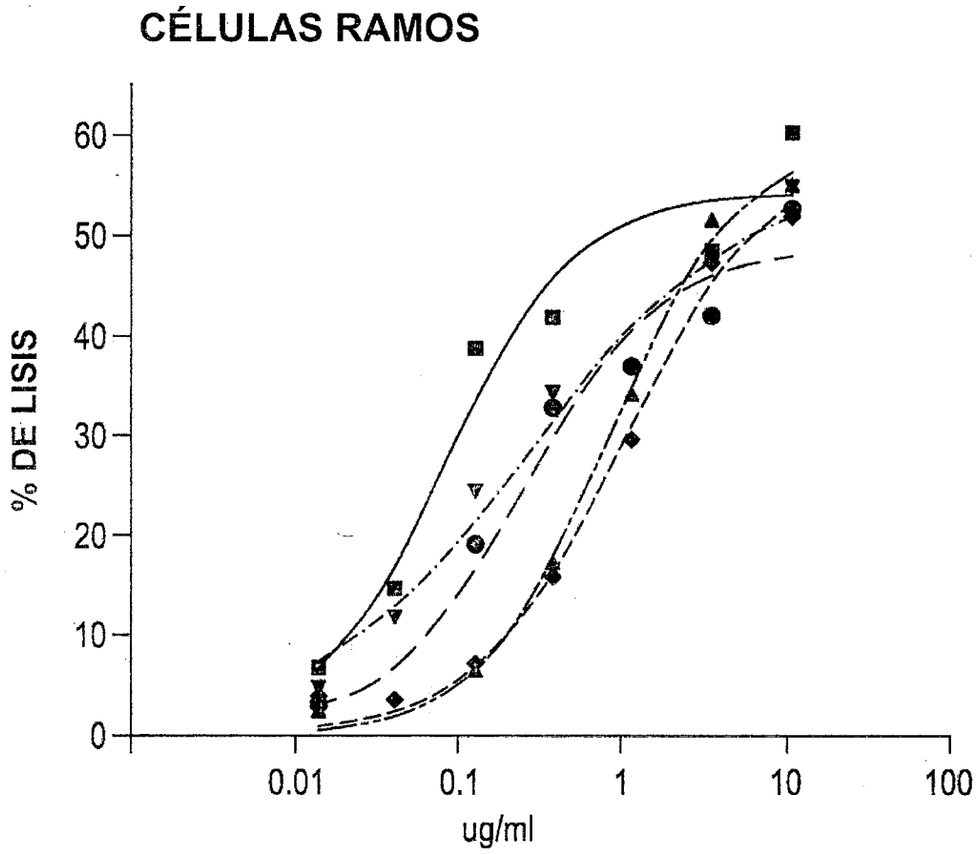
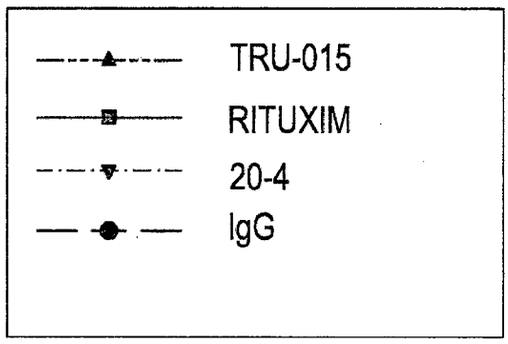

CÉLULAS RAMOS
% DE LISIS
60
50
40
30
20
10
0
0.01
0.1
1
10
100
ug/ml

Figura 3A


TRU-015
RITUXIM
20-4
IgG

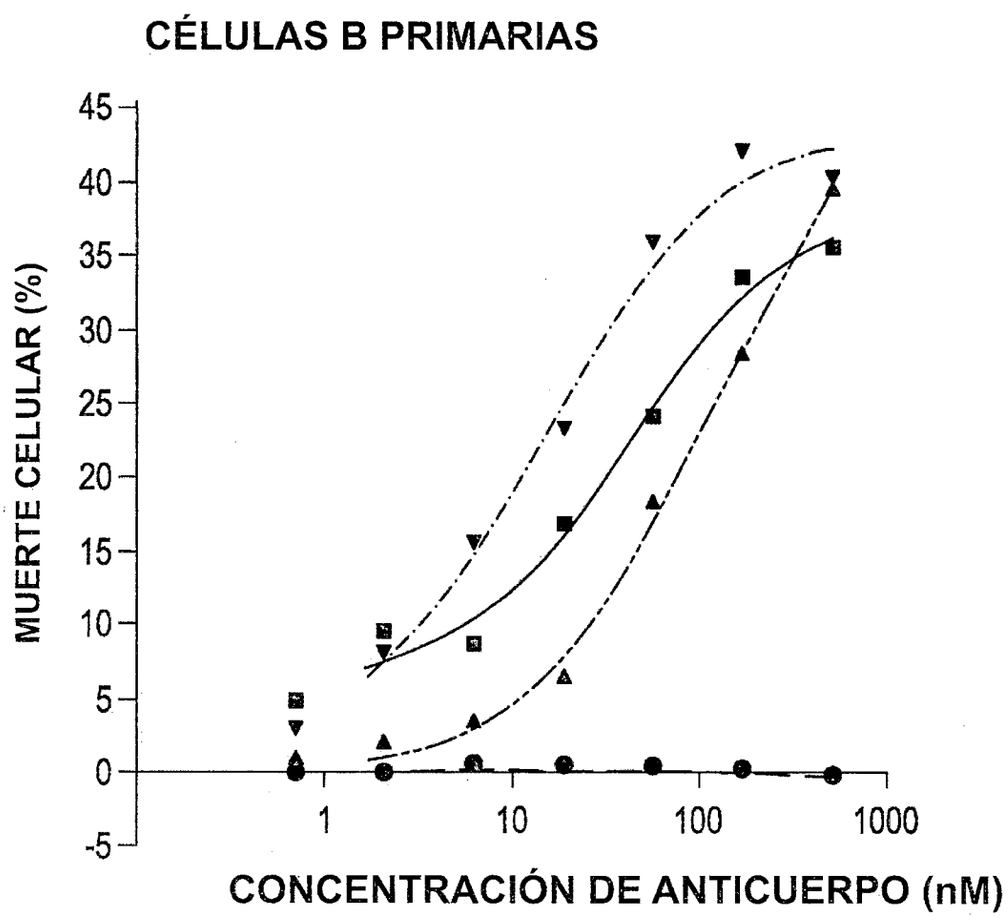

CÉLULAS B PRIMARIAS
MUERTE CELULAR (%)
45
40
35
30
25
20
15
10
5
0
-5
1
10
100
1000
CONCENTRACIÓN DE ANTICUERPO (nM)

Figura 3B

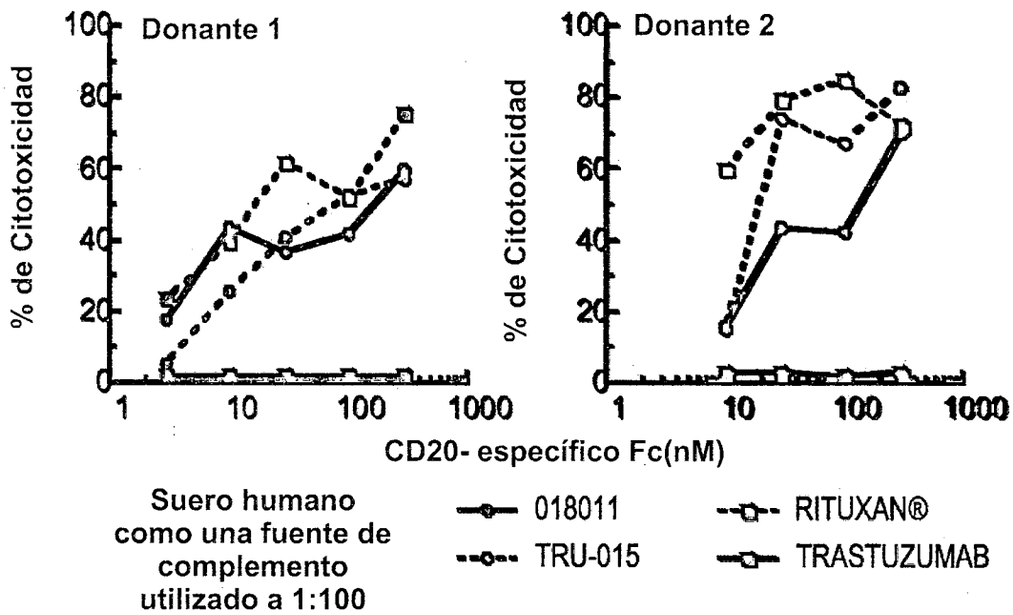


Figura 4A

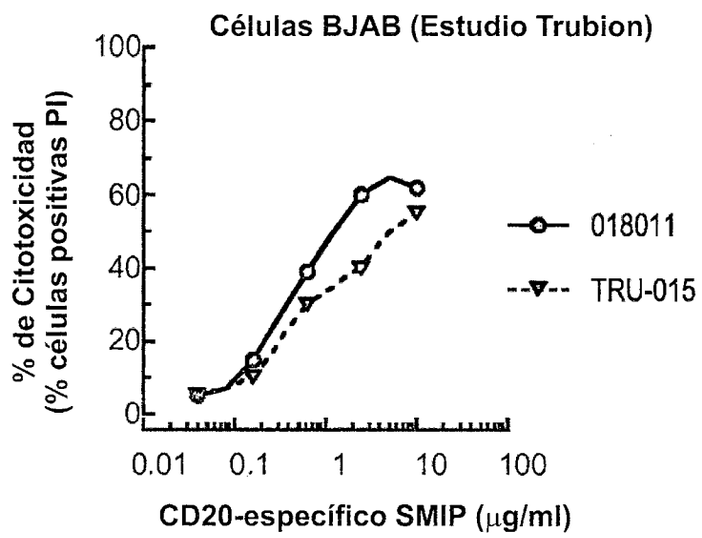


Figura 4B

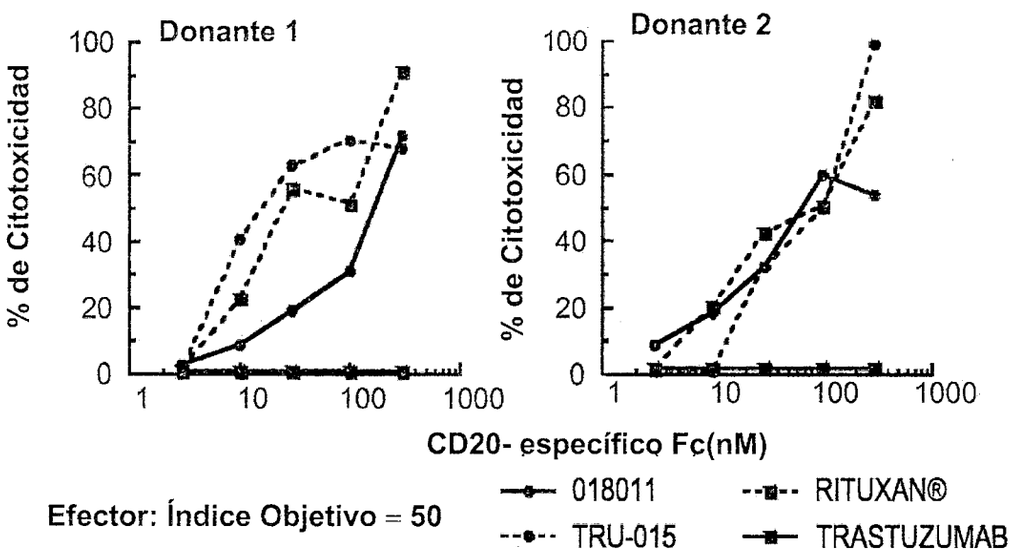


Figura 6A

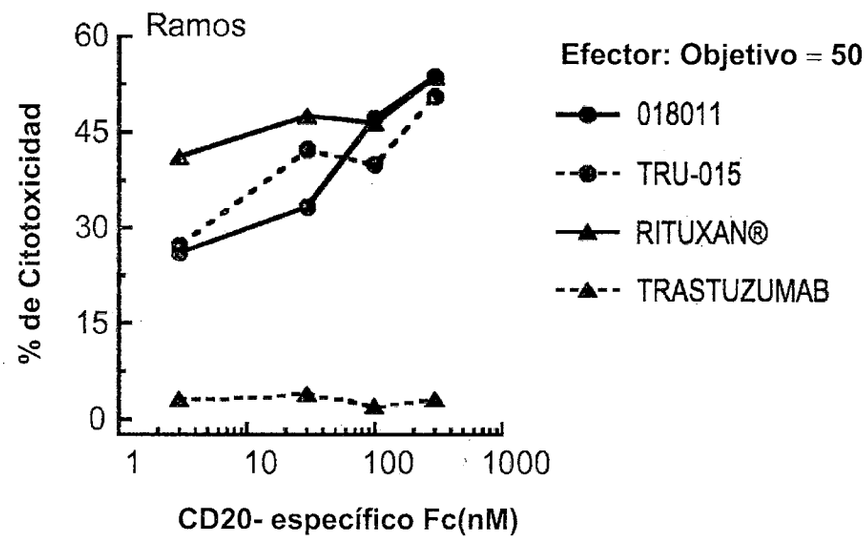


Figura 6B

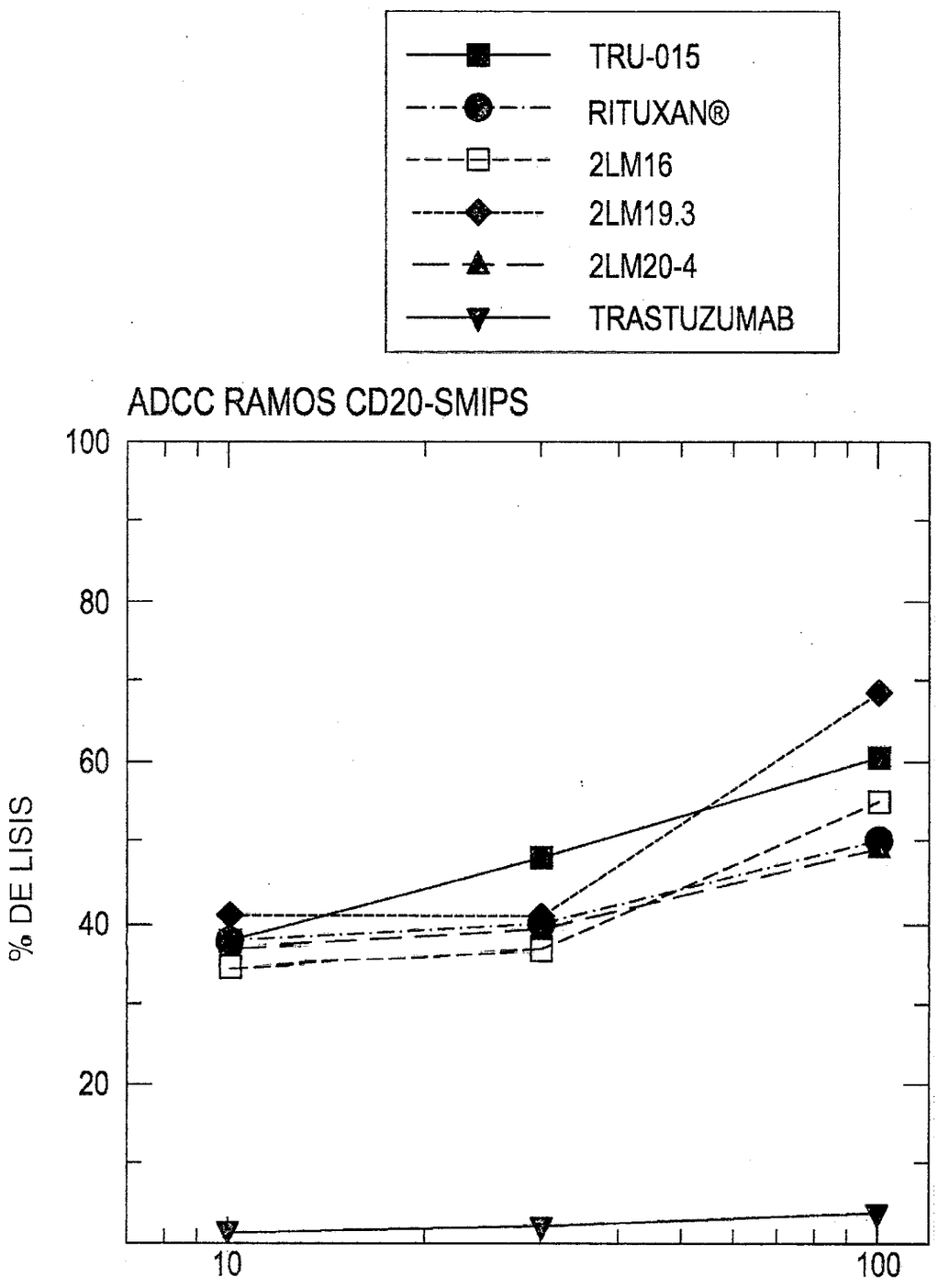

TRU-015
RITUXAN®
2LM16
2LM19.3
2LM20-4
TRASTUZUMAB
ADCC RAMOS CD20-SMIPS
100
80
60
40
20
% DE LISIS
10
100
CONCENTRACIÓN Fc (nM)

