53

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 10-014090- -00000-0000

Fecha: 2010-02-09 16:59:25 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 247

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO INVENTARIO

PCT

DELEGATURA DE PROPIEDAD INDUSTRIAL

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES

10 - 14090

SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCIÓN

TITULO: ANTICUERPOS ANTI-CD37

SOLICITANTE: BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL GMBH

DIRECCIÓN: Binger Strasse 173, 55216 Ingelheim, Alemania

APODERADO: CARLOS R. OLARTE

BOGOTÁ 09 de Fe[illegible] 2010

Folio, Prd y Cm
09-03-2010

COP 100001-2009 PCT

OLARTERAISBECK
OLARTE RAISBECK MOURE &

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 10-014090- -00000-0000
Fecha: 2010-02-09 16:59:25 Dep: 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 247

PETITORIO - FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD
PATENTE PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL **COP 100001-2009 PCT**

SOLICITUD DE:

(1) [X] Patente de Invención. [ ] Patente de Modelo de Utilidad.

[X] Capítulo I. [ ] Capítulo II.

(2) SOLICITANTE (71)

Nombre: **BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL GMBH**
Dirección: Binger Strasse 173, 55216 Ingelheim
Nacionalidad o Domicilio: Alemana
Lugar de Constitución: Alemania
Teléfono: _____ **Fax:** _____
E-mail: _____

IDENTIFICACIÓN
C.C. [ ] **NIT** [ ]
C.E. [ ] **Otro** [ ]
Cual _____
Número _____

REPRESENTANTE O APODERADO

Nombre: CARLOS R. OLARTE
Dirección: Diagonal 34 No. 5-28
Teléfono: 601-7700 **Fax:** 601-7799
E-mail: office@olarteraisbeck.com

IDENTIFICACIÓN
C.C. [x] **NIT** [ ]
C.E. [ ] **Otro** [ ]
Cual _____
Número 79.782.747 Bta
TP 74.295

INVENTOR (ES) (72)

Nombre: **1)** Karl-Heinz HEIDER, **2)** Eric BORGES, **3)** Elinborg OSTERMAN
Dirección: Boehringer Ingelheim Gmbh, CD Patents, Binger Strasse 173, 55216 Ingelheim Am, Rhein
Nacionalidad o Domicilio: 1y2) Alemana 3) Austriaco

(5) PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/EP2008/060464 Fecha Agosto 8, 2008

Publicación Internacional No. WO 2009/019312 Fecha Febrero 12, 2009

(6) Título (54) **ANTICUERPOS ANTI-CD37** (F. 254)

Clasificación Internacional (51) C07K 16/28, A61P 35/02, A61K 39/395, C12N 5/00

Prioridad SI [X] NO [ ]

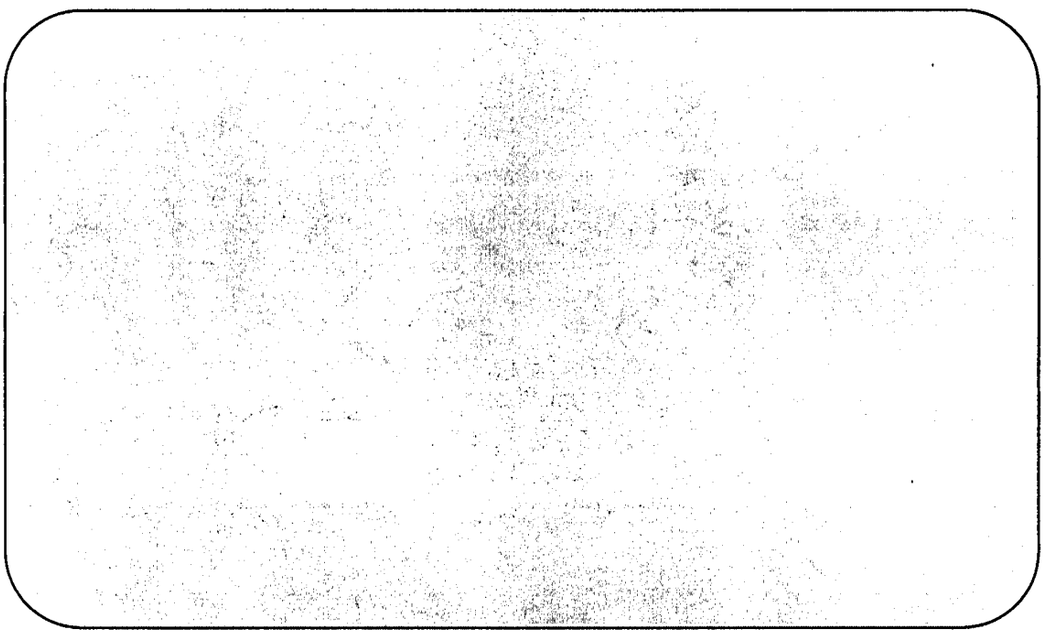
(33) País de Origen	(32) Fecha	(31) Número de Solicitud
EP	Agosto 9, 2007	07114128.7