Figura 7

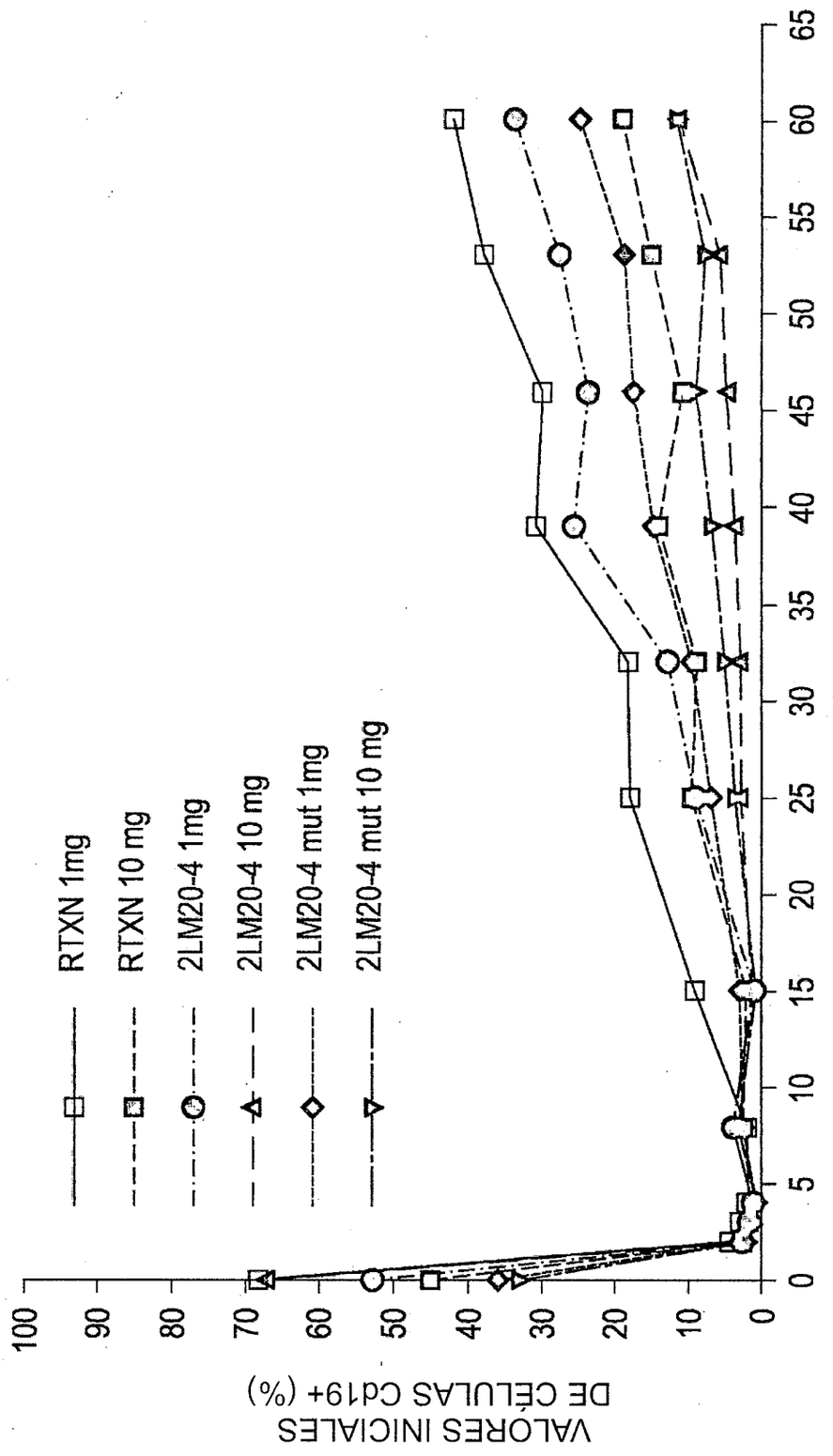

VALORES INICIALES
DE CÉLULAS Cd19+ (%)
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0
5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65
DÍA
RTXN 1mg
RTXN 10 mg
2LM20-4 1mg
2LM20-4 10 mg
2LM20-4 mut 1mg
2LM20-4 mut 10 mg

Figura 8

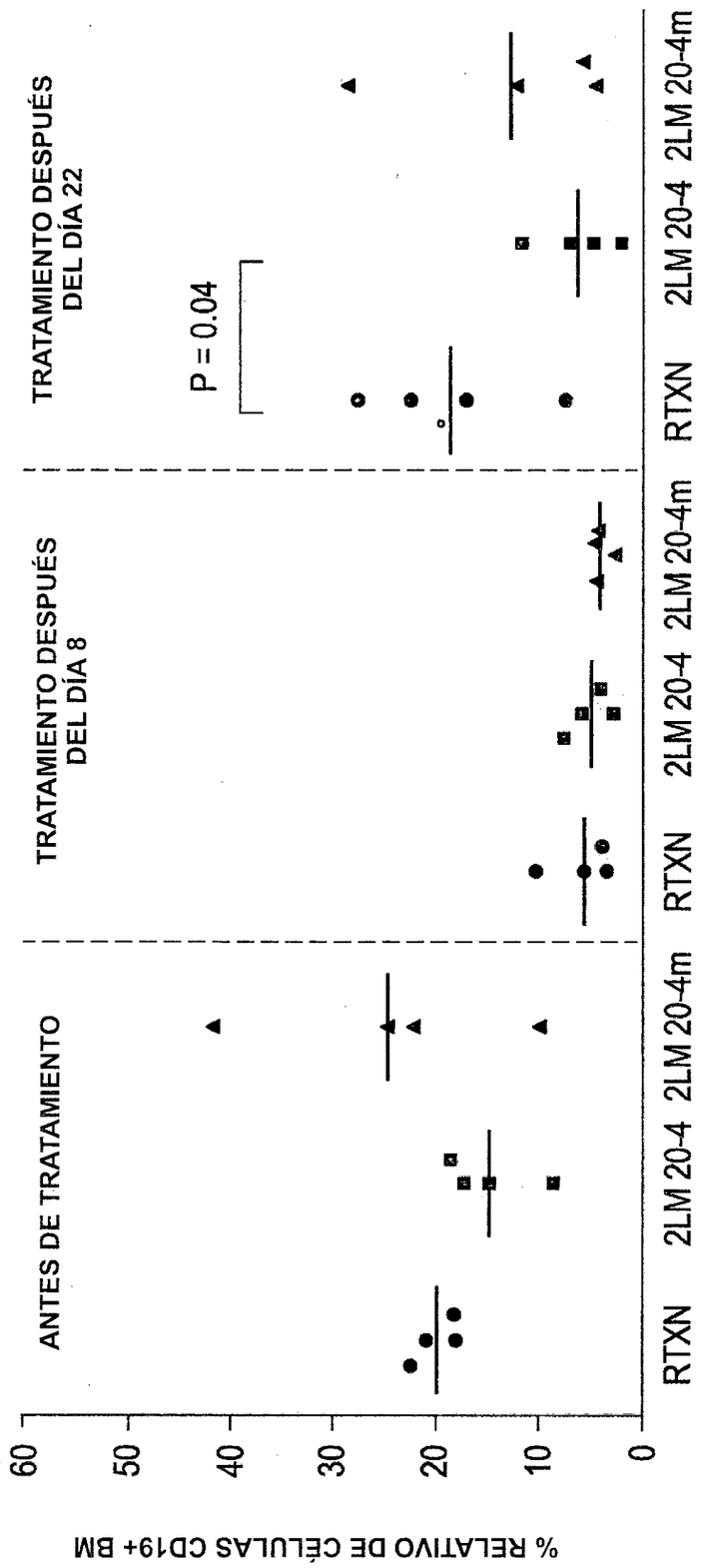

% RELATIVO DE CÉLULAS CD19+ BM
60
50
40
30
20
10
0
ANTES DE TRATAMIENTO
TRATAMIENTO DESPUÉS DEL DÍA 8
TRATAMIENTO DESPUÉS DEL DÍA 22
P = 0.04
RTXN
2LM 20-4
2LM 20-4m
RTXN
2LM 20-4
2LM 20-4m
RTXN
2LM 20-4
2LM 20-4m

Figura 9

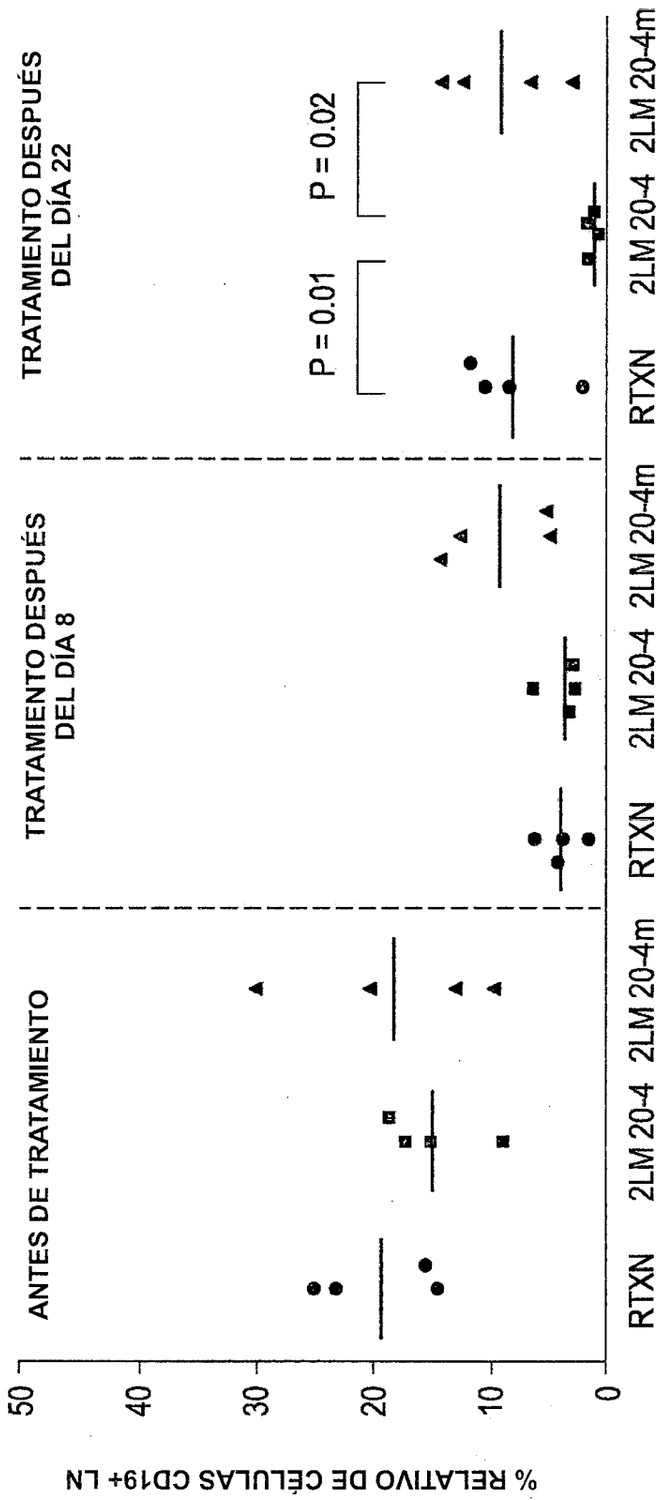

% RELATIVO DE CÉLULAS CD19+ LN
50
40
30
20
10
0
ANTES DE TRATAMIENTO
TRATAMIENTO DESPUÉS DEL DÍA 8
TRATAMIENTO DESPUÉS DEL DÍA 22
P = 0.01
P = 0.02
RTXN
2LM 20-4
2LM 20-4m
RTXN
2LM 20-4
2LM 20-4m
RTXN
2LM 20-4
2LM 20-4m

Figura 10

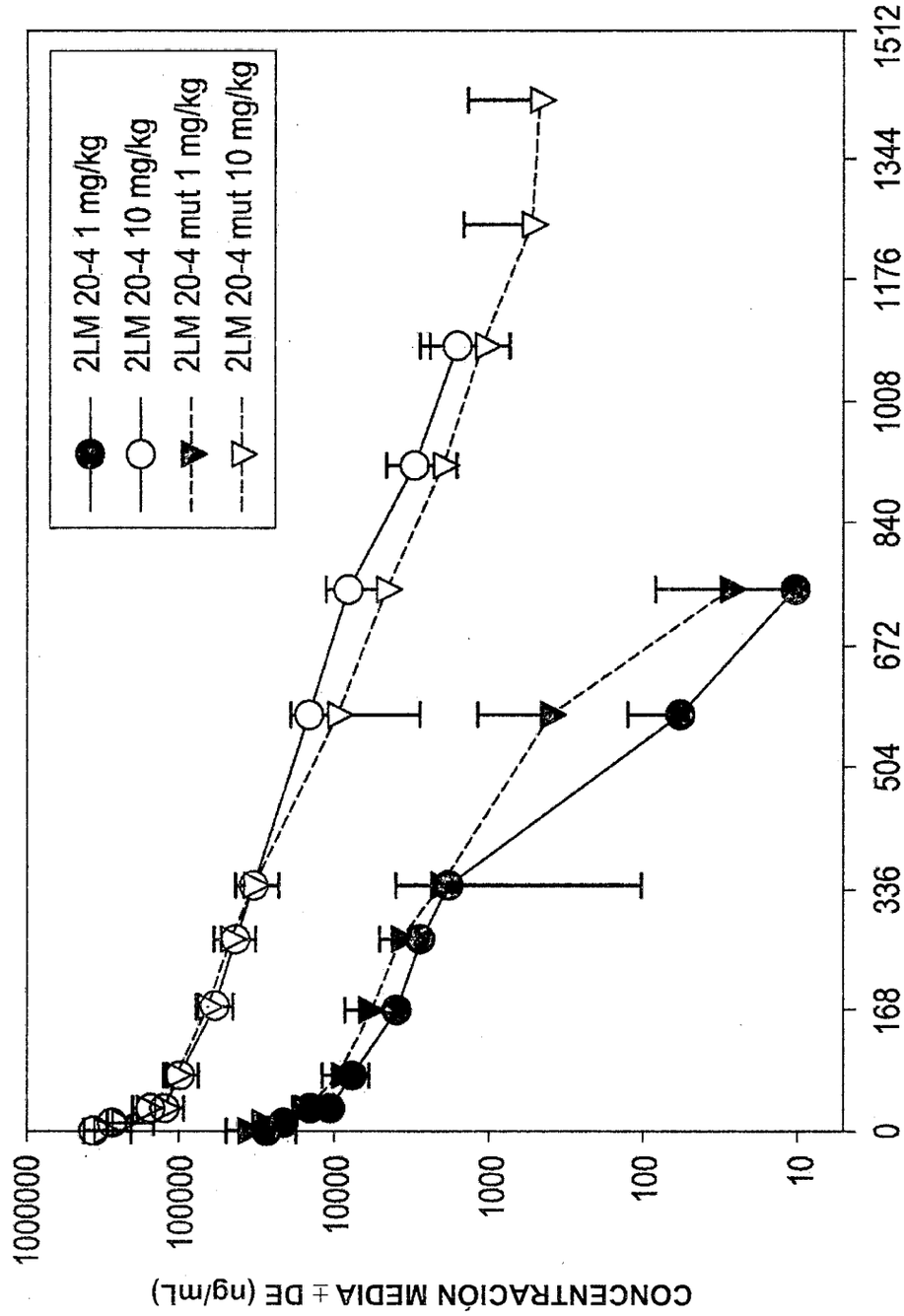

2LM 20-4 1 mg/kg
2LM 20-4 10 mg/kg
2LM 20-4 mut 1 mg/kg
2LM 20-4 mut 10 mg/kg
CONCENTRACIÓN MEDIA ± DE (ng/mL)
1000000
100000
10000
1000
100
10
0
168
336
504
672
840
1008
1176
1344
1512
HORAS

Figura 11

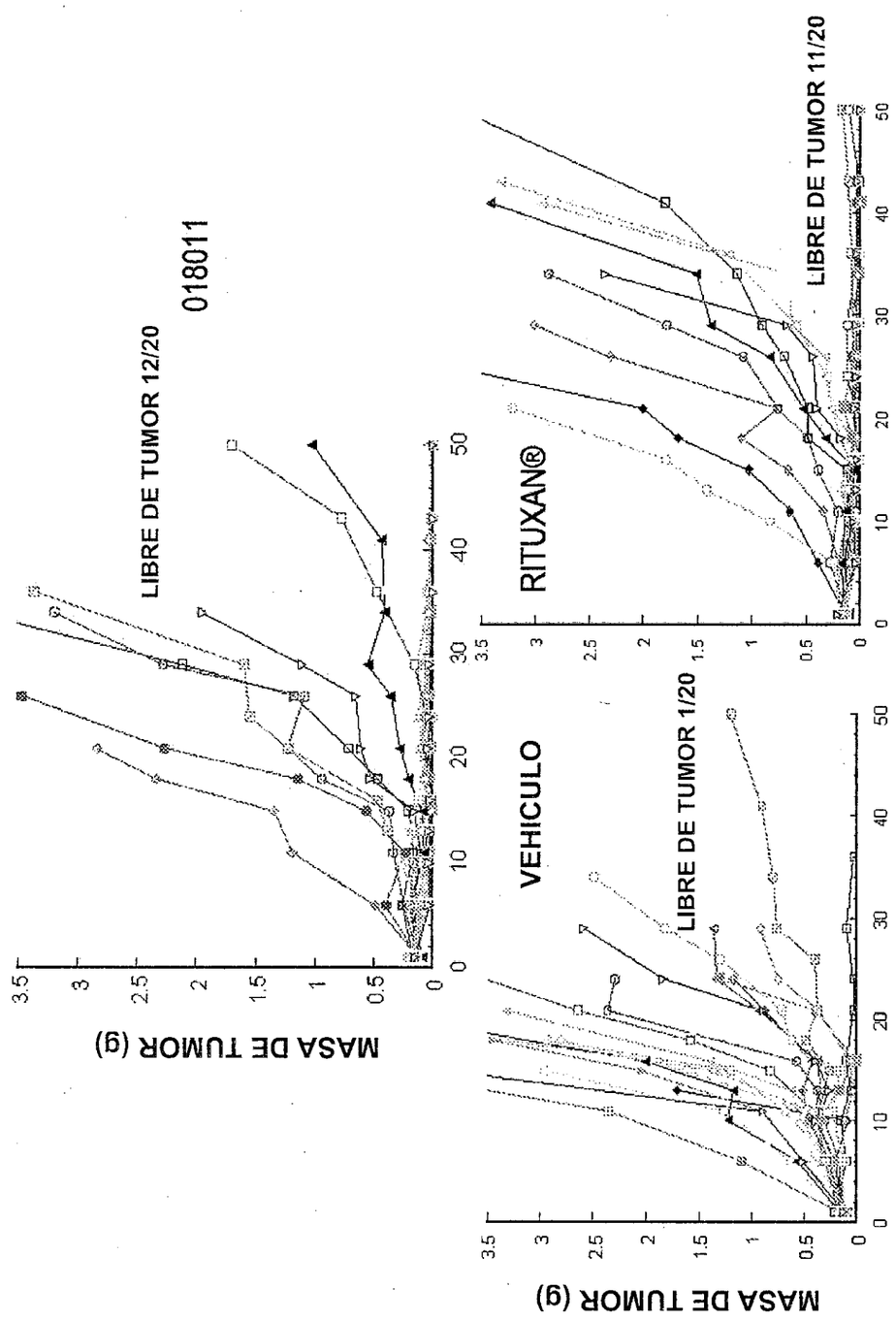

018011
LIBRE DE TUMOR 12/20
VEHICULO
LIBRE DE TUMOR 1/20
RITUXAN®
LIBRE DE TUMOR 11/20
MASA DE TUMOR (g)
MASA DE TUMOR (g)
DÍAS

Figura 12

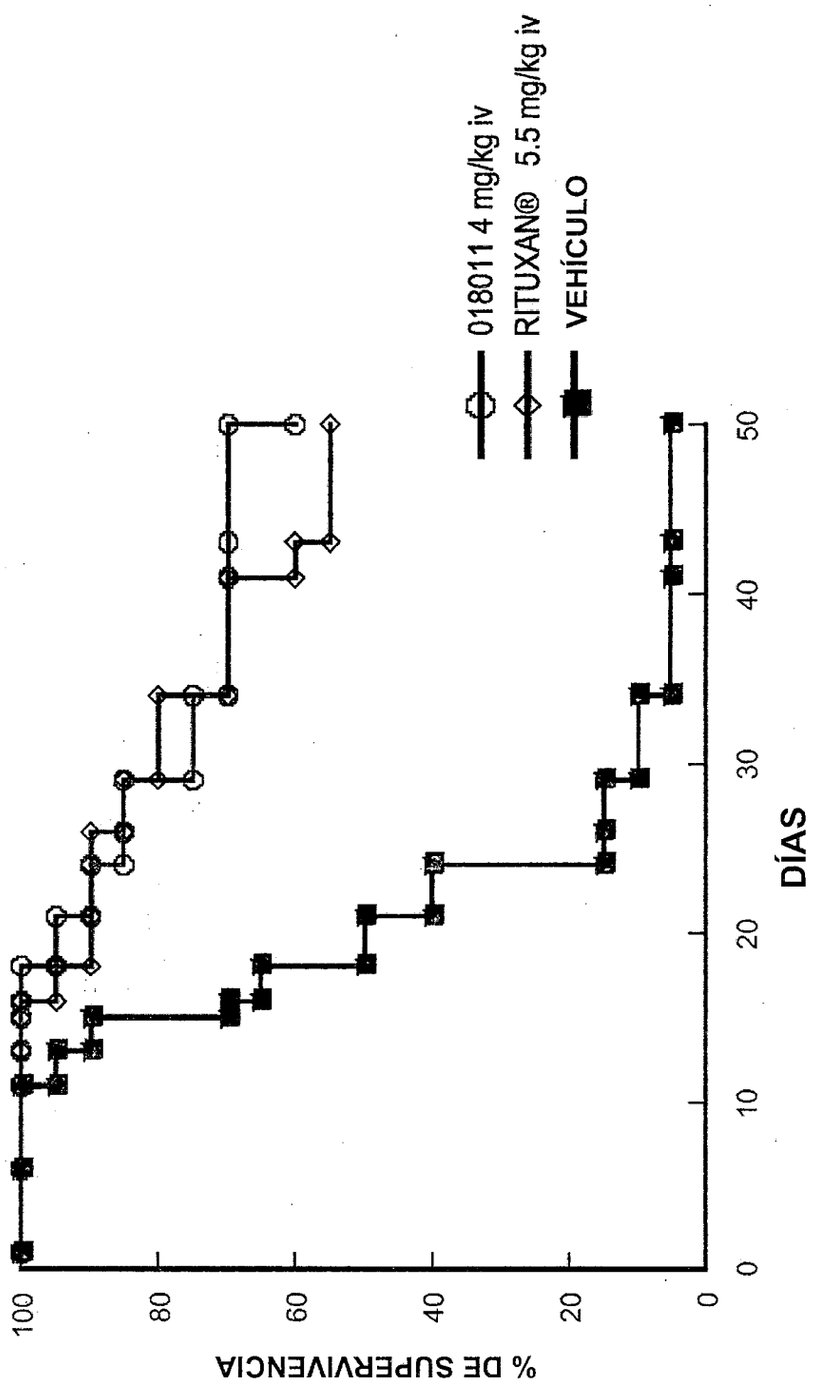

018011 4 mg/kg iv
RITUXAN® 5.5 mg/kg iv
VEHÍCULO
% DE SUPERVIVENCIA
100
80
60
40
20
0
0
10
20
30
40
50
DÍAS

Figura 13

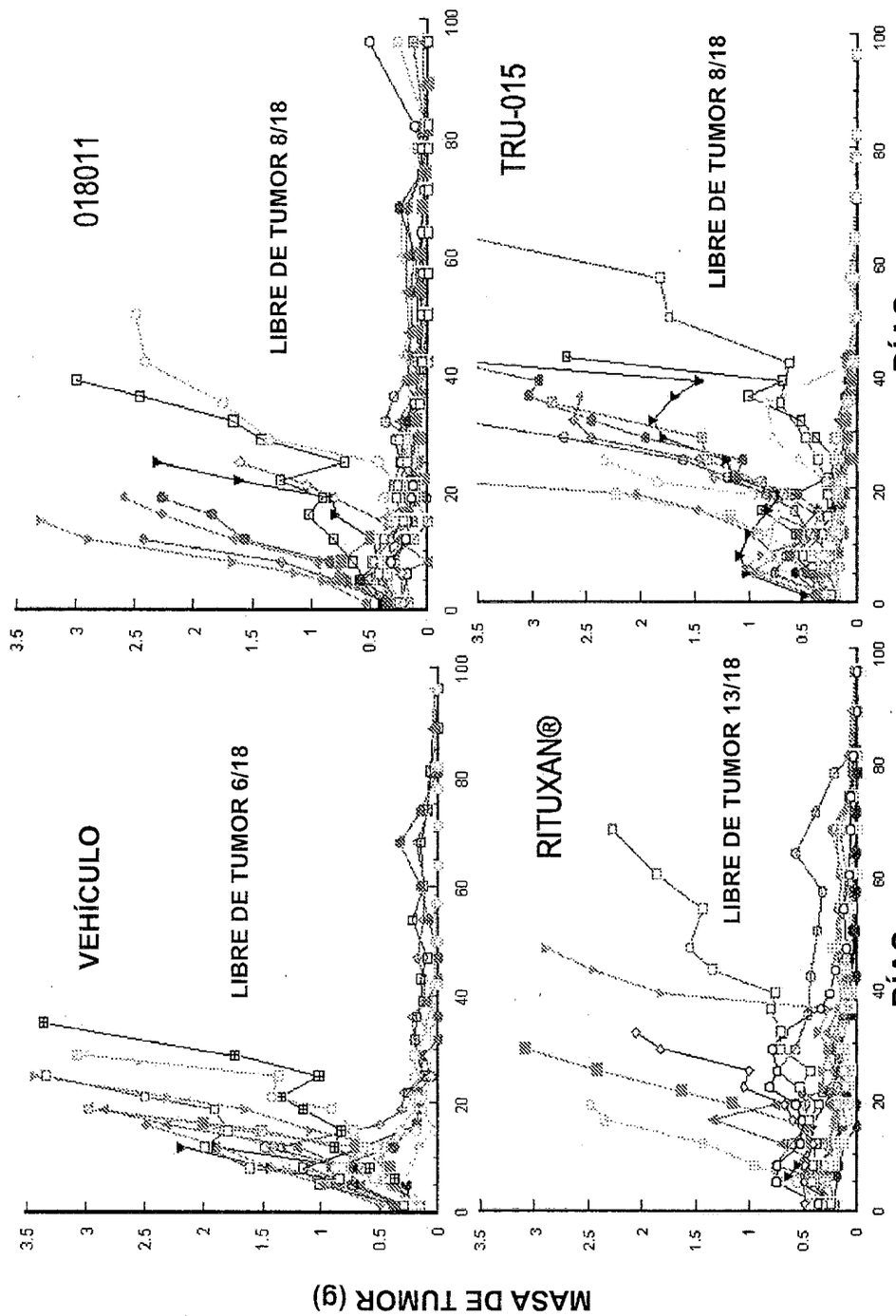

VEHÍCULO
LIBRE DE TUMOR 6/18
018011
LIBRE DE TUMOR 8/18
RITUXAN®
LIBRE DE TUMOR 13/18
TRU-015
LIBRE DE TUMOR 8/18
MASA DE TUMOR (g)
DÍAS
DÍAS

Figura 14

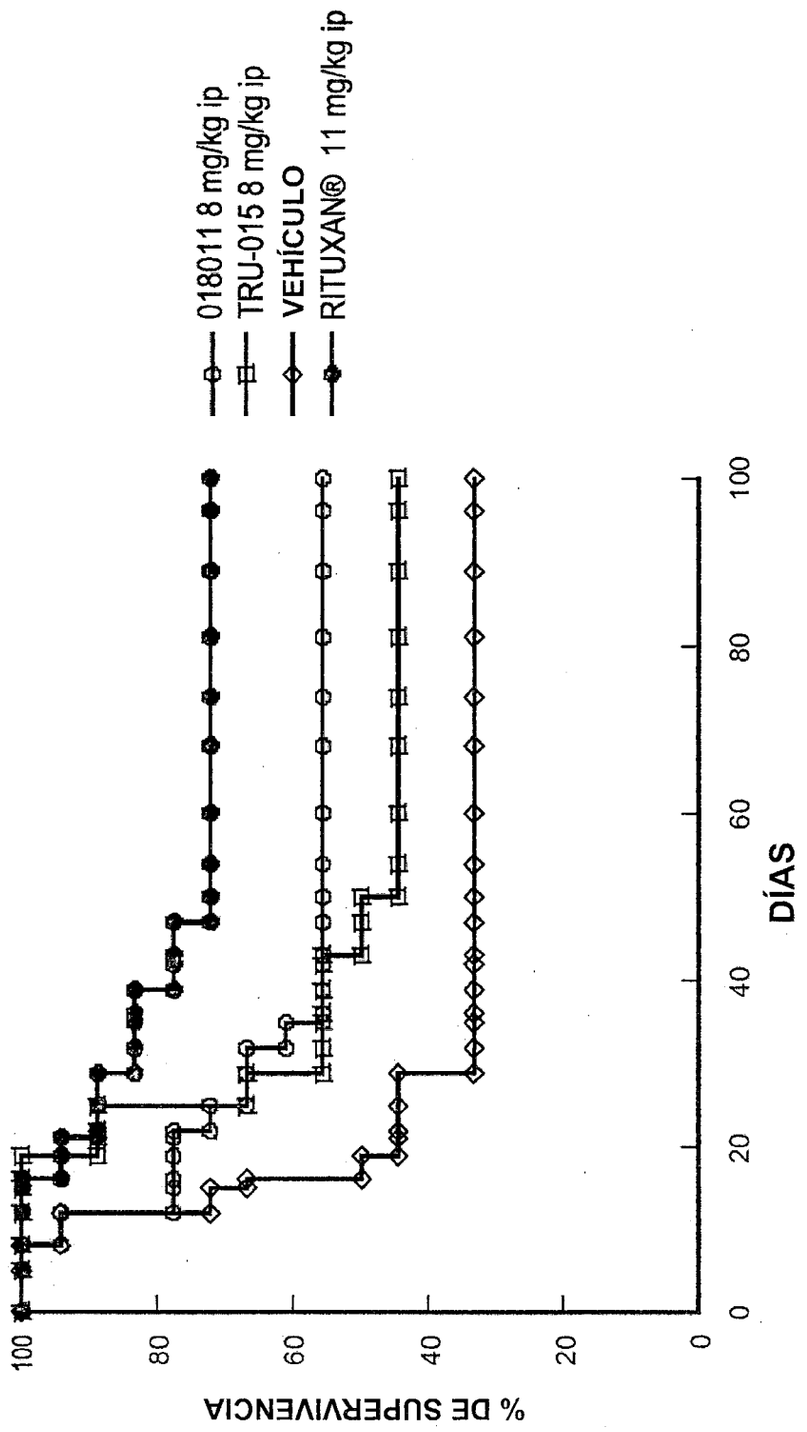

018011 8 mg/kg ip
TRU-015 8 mg/kg ip
VEHÍCULO
RITUXAN® 11 mg/kg ip
% DE SUPERVIVENCIA
100
80
60
40
20
0
0
20
40
60
80
100
DÍAS

Figura 15

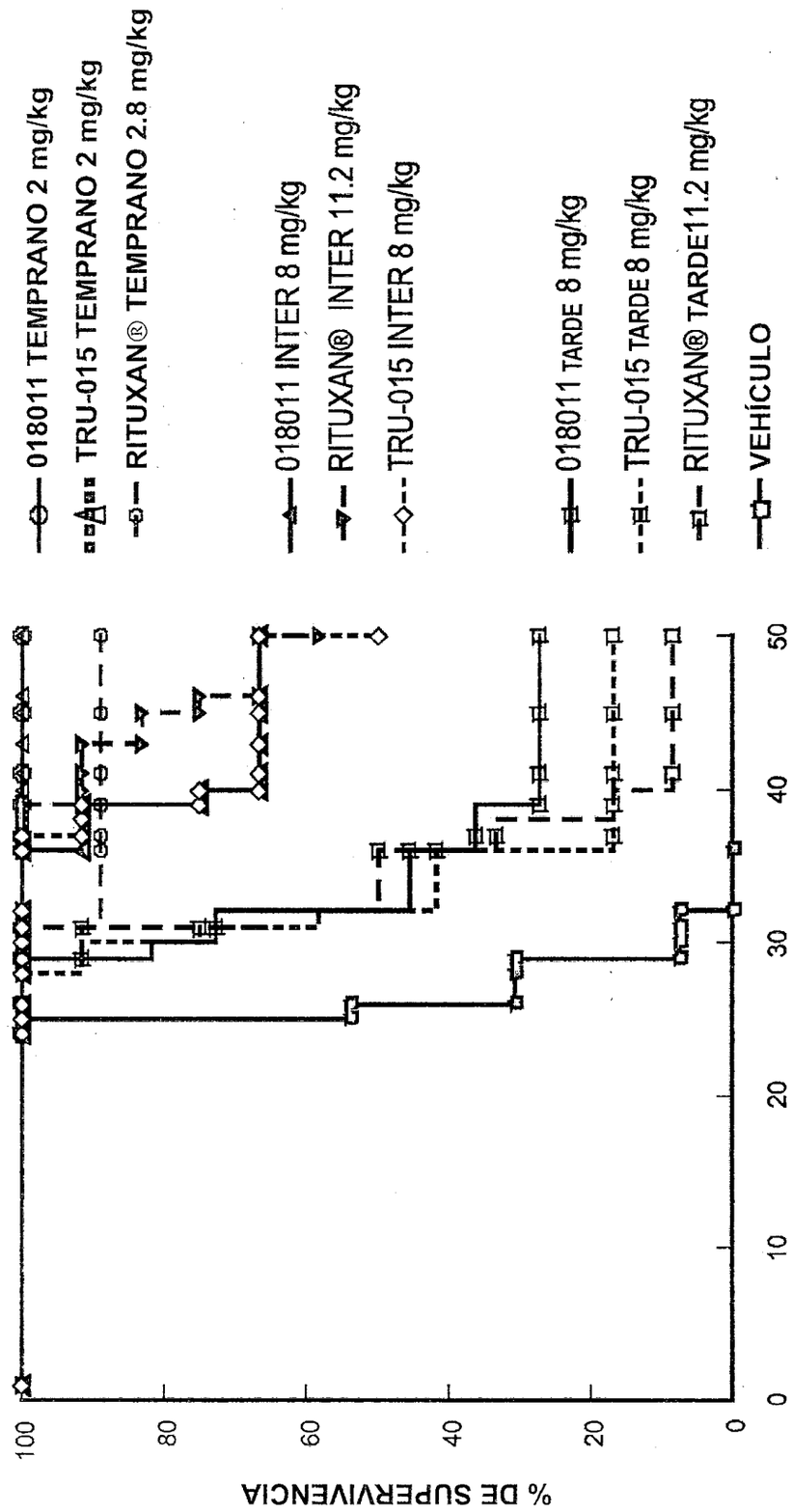

018011 TEMPRANO 2 mg/kg
TRU-015 TEMPRANO 2 mg/kg
RITUXAN® TEMPRANO 2.8 mg/kg
018011 INTER 8 mg/kg
RITUXAN® INTER 11.2 mg/kg
TRU-015 INTER 8 mg/kg
018011 TARDE 8 mg/kg
TRU-015 TARDE 8 mg/kg
RITUXAN® TARDE11.2 mg/kg
VEHÍCULO
% DE SUPERVIVENCIA
100
80
60
40
20
0
0
10
20
30
40
50
DÍAS