(9) Comprobante de pago No. 10- **Fecha** 9 de Febrero de 2010

(10) **ANEXOS**

- [x] Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.
- [ ] Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- [ ] Poderes, si fuere el caso. Adjunto copia simple. Ver Exp. Nº
- [ ] Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- [ ] Declaraciones.
- [x] Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).
- [x] Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).
- [ ] Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen Preliminar (IPEA).
- [ ] Traducción del examen preliminar internacional 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 12 x 12.
- [ ] 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.
- [ ] De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.
- [x] Otros. Búsqueda Internacional

(11) **FIGURA CARACTERÍSTICA:**



(12) Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: CARLOS R. OLARTE FIRMA:

C.C. 79.782.747 Btá T.P. 74.295

Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario, ver reverso de esta página.

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 10 - 10,465
FECHA : FEBRERO 9 DE 2010

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 10-014090- -00000-0000

Fecha: 2010-02-09 16:59:25 Dep. 2020 DIR NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 247

***** C O N S I G N A C I O N *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
OLARTE RAISBEK	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	130522361	09/02/2010	3,511,000.00

***** 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._____

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

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau

(43) International Publication Date
12 February 2009 (12.02.2009)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2009/019312 A2

(51) International Patent Classification:
C07K 16/28 (2006.01) *A61K 39/395* (2006.01)
A61P 35/02 (2006.01) *C12N 5/00* (2006.01)

(21) International Application Number:
PCT/EP2008/060464

(22) International Filing Date: 8 August 2008 (08.08.2008)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
07114128.7 9 August 2007 (09.08.2007) EP

(71) Applicant *(for all designated States except US)*: **BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL GMBH** [DE/DE]; Binger Strasse 173, 55216 Ingelheim Am Rhein (DE).

(72) Inventors; and
(75) Inventors/Applicants *(for US only)*: **HEIDER, Karl-Heinz** [DE/DE]; Boehringer Ingelheim Gmbh, CD Patents, Binger Strasse 173, 55216 Ingelheim Am Rhein (DE). **BORGES, Eric** [DE/DE]; Boehringer Ingelheim Gmbh, CD Patents, Binger Strasse 173, 55216 Ingelheim Am Rhein (DE). **OSTERMANN, Elinborg** [AT/DE]; Boehringer Ingelheim Gmbh, CD Patents, Binger Strasse 173, 55216 Ingelheim Am Rhein (DE).

(74) Agent: **HAMMANN, Heinz et al.**; Boehringer Ingelheim Gmbh, Cd Patents, Binger Strasse 173, 55216 Ingelheim Am Rhein, (DE).

(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, ST, 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*
— *with sequence listing part of description published separately in electronic form and available upon request from the International Bureau*

WO 2009/019312 A2

(54) Title: ANTI CD37 ANTIBODIES

(57) Abstract: Chimeric and humanized anti-CD37 antibodies and pharmaceutical compositions containing them are useful for the treatment of B cell malignancies and autoimmune and inflammatory diseases that involve B cells in their pathology.

Anti-CD37 Antibodies

Introduction

The present invention relates to immunotherapies that are based on B cell depletion. In particular, the present invention relates to anti-CD37 antibody molecules for use in such therapies, e.g. in the treatment of B cell malignancies and autoimmune conditions.