Figura 16

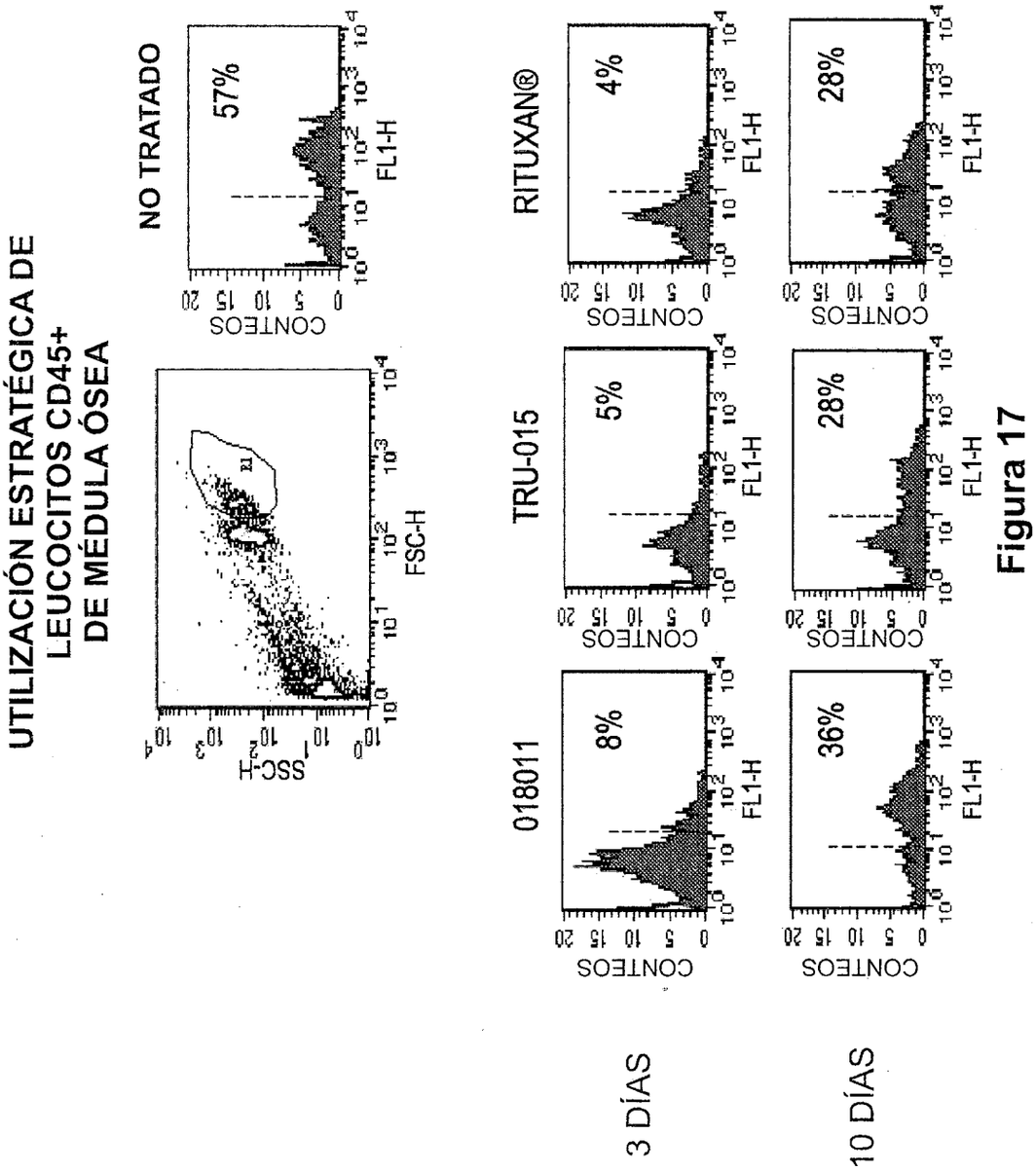

UTILIZACIÓN ESTRATÉGICA DE LEUCOCITOS CD45+ DE MÉDULA ÓSEA
NO TRATADO
57%
CONTEOS
FL1-H
SSC-H
FSC-H
RITUXAN®
TRU-015
018011
4%
5%
8%
28%
28%
36%
3 DÍAS
10 DÍAS

Figura 17

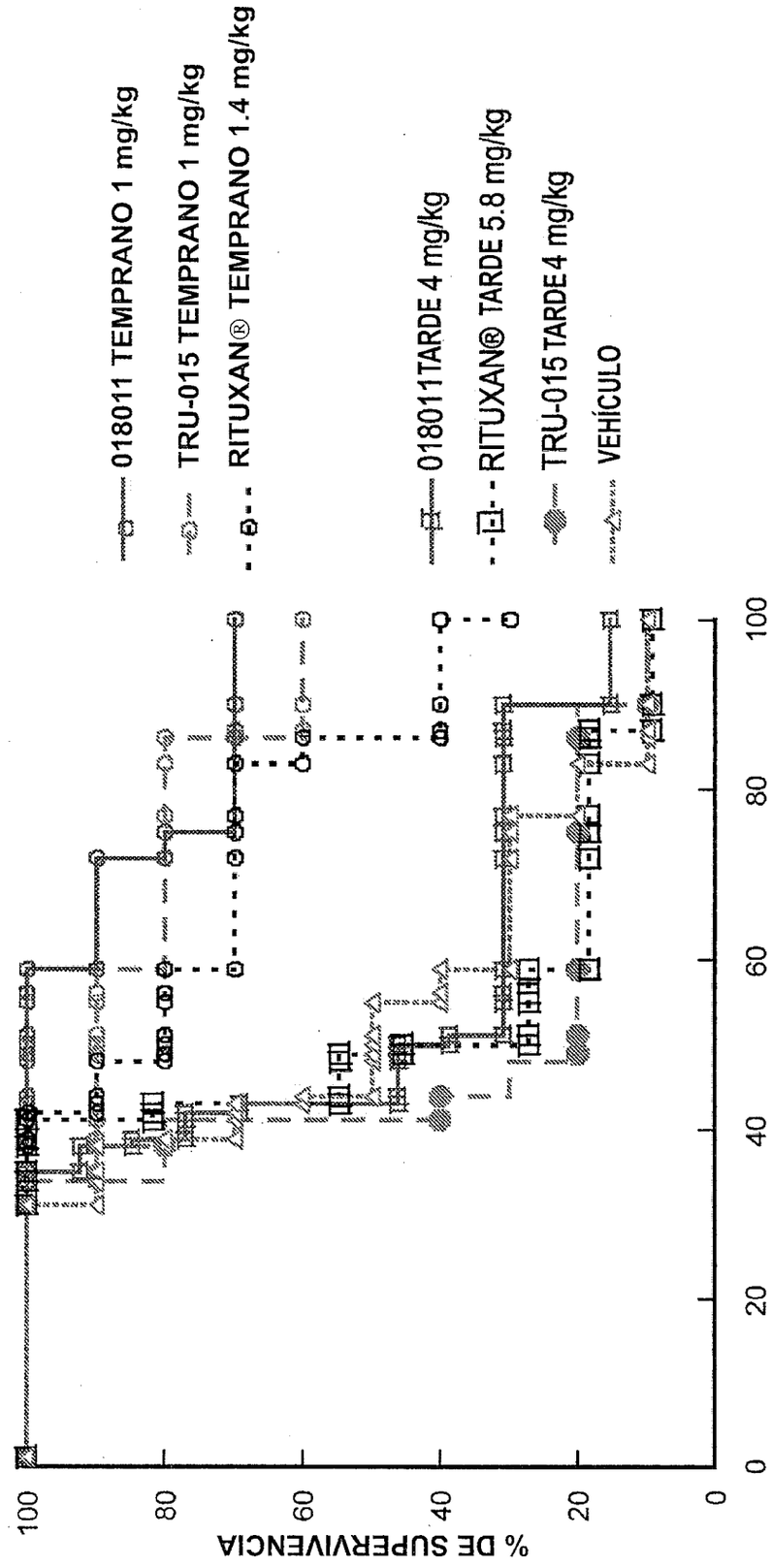

018011 TEMPRANO 1 mg/kg
TRU-015 TEMPRANO 1 mg/kg
RITUXAN® TEMPRANO 1.4 mg/kg
018011TARDE 4 mg/kg
RITUXAN® TARDE 5.8 mg/kg
TRU-015 TARDE4 mg/kg
VEHÍCULO
% DE SUPERVIVENCIA
DÍAS
0
20
40
60
80
100

Figura 18

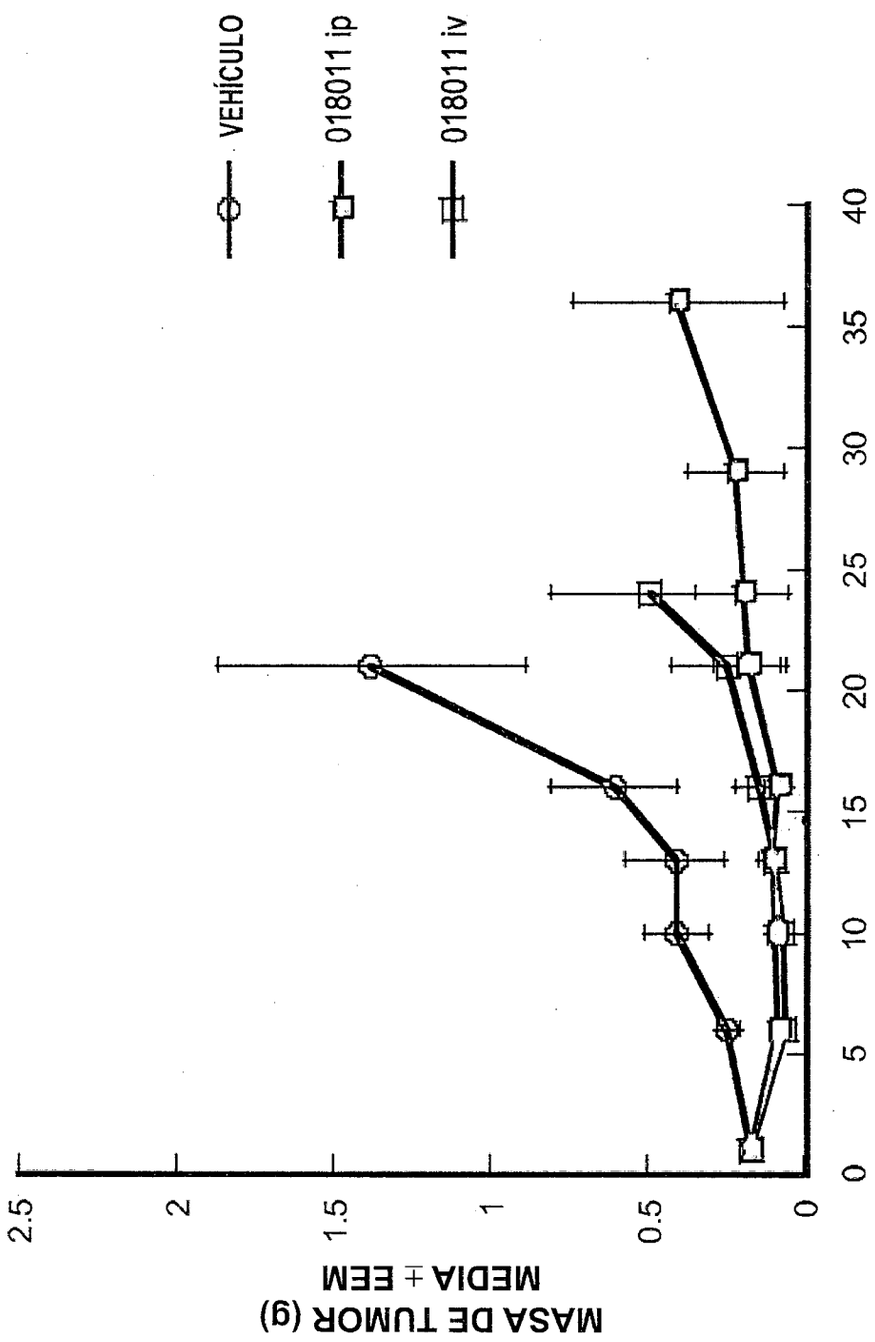

VEHÍCULO
018011 ip
018011 iv
MASA DE TUMOR (g)
MEDIA ± EEM
2.5
2
1.5
1
0.5
0
0
5
10
15
20
25
30
35
40
DÍAS

Figura 19

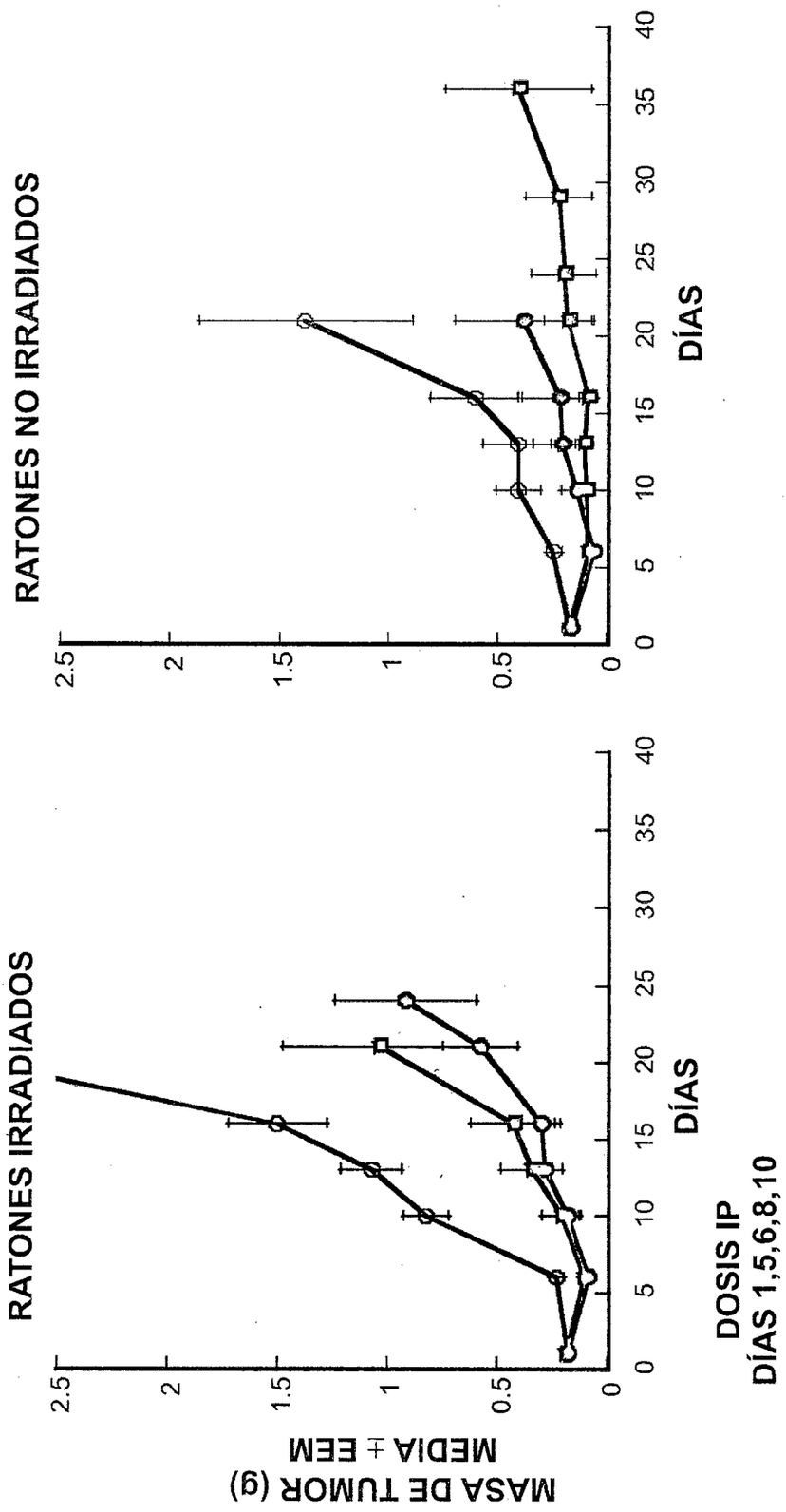

RATONES NO IRRADIADOS
RATONES IRRADIADOS
MASA DE TUMOR (g)
MEDIA ± EEM
DÍAS
DOSIS IP
DÍAS 1,5,6,8,10
018011 8 mg/kg
RITUXAN® 11.2 mg/kg
VEHÍCULO

Figura 20

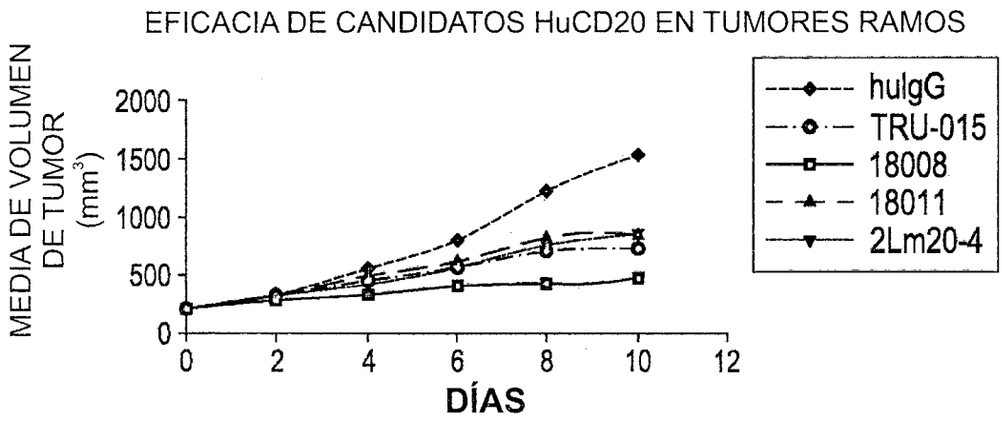


Figura 21A

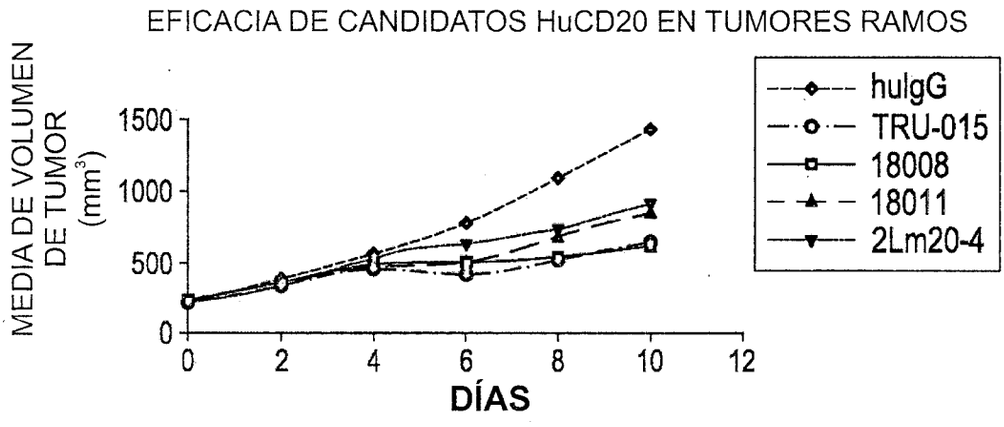


Figura 21B

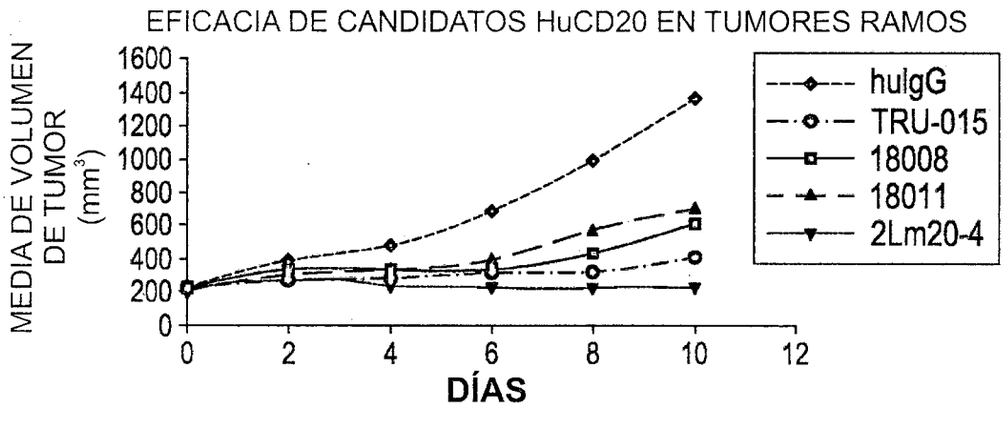
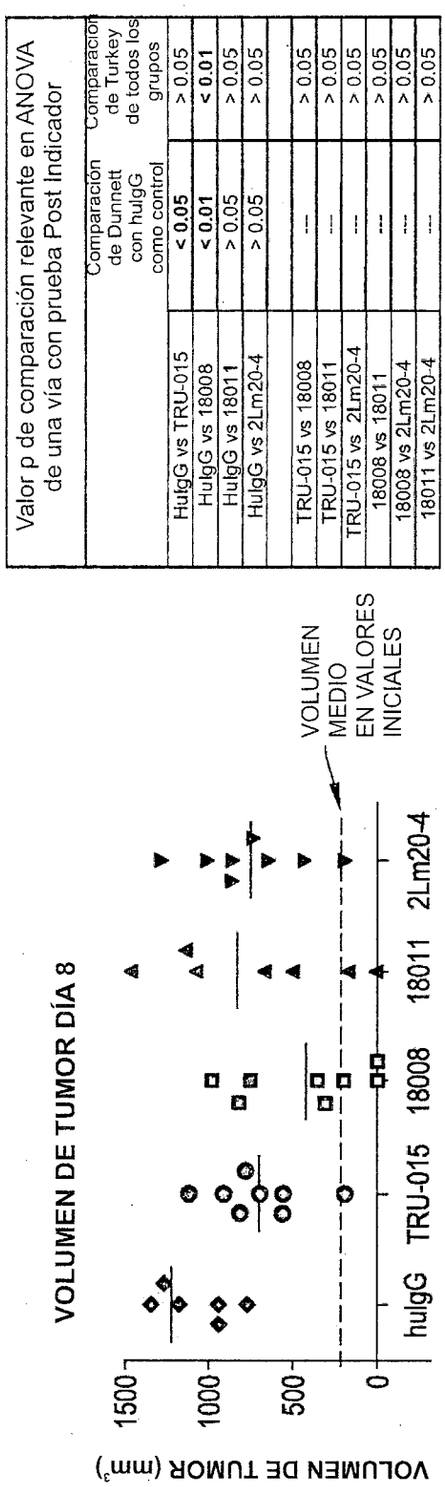


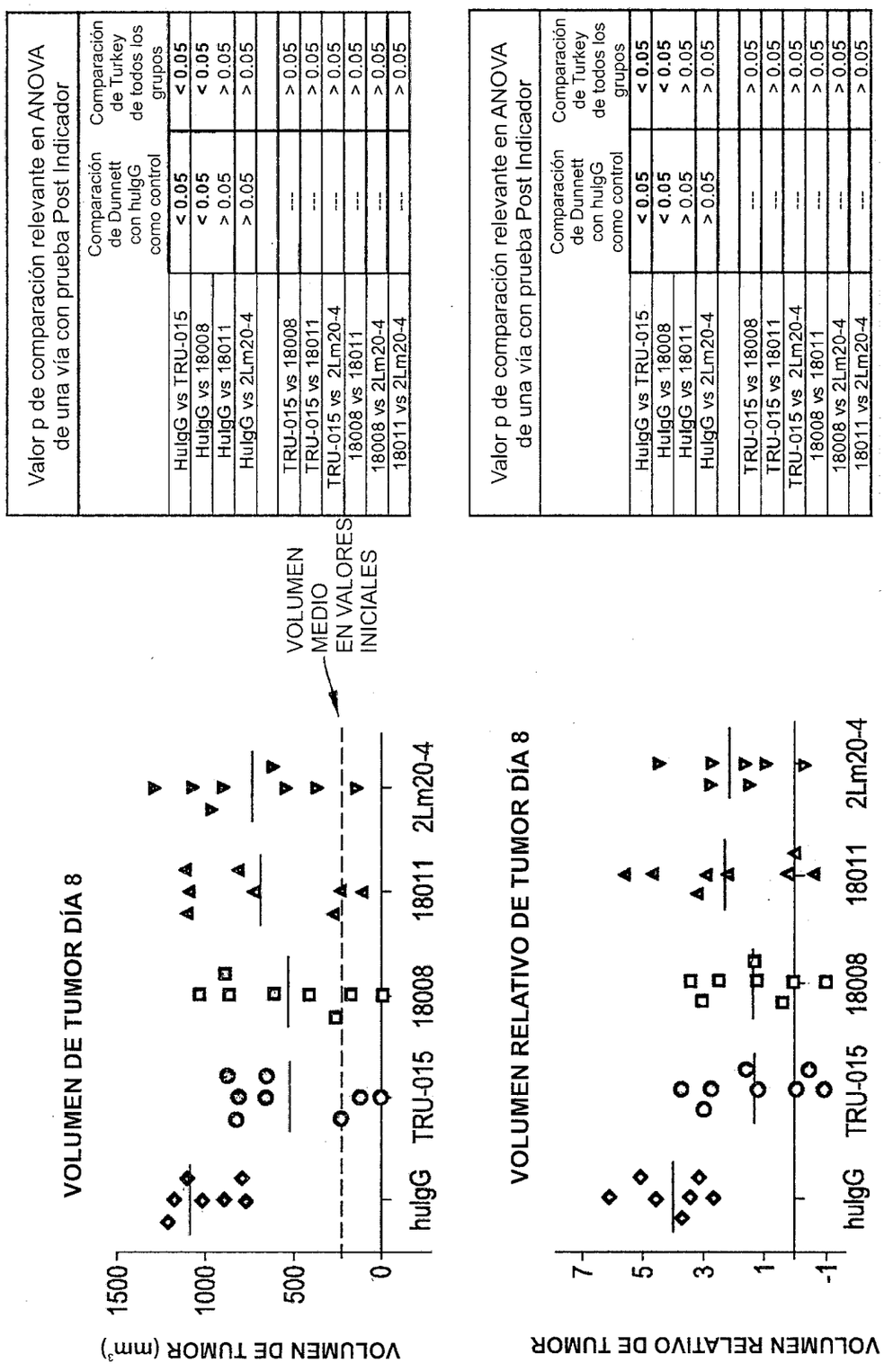
Figura 21C



Valor p de comparación relevante en ANOVA de una vía con prueba Post Indicador		
	Comparación de Dunnett con hulgG como control	Comparación de Turkey de todos los grupos
HulgG vs TRU-015	**< 0.05**	> 0.05
HulgG vs 18008	**< 0.01**	**< 0.01**
HulgG vs 18011	> 0.05	> 0.05
HulgG vs 2Lm20-4	> 0.05	> 0.05
TRU-015 vs 18008	---	> 0.05
TRU-015 vs 18011	---	> 0.05
TRU-015 vs 2Lm20-4	---	> 0.05
18008 vs 18011	---	> 0.05
18008 vs 2Lm20-4	---	> 0.05
18011 vs 2Lm20-4	---	> 0.05

Valor p de comparación relevante en ANOVA de una vía con prueba Post Indicador		
	Comparación de Dunnett con hulgG como control	Comparación de Turkey de todos los grupos
HulgG vs TRU-015	**< 0.05**	> 0.05
HulgG vs 18008	**< 0.01**	**< 0.001**
HulgG vs 18011	> 0.05	> 0.05
HulgG vs 2Lm20-4	**< 0.05**	> 0.05
TRU-015 vs 18008	---	> 0.05
TRU-015 vs 18011	---	> 0.05
TRU-015 vs 2Lm20-4	---	> 0.05
18008 vs 18011	---	> 0.05
18008 vs 2Lm20-4	---	> 0.05
18011 vs 2Lm20-4	---	> 0.05

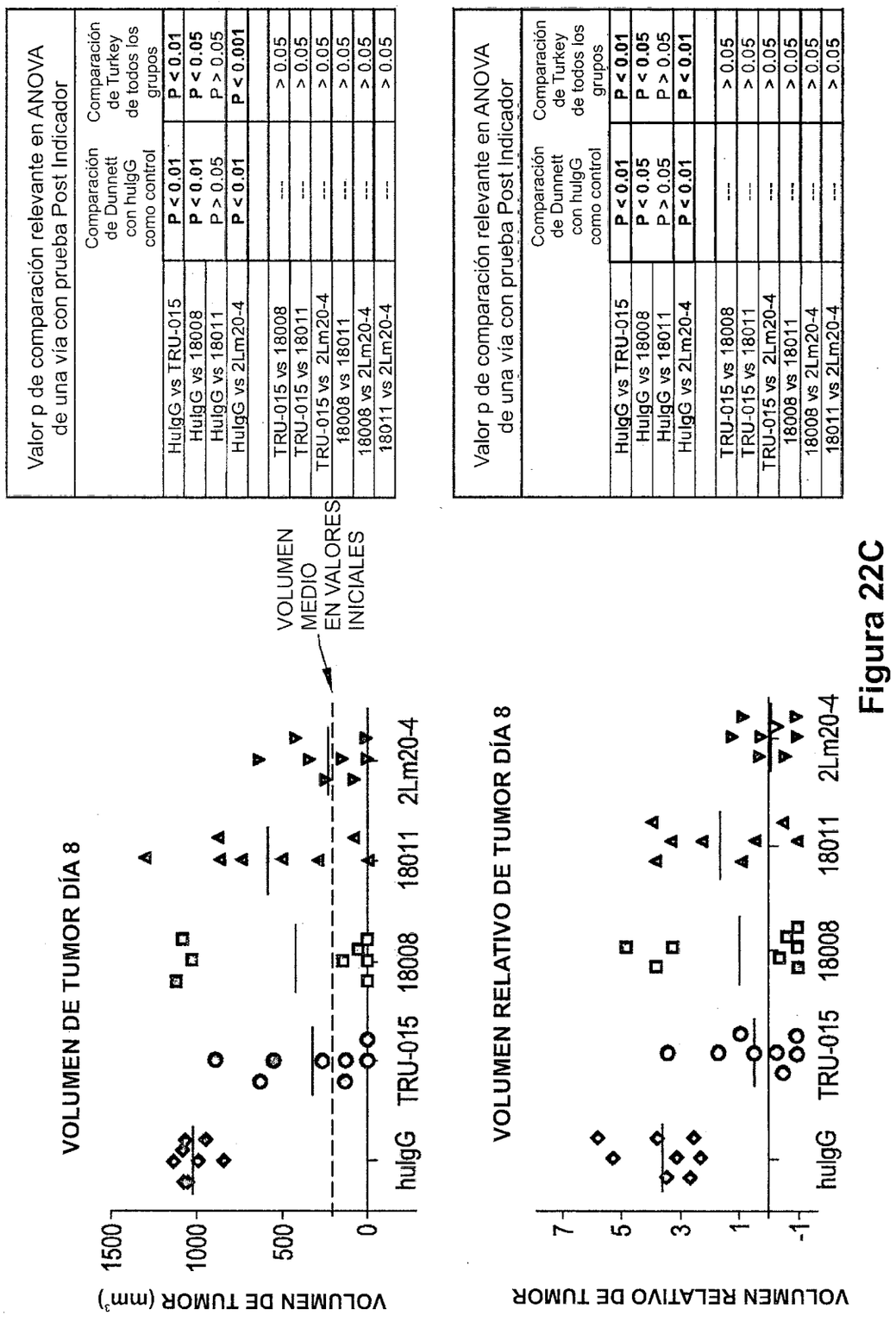
Figura 22A



Valor p de comparación relevante en ANOVA de una vía con prueba Post Indicador		
	Comparación de Dunnett con hulgG como control	Comparación de Turkey de todos los grupos
HulgG vs TRU-015	**< 0.05**	**< 0.05**
HulgG vs 18008	**< 0.05**	**< 0.05**
HulgG vs 18011	> 0.05	> 0.05
HulgG vs 2Lm20-4	> 0.05	> 0.05
TRU-015 vs 18008	---	> 0.05
TRU-015 vs 18011	---	> 0.05
TRU-015 vs 2Lm20-4	---	> 0.05
18008 vs 18011	---	> 0.05
18008 vs 2Lm20-4	---	> 0.05
18011 vs 2Lm20-4	---	> 0.05

Valor p de comparación relevante en ANOVA de una vía con prueba Post Indicador		
	Comparación de Dunnett con hulgG como control	Comparación de Turkey de todos los grupos
HulgG vs TRU-015	**< 0.05**	**< 0.05**
HulgG vs 18008	**< 0.05**	**< 0.05**
HulgG vs 18011	> 0.05	> 0.05
HulgG vs 2Lm20-4	> 0.05	> 0.05
TRU-015 vs 18008	---	> 0.05
TRU-015 vs 18011	---	> 0.05
TRU-015 vs 2Lm20-4	---	> 0.05
18008 vs 18011	---	> 0.05
18008 vs 2Lm20-4	---	> 0.05
18011 vs 2Lm20-4	---	> 0.05

Figura 22B



Valor p de comparación relevante en ANOVA de una vía con prueba Post Indicador			
		Comparación de Dunnett con hulgG como control	Comparación de Turkey de todos los grupos
HulgG vs TRU-015		**P < 0.01**	**P < 0.01**
HulgG vs 18008		**P < 0.01**	**P < 0.05**
HulgG vs 18011		P > 0.05	P > 0.05
HulgG vs 2Lm20-4		**P < 0.01**	**P < 0.001**
TRU-015 vs 18008		---	> 0.05
TRU-015 vs 18011		---	> 0.05
TRU-015 vs 2Lm20-4		---	> 0.05
18008 vs 18011		---	> 0.05
18008 vs 2Lm20-4		---	> 0.05
18011 vs 2Lm20-4		---	> 0.05

Valor p de comparación relevante en ANOVA de una vía con prueba Post Indicador			
		Comparación de Dunnett con hulgG como control	Comparación de Turkey de todos los grupos
HulgG vs TRU-015		**P < 0.01**	**P < 0.01**
HulgG vs 18008		**P < 0.05**	**P < 0.05**
HulgG vs 18011		P > 0.05	P > 0.05
HulgG vs 2Lm20-4		**P < 0.01**	**P < 0.01**
TRU-015 vs 18008		---	> 0.05
TRU-015 vs 18011		---	> 0.05
TRU-015 vs 2Lm20-4		---	> 0.05
18008 vs 18011		---	> 0.05
18008 vs 2Lm20-4		---	> 0.05
18011 vs 2Lm20-4		---	> 0.05

Figura 22C

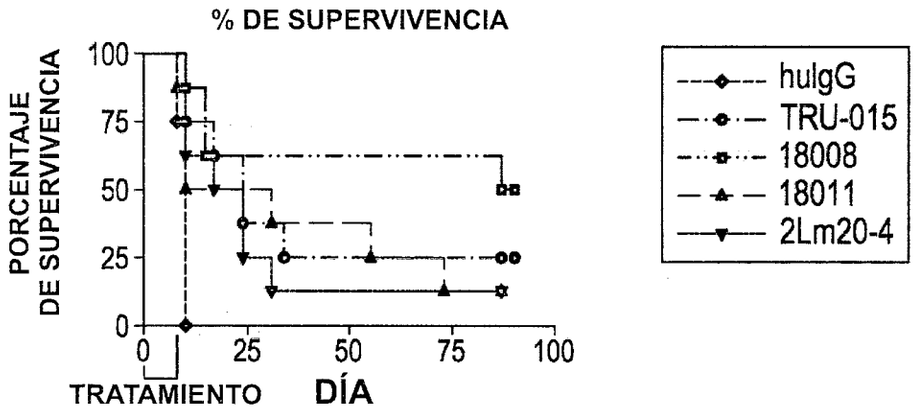


Figura 23A

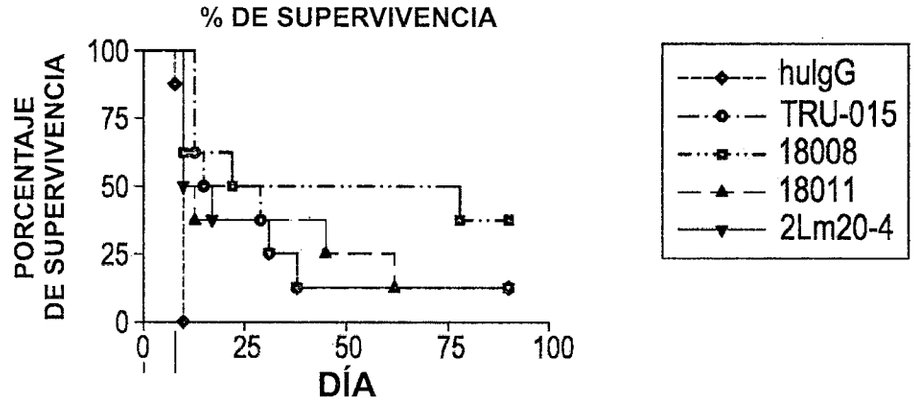


Figura 23B

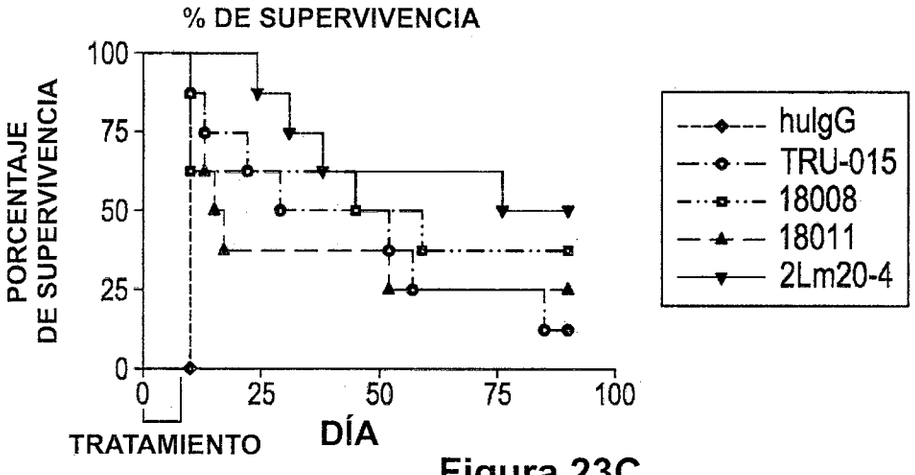


Figura 23C

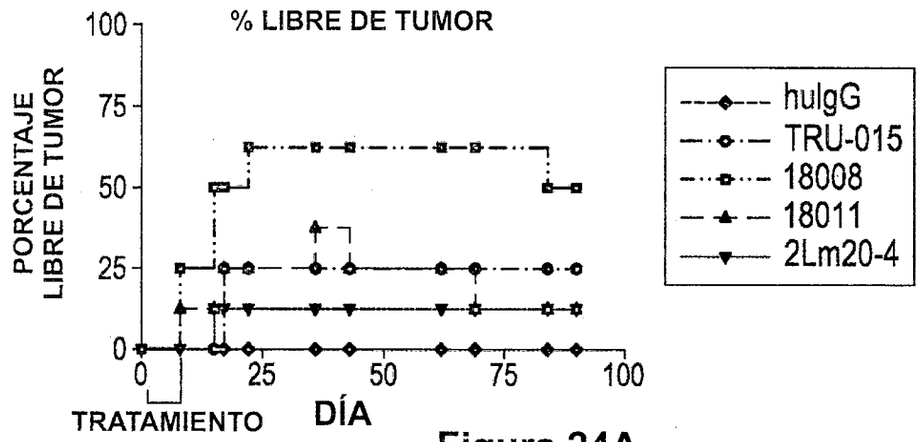


Figura 24A

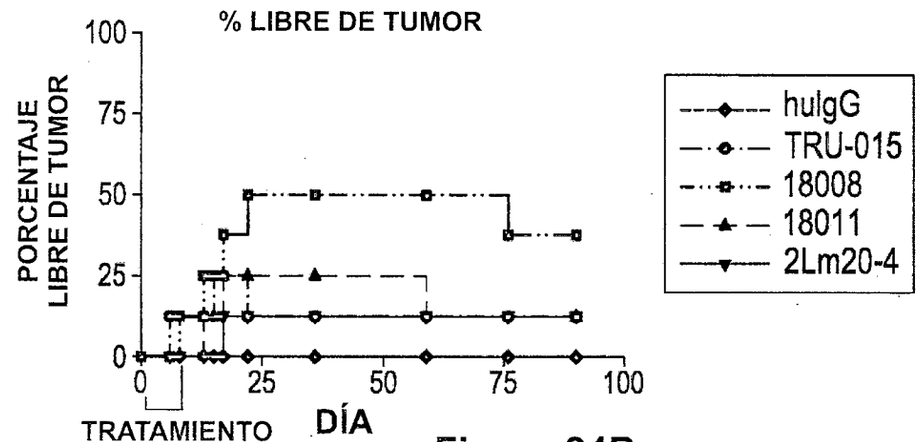


Figura 24B

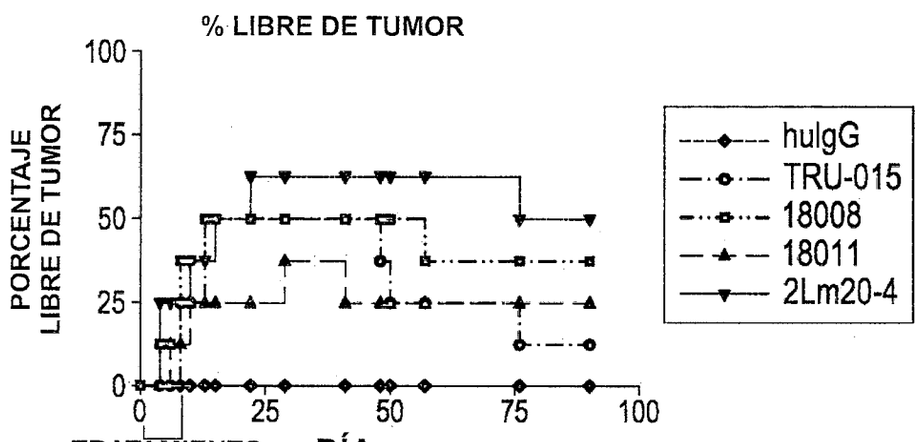


Figura 24C

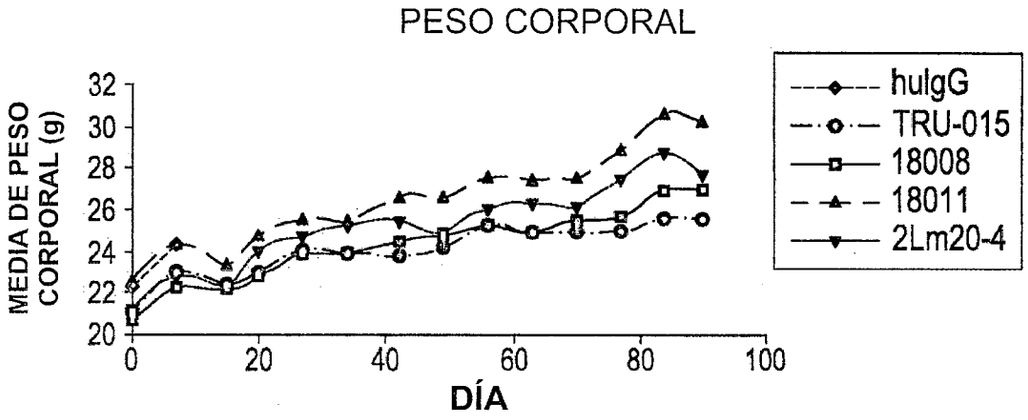


Figura 25A

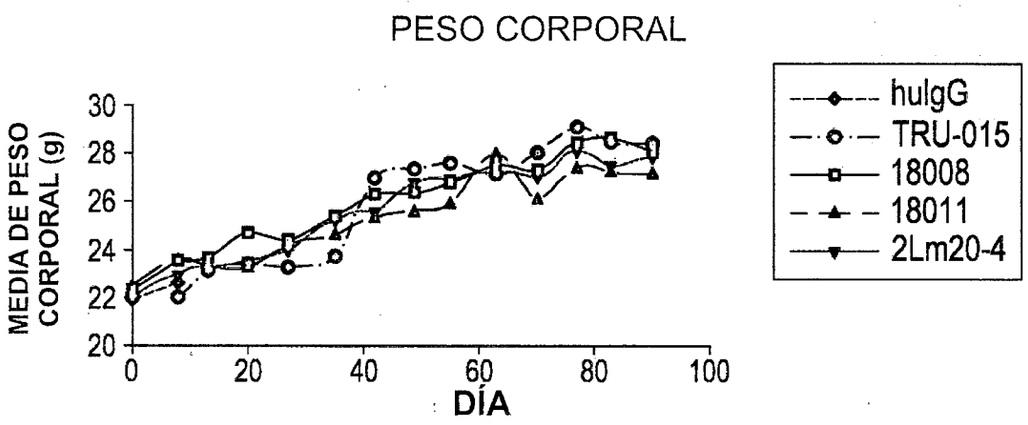


Figura 25B

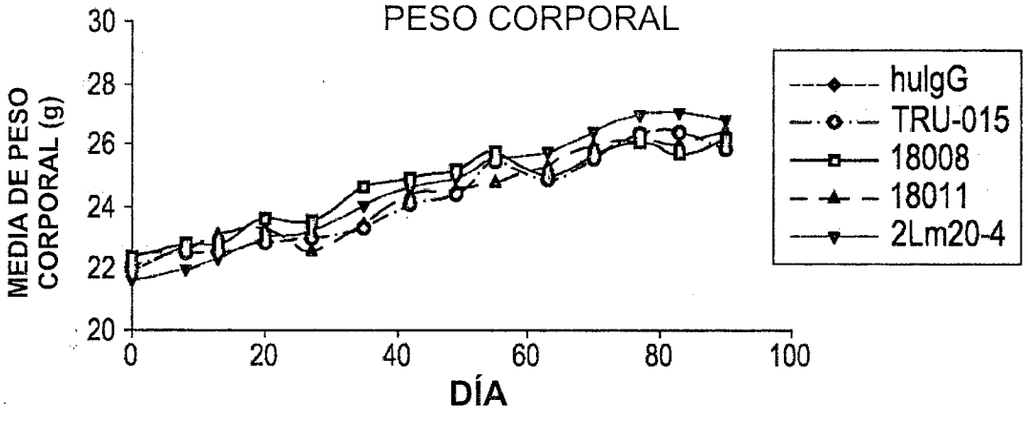


Figura 25C

WO 2008/156713 PCT/US2008/007464

29/35

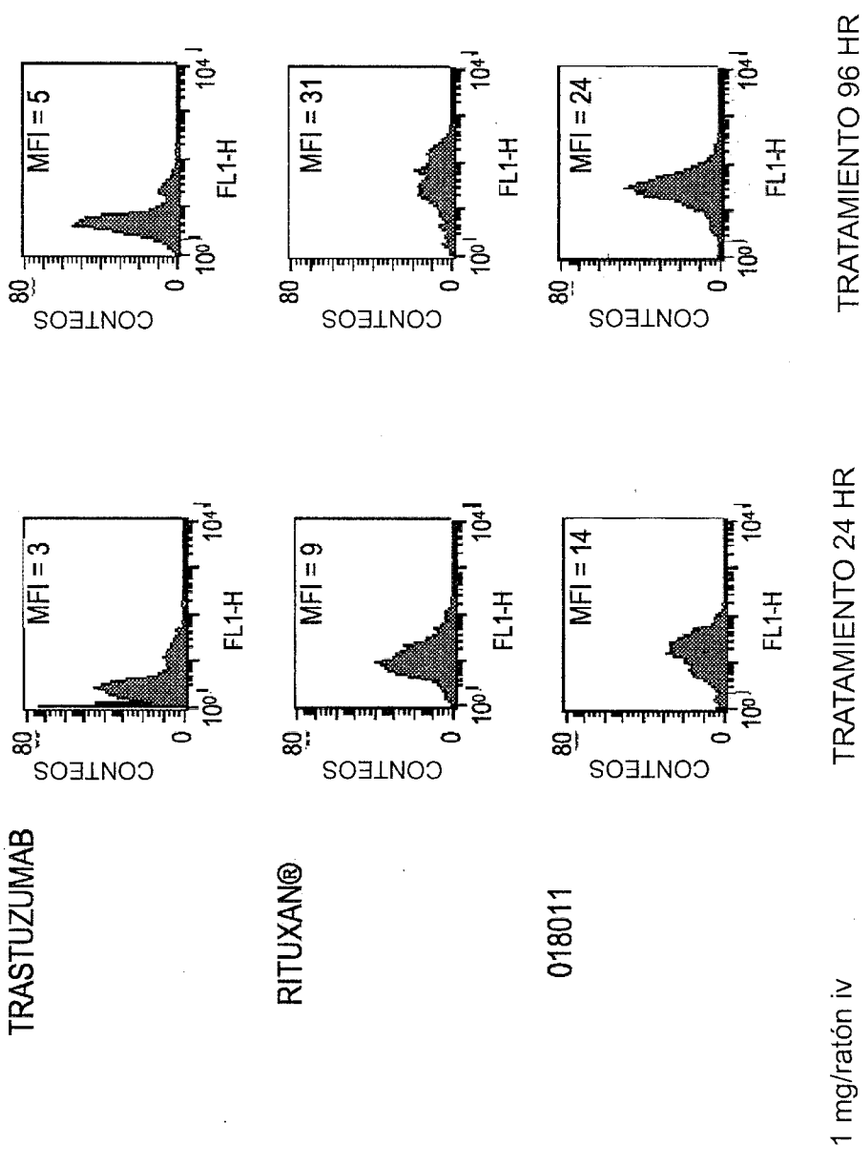


Figura 26

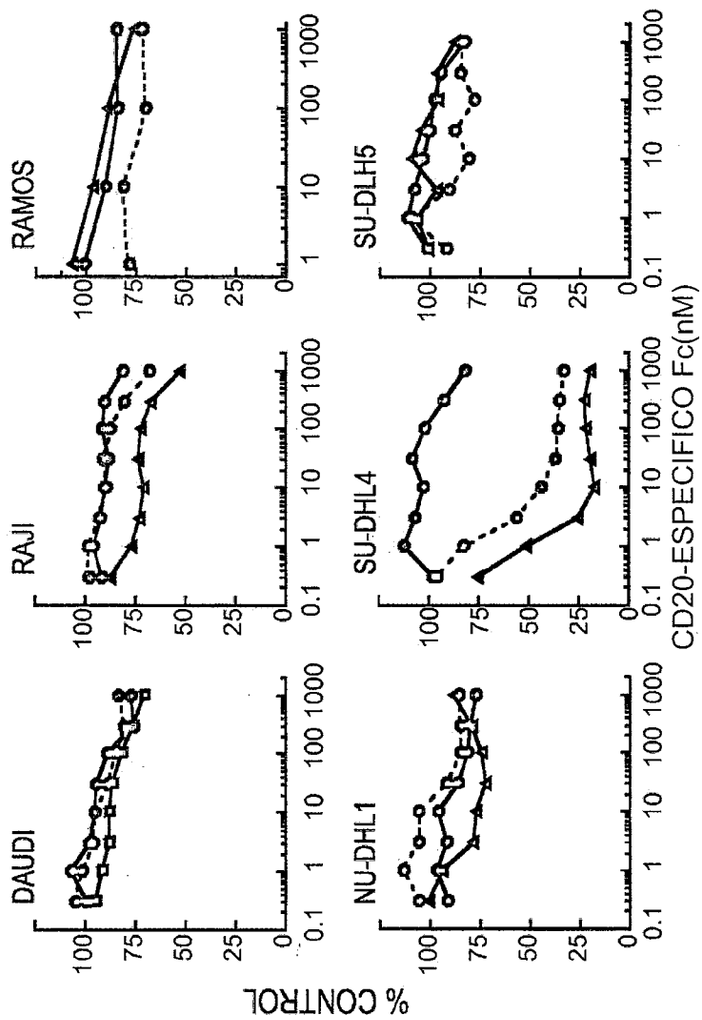

RAMOS
SU-DLH5
RAJI
SU-DHL4
DAUDI
NU-DHL1
% CONTROL
CD20-ESPECIFICO Fc(nM)
018011
TRU-015
RITUXAN®

Figura 27

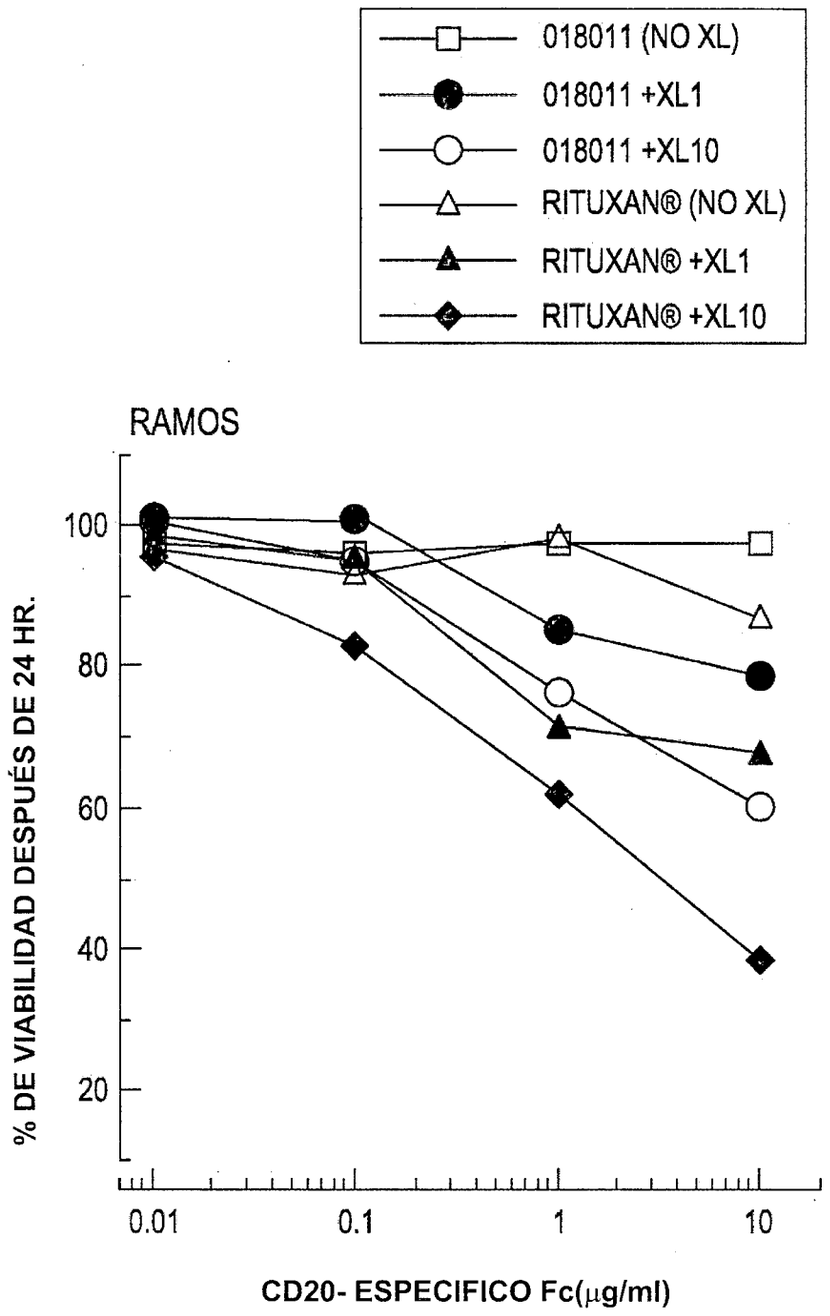

018011 (NO XL)
018011 +XL1
018011 +XL10
RITUXAN® (NO XL)
RITUXAN® +XL1
RITUXAN® +XL10
RAMOS
% DE VIABILIDAD DESPUÉS DE 24 HR.
100
80
60
40
20
0.01
0.1
1
10
CD20- ESPECIFICO Fc(µg/ml)

Figura 28

RESUMEN SMIP ANTI-CD20 HUMANIZADO

Designación	Variable			FW	Bisabra [1]	IgG1 Fc
018008	hVK3	S27Q	–	–	C,S,C,S	-
	hVH5	T28S	V102L	–		
					C,S,C,S	P331S
					S,C,C,S	-
					S,C,C,P	-
018009	hVK3	S27Q	–	–	C,S,C,S	-
	hVH5	T28S[1]	V95Δ V96S V102L	–		
					C,S,C,S	P331S
					S,C,C,S	-
					S,C,C,P	-
					S,C,C,P	P331S
018010	hVK3	S27Q M33I H34V	–	–	C,S,C,S	-
	hVH5	T28S[1]	V102L	–		
					C,S,C,S	P331S
					S,C,C,S	-

[1] POSICIONES DE BISAGRA EN TIPO NEÓFITO: C220, C226, C229 Y P230

Figura 29 (parte 1)

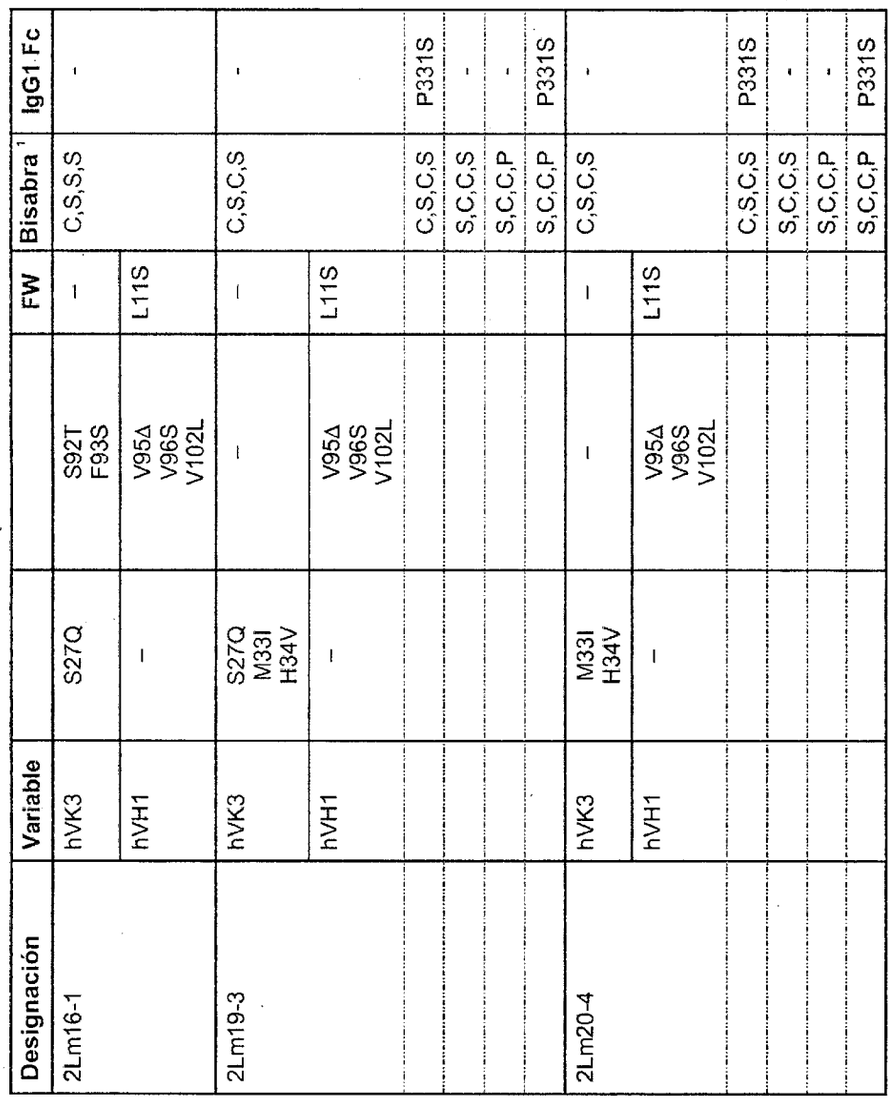
HOLA SUSTITUTA (REGLA 26)

Designación	Variable			FW	Bisabra [1]	IgG1 Fc
018011	hVK3	S27Q M33I H34V	–	–	C,S,C,S	-
	hVH5	T28S[1]	V95Δ V96S V102L	–		
					S,C,C,S	-
					S,C,C,P	-
					S,C,C,P	P331S
018014	mVK	–	–	–	C,S,C,S	-
	hVH5	T28S[1]	V102L	–		
					C,S,C,S	P331S
					S,C,C,S	-
					S,C,C,P	-
018015	mVK	–	–	–	C,S,C,S	-
	hVH5	T28S[1]	V95Δ V96S V102L	–		
					C,S,C,S	P331S
					S,C,C,S	-
					S,C,C,P	-

Figura 29 (parte 2)

Designación	Variable			FW	Bisabra	IgG1 Fc
2Lm5	hVK3	S27Q	–	–	C,S,S,S	-
	hVH3	Y27F[1] T30S[1]	V95Δ V96S V102L	–		
2Lm5-1	hVK3	S27Q	–	–	C,S,S,S	-
	hVH1	–	V95Δ V96S V102L	L11S		
2Lm6-1	hVK3	S27Q	S92T F93S	–	C,S,S,S	-
	hVH1	–	V95Δ V96S V102L	L11S		
2Lm16	hVK3	–	–	–	C,S,C,S	-
	hVH1	–	V95Δ V96S V102L	L11S		
					C,S,C,S	P331S
					S,C,C,S	-
					S,C,C,S	P331S
					S,C,C,P	-
					S,C,C,P	P331S

Figura 29 (parte 3)



Designación	Variable			FW	Bisabra [1]	IgG1 Fc
2Lm16-1	hVK3	S27Q	S92T F93S	–	C,S,S,S	-
	hVH1	–	V95Δ V96S V102L	L11S		
2Lm19-3	hVK3	S27Q M33I H34V	–	–	C,S,C,S	-
	hVH1	–	V95Δ V96S V102L	L11S		
					C,S,C,S	P331S
					S,C,C,S	-
					S,C,C,P	-
					S,C,C,P	P331S
2Lm20-4	hVK3	M33I H34V	–	–	C,S,C,S	-
	hVH1	–	V95Δ V96S V102L	L11S		
					C,S,C,S	P331S
					S,C,C,S	-
					S,C,C,P	-
					S,C,C,P	P331S

Figura 29 (parte 4)

341

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2008/007464

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C07K16/28 A61K39/395 A61P35/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)
EPO-Internal, MEDLINE, BIOSIS, EMBASE, WPI Data, CHEM ABS Data, Sequence Search

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2007/014238 A2 (TRUBION PHARMACEUTICALS [US]; BRUGE DANIEL JONATHAN [US] TRUBION PHARM) 1 February 2007 (2007-02-01) page 21, paragraph 60 sequence 2 examples 1-5,7 ----- -/--	1-29

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C.

[X] See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
11 November 2008	26/03/2009

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Covone-van Hees, M

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2008/007464

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	GILL ET AL: "Biopharmaceutical drug discovery using novel protein scaffolds" CURRENT OPINION IN BIOTECHNOLOGY, LONDON, GB, vol. 17, no. 6, 24 November 2006 (2006-11-24), pages 653-658, XP005779251 ISSN: 0958-1669 section "small modular immunopharmaceuticals" at page 654 page 656, right-hand column, lines 48-53	1-13
X	SHAN D ET AL: "Characterization of scFv-Ig constructs generated from the anti-CD20 mAb 1F5 using linker peptides of varying lengths" JOURNAL OF IMMUNOLOGY, AMERICAN ASSOCIATION OF IMMUNOLOGISTS, US, vol. 162, no. 11, 1 June 1999 (1999-06-01), pages 6589-6595, XP002296468 ISSN: 0022-1767 the whole document	1-23
X	BARONE D ET AL: "TRU-015, a novel CD20-directed biologic therapy, demonstrates significant anti-tumor activity in human tumor xenograft models" JOURNAL OF CLINICAL ONCOLOGY, AMERICAN SOCIETY OF CLINICAL ONCOLOGY, US, vol. 23, no. 16-part1-Supp, 1 June 2005 (2005-06-01), pages 178S-178S, XP009080866 ISSN: 0732-183X the whole document	1-23
X	BURGE D J ET AL: "TRU-015, a small modular immunopharmaceutical (SMI (TM)) drug candidate directed against CD20, demonstrates clinical improvement in subjects with rheumatoid arthritis." ARTHRITIS & RHEUMATISM, vol. 54, no. 9, Suppl. S, September 2006 (2006-09), page S230, XP008098429 & 70TH ANNUAL SCIENTIFIC MEETING OF THE AMERICAN-COLLEGE-OF-RHEUMATOLOG Y/41ST ANNUAL SCIENTIFIC MEETIN; WASHINGTON, DC, USA; NOVEMBER 10 -15, 2006 ISSN: 0004-3591 the whole document	1-29

-/--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2008/007464

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2007/014278 A2 (TRUBION PHARMACEUTICALS [US]; GROSMAIRE LAURA SUE [US]; HAYDEN-LEDBETT) 1 February 2007 (2007-02-01) examples 5-8 sequence 4	1-23
P,X	WO 2007/146968 A2 (TRUBION PHARMACEUTICALS [US]; THOMPSON PETER ARMSTRONG [US]; LEDBETTER) 21 December 2007 (2007-12-21) cited in the application page 166, lines 14-29 page 183, lines 6,7 figure 37 100% identity with hinge peptide (seq.60)sequence 115 example 7	7,14-16, 22-29
P,X	ANONYMOUS: "Pharmacy News Article" PHARMACY CHOICE (RXSCHOOL), [Online] 22 April 2008 (2008-04-22), XP002503097 Retrieved from the Internet: URL:http://www.pharmacychoice.com/News/article.cfm?Article_ID=82077> [retrieved on 2008-11-07] the whole document	1-29
A	WO 2005/047334 A1 (HANMI PHARM IND CO LTD [KR]; JUNG SUNG YOUB [KR]; KIM JIN SUN [KR]; YA) 26 May 2005 (2005-05-26) 100% identity with effector region (seq. 61)sequence 18	10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2008/007464

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This International search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers allsearchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search reportcovers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

1 - 29 (all partially)

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/US2008 /007464

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

Invention 1 claims 1-29 (all partially)

Humanized CD20 binding molecule comprising an immunoglobulin heavy chain variable domain (VH) and an immunoglobulin light chain variable domain (VL) comprising human framework regions and CDR1, CDR2 and CDR3 regions and comprising at least one CDR3 region of the VH or VL of seq.ID 1, derived products and uses (SMIP construct, a composition or a kit, nucleic acid encoding it and a vector or a host comprising said nucleic acid, medical uses as specified in claims 25-29)

Invention 2-59 claims 1-29 (all partially)

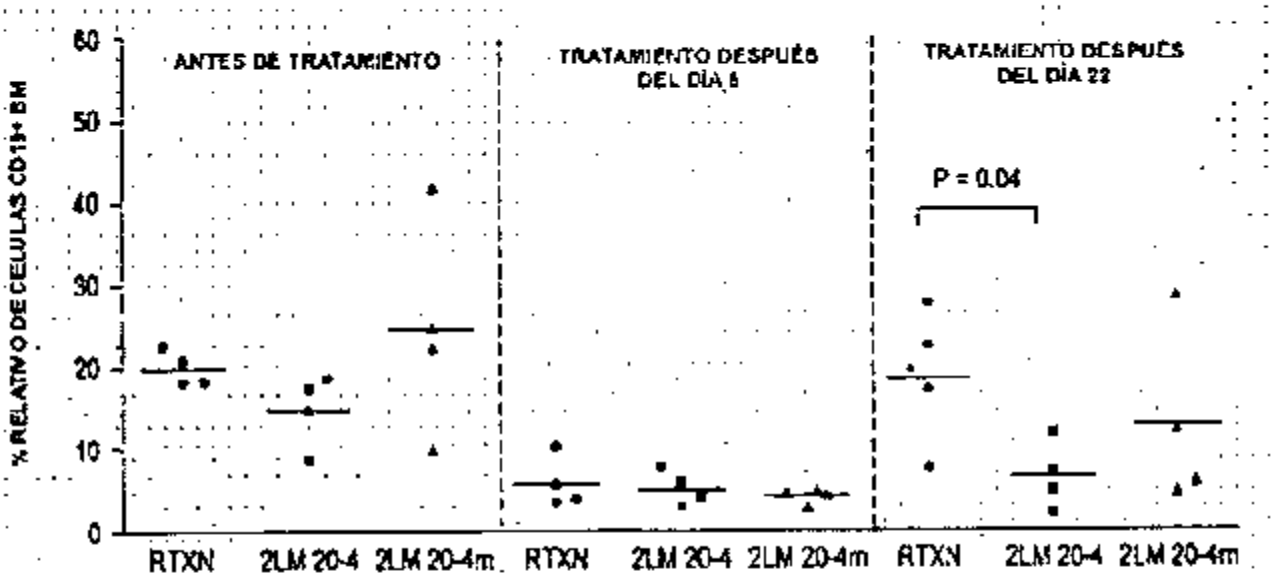
Humanized CD20 binding molecule comprising an immunoglobulin heavy chain variable domain (VH) and an immunoglobulin light chain variable domain (VL) comprising human framework regions and CDR1, CDR2 and CDR3 regions and comprising at least one CDR3 region of the VH or VL of seq.ID 2 ..... through seq.ID.59, derived products and uses (SMIP construct, a composition or a kit, nucleic acid encoding it and a vector or a host comprising said nucleic acid, medical uses as specified in claims 25-29) wherein each CD20 binding molecule and SMIP construct represents a different invention.

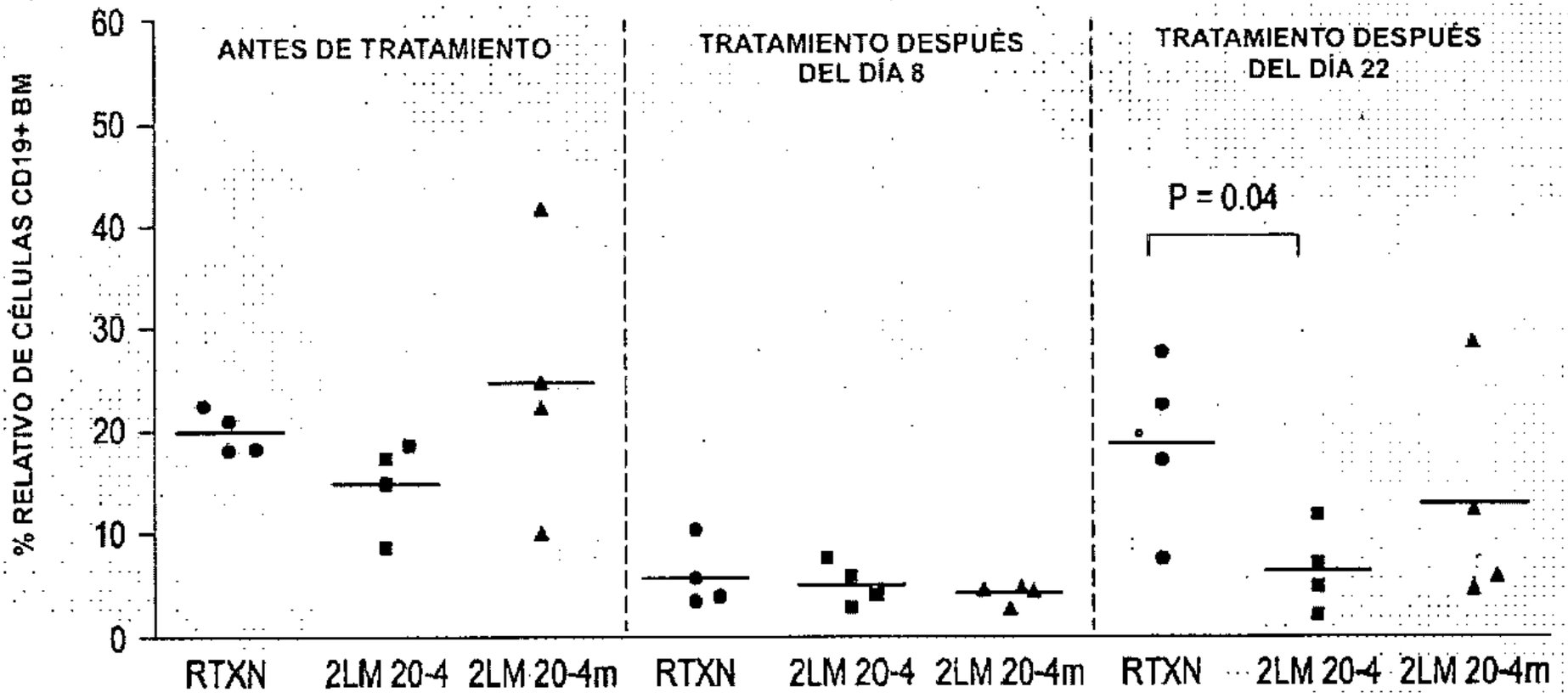
INTERNATIONAL SEARCH REPORT

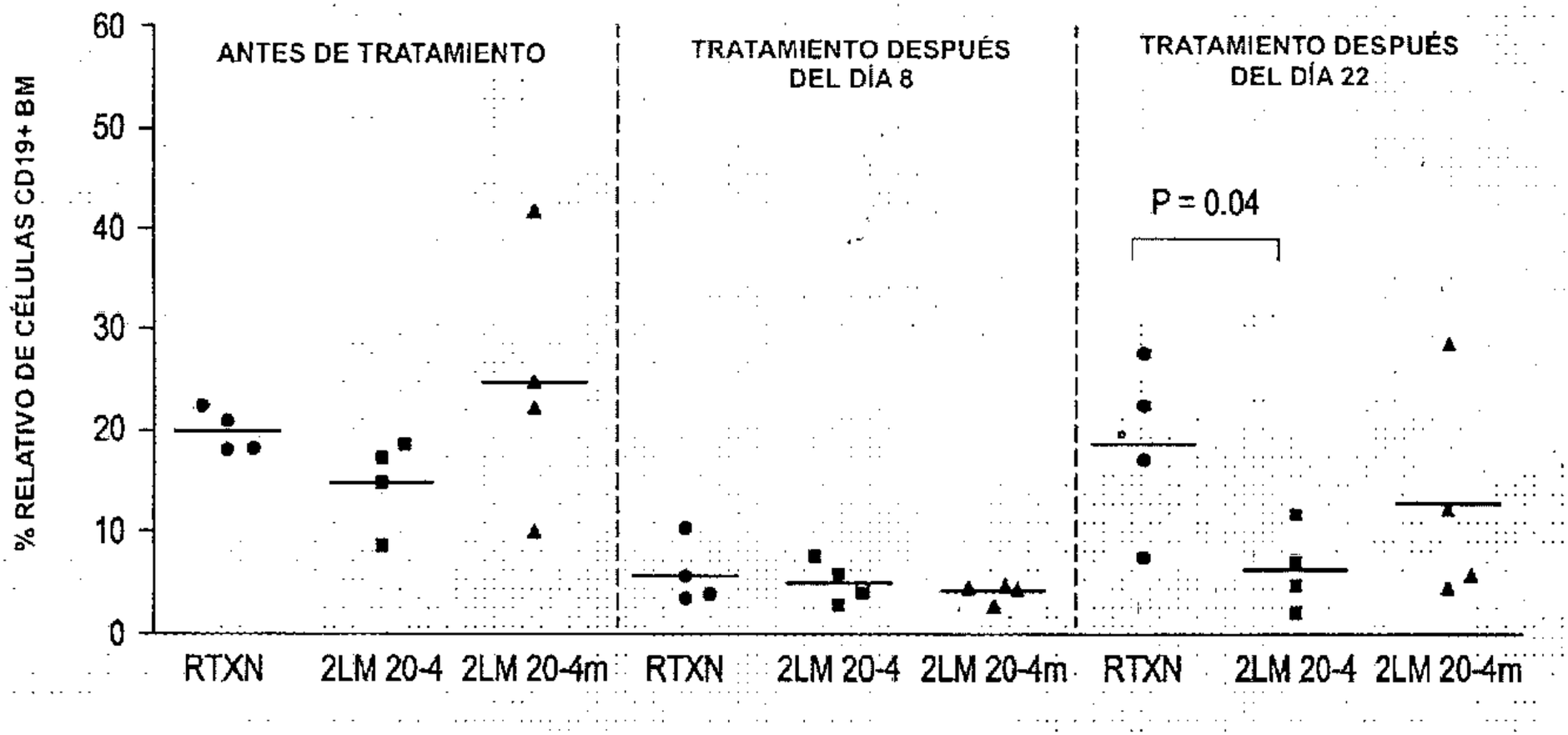
Information on patent family members

International application No
PCT/US2008/007464

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2007014238 A2	01-02-2007	AU 2006272597 A1	01-02-2007
		CA 2616386 A1	01-02-2007
		EC SP088220 A	26-03-2008
		EP 1919505 A2	14-05-2008
		JP 2009502936 T	29-01-2009
		KR 20080047540 A	29-05-2008
		NO 20080318 B	02-04-2008
WO 2007014278 A2	01-02-2007	AU 2006272555 A1	01-02-2007
		CA 2616395 A1	01-02-2007
		EP 1912675 A2	23-04-2008
		JP 2009502171 T	29-01-2009
		KR 20080032192 A	14-04-2008
WO 2007146968 A2	21-12-2007	AU 2007257692 A1	21-12-2007
		CL 36232007 A1	08-08-2008
WO 2005047334 A1	26-05-2005	AU 2004282984 A1	14-07-2005
		AU 2004282985 A1	30-06-2005
		BR PI0406605 A	06-12-2005
		BR PI0406606 A	06-12-2005
		CA 2512657 A1	26-05-2005
		CA 2512933 A1	26-05-2005
		CN 1723219 A	18-01-2006
		CN 1723220 A	18-01-2006
		EP 1682581 A1	26-07-2006
		EP 1682582 A1	26-07-2006
		EP 1682583 A1	26-07-2006
		EP 1682584 A1	26-07-2006
		JP 2007531513 T	08-11-2007
		JP 2007532098 T	15-11-2007
		JP 2007536211 T	13-12-2007
		JP 2007537992 T	27-12-2007
		WO 2005047335 A1	26-05-2005
		WO 2005047336 A1	26-05-2005
		WO 2005047337 A1	26-05-2005
		KR 20050047030 A	19-05-2005
		KR 20050047031 A	19-05-2005
		KR 20050047032 A	19-05-2005
		KR 20050047033 A	19-05-2005
		KR 20060054252 A	22-05-2006
		MX PA05007210 A	10-02-2006
		MX PA05007211 A	10-02-2006
		US 2006275254 A1	07-12-2006
		US 2006269553 A1	30-11-2006
		US 2006276633 A1	07-12-2006
		US 2007041967 A1	22-02-2007
		US 2008085862 A1	10-04-2008
		US 2008124347 A1	29-05-2008


% RELATIVO DE CELULAS CD19+ BM
60
50
40
30
20
10
0
ANTES DE TRATAMIENTO
TRATAMIENTO DESPUÉS DEL DÍA 8
TRATAMIENTO DESPUÉS DEL DÍA 22
P = 0.04
RTXN
2LM 20-4
2LM 20-4m
RTXN
2LM 20-4
2LM 20-4m
RTXN
2LM 20-4
2LM 20-4m


% RELATIVO DE CÉLULAS CD19+ BM
60
50
40
30
20
10
0
ANTES DE TRATAMIENTO
TRATAMIENTO DESPUÉS DEL DÍA 8
TRATAMIENTO DESPUÉS DEL DÍA 22
P = 0.04
RTXN
2LM 20-4
2LM 20-4m
RTXN
2LM 20-4
2LM 20-4m
RTXN
2LM 20-4
2LM 20-4m


% RELATIVO DE CÉLULAS CD19+ BM
60
50
40
30
20
10
0
ANTES DE TRATAMIENTO
TRATAMIENTO DESPUÉS DEL DÍA 8
TRATAMIENTO DESPUÉS DEL DÍA 22
P = 0.04
RTXN
2LM 20-4
2LM 20-4m
RTXN
2LM 20-4
2LM 20-4m
RTXN
2LM 20-4
2LM 20-4m

349

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 10 175
FECHA : ENERO 5 DE 2010

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 10-002346- -00000-0000
Fecha: 2010-01-12 16:28:55 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 351

***** C O N S I G N A C I O N *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAG	Vr. PAGO
CAVELIER ABOGADOS	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	305863	05/01/2010	57,606,000.00

***** C O N C E P T O *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO		TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1	TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	554,000.00
			TOTAL : $	554,000.00

SON: QUINIENTOS CINCUENTA Y CUATRO MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

Colo: 17773 - 841 - 001 - 1.

350

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089 2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 10 235
FECHA : ENERO 5 DE 2010

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 10-002346- -00000-0000

Fecha: 2010-01-12 16:28:55 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 351

***** C O N C I G N A C I O N *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAG	VR. PAGO
CAVELIER ABOGADOS	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	002764207	295263	05/01/2010	57,486.000.00

***** C O N C E P T O *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	30005 01 01	SOLICITUDES *** DEVINDICACION UNITARIA ADICIONAL	26,000.00
		TOTAL : $	26.000.00

SON: VEINTISEIS MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

COLO: 17473-841-001-1

351

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

CERTIFICACION DE EXCEDENTE : 10 - 322
FECHA : ENERO 9 DE 2010

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 10-002346- -00000-0000
Fecha: 2010-01-12 16:28:55 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 351

***** C O N S I G N A C I O N *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	VR. PAGO
CAVELIER ABOGADOS	RECIBO DE CAJA			321	05/01/2010	4,720,000.00

***** C O N C E P T O *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-07 OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD I	07 OTROS SERVICIOS ADMINISTRATIVOS	472,000.00
		TOTAL : $	472,000.00

SON: CUATROCIENTOS SETENTA Y DOS MIL PESOS

RESPONSABLE: _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

ESTA CERTIFICACION DE EXCEDENTE DE PAGO NO PODRA SER UTILIZADA COMO PARTE DE LA CANCELACION DE UNA TARIFA VIGENTE Y NO PODRA SER SUSTITUIDA POR NINGUN RECIBO.

Cob: 17473-841-001-1.

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 10-002346- -00000-0000

Fecha: 2010-01-12 16:28:55 Dep: 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 351

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

LISTA DE CHEQUEO
ADMISIÓN A TRÁMITE – NUEVAS CREACIONES

PATENTE DE INVENCIÓN ☐ MODELO DE UTILIDAD ☐ Art 33 Decisión 486/00

- ☐ Indicación que se solicita una patente.
- ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que p[illegible] solicitud
- ☐ Descripción de la invención
- ☐ Dibujos de ser estos pertinentes
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)

Completa ☐ Incompleta ☐

PATENTE DE INVENCIÓN PCT ☐ MODELO DE UTILIDAD PCT ☐ Art.33 Decisión 486/00, Circular Única

- ☐ Indicación que se solicita una PCT
- ☐ Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)
- ☐ Dibujos de ser estos pertinentes
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)

Completa ☐ Incompleta ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐ (Art. 119 Decisión 486/00)

- ☐ Indicación que se solicita Diseño industrial
- ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- ☐ Representación gráfica y fotográfica del Diseño industrial o muestra del material que incorpora el diseño
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas

Completa ☐ Incompleta ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐ (Art. 92 Decisión 486/00)

- ☐ Indicación que se solicita un esquema de trazado
- ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- ☐ Representación gráfica de un esquema de trazado
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas

Completa ☐ Incompleta ☐

Bogotá,
2020

Doctor(a)
SUAREZ DE PAEZ LUZ CLEMENCIA

REFERENCIA	Radicación No.	10 2346
	Solicitud internacional	PCT/US2008/007464
	Fecha inicio fase nacional	12/01/2010
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	430
	Oficio No.	2163

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

1. La solicitud no contiene el poder debidamente otorgado por la sociedad TRUBION PHARMACEUTICALS, INC., con el lleno de los requisitos exigidos por los artículos 63 y subsiguientes del Código de Procedimiento Civil. Adicionalmente, deberá presentar el documento que acredita la existencia y representación legal de la sociedad solicitante.

2. El solicitante debe presentar un nuevo titulo que permita identificar la materia de la cual trata la solicitud, ya que el titulo relacionado no se encuentra con la precisión necesaria para identificar claramente el objeto de la solicitud de patente. (Regla 4.3 PCT, Art 26-27 D-486, Circular única 5.2.9)

3. La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante, conforme a lo establecido por el artículo 26 literal k) de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina. Cuando se trate de documentos otorgados en el extranjero, estos deberán legalizarse de conformidad con lo dispuesto por los artículos 259 y 260 del Código de Procedimiento Civil. Cuando se trate de las declaraciones a que hace referencia la Regla 4.17 ii) del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes PCT., el alcance de las tales declaraciones se determinará según indiquen claramente una cesión de derechos del inventor al solicitante o su causante, de conformidad con lo dispuesto en el numeral 5.2.15 del Capítulo Quinto, Título X de la Circular Única de Superintendencia de Industria y Comercio.

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal

Continua en la página siguiente...

Radicación No.:10 2346

e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Unica No.10 de 2001.

ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL
Directora de Nuevas Creaciones (c)

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha 19 FEB. 2010
adpall