Immunotherapy using monoclonal antibodies (mAbs) has been emerging as a safe and selective method for the treatment of cancer and other diseases. In particular, the role of monoclonal antibodies in therapies that are based on B cell depletion, e.g. in the treatment of B cell malignancies, has expanded since the introduction of rituximab (Rituxan®), an antibody that is directed against the CD20 antigen on the B cell surface. Numerous studies have confirmed the efficacy of rituximab as a single agent and in combination therapy in low-grade NHL (Hiddemann et al., 2005a; Hiddemann et al., 2005b; Hainsworth 2004; McLaughlin et al., 1998), mantle cell lymphoma (Forstpointner et al., 2004; Kahl et al., 2006; Foran et al., 2000; Howard et al., 2002; Romaguera et al., 2005), diffuse large cell lymphoma (DLCL) (Coiffier et al., 1998; Feugier et al., 2005), and Burkitt leukemia/ lymphoma (Thomas et al., 2006). However, only a subset of patients respond to therapy and the majority of those eventually relapse following rituximab treatment. Therefore, new therapeutic targets on B cells have been sought that are potentially more effective than CD20 for therapy of B cell malignancies (Zhao et al., 2007). The CD37 antigen is a cell surface antigen that has, to date, not been considered as a target for B cell malignancies to the same extent as the B cell antigen CD20.

CD37, a member of the tetraspanin superfamily, is a heavily glycosylated cell surface molecule with four transmembrane domains and two extracellular loops. CD37 is almost exclusively expressed on mature B cells, with highest expression

levels on peripheral blood B cells, reduced levels on plasma cells and non-detectable levels on CD10+ precursor B cells in the bone marrow. Low level expression of CD37 has also been reported on resting and activated T cells, granulocytes, and monocytes. In B cell neoplasm, CD37 expression is mainly observed in aggressive non-Hodgkin's lymphoma (NHL) and chronic lymphoid leukemia (CLL). High level of CD37 expression is also found on mantle cell lymphoma (MCL). This expression pattern makes CD37 an attractive target for antibody-mediated cancer therapy.

CD37 was first described in 1986 and characterized by the murine monoclonal antibody MB-1 (Link et al., 1986).

The physiological role of CD37 is unknown. Mice deficient for CD37 display no changes in development and cellular composition of lymphoid organs, but have reduced levels of IgG1 and attenuated T cell mediated immune reactions (Knobeloch et al., 2000). Studies with $CD37^{-/-}$ T cells suggest a role for CD37 in T cell proliferation (van Spriel et al., 2004).

CD37 expression on malignant B cells of various diseases has been reported. CD37 is expressed in the majority of mature B cell malignancies like Burkitt lymphoma, follicular lymphoma and lymphocytic lymphoma (Link et al., 1986). High levels of CD37 expression have been observed in hairy cell leukemia and in samples of patients with chronic lymphocytic leukemia (CLL) and different subtypes of non-Hodgkin's lymphoma (NHL) including mantle cell lymphoma (MCL) (Schwartz-Albiez et al., 1988; Barrena et al., 2005). One report utilizing antibody micro array for immunophenotyping claims CD37 to be a good discriminator between malignant CLL cells (high CD37 expression) versus normal peripheral blood (PB) lymphocytes (low CD37 expression) (Belov et al., 2001).

Binding of a CD37-specific mAb to cancer cells may trigger various mechanisms of action: First, after the antibody binds to the extracellular domain of the CD37 antigen, it may activate the complement cascade and lyse the targeted cell.

Second, an anti-CD37 antibody may mediate antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC) to the target cell, which occurs after the Fc portion of the bound antibody is recognized by appropriate receptors on cytotoxic cells of the immune system.

Third, the antibody may alter the ability of B cells to respond to antigen or other stimuli. Finally, anti-CD37 antibody may initiate programmed cell death (apoptosis).

Anti-CD37 mAb MB-1 was evaluated in two radio-immunotherapy trials in B-NHL patients (B-cell non-Hodgkin's lymphoma; Press et al., 1989; Kaminski et al., 1992). Therapeutic doses of ^{131}I-MB-1 were administered to 6 relapsed NHL patients in one trial and all 6 patients achieved a clinical complete remission (CR) with a median duration of 7 months. Of note, two of the six patients showed clinical regressions already after administration of only the tracer dose of MB-1 suggesting a direct anti-tumor effect of the antibody itself. In the second trial radio-labeled MB-1 was applied for the treatment of refractory NHL patients and resulted in 3 out of 9 evaluable patients with objective responses of limited duration (Kaminski et al., 1992). In both trials a rapid and transient depletion of peripheral B cells after injection of the trace labeled MB-1 antibody dose was reported. These observations support the conclusion that MB-1 exerts a cytotoxic activity on its own. In summary, these clinical trials underscore the feasibility of CD37-targeting for B-cell malignancies and point to a potential clinical relevance of anti-CD37 therapy.

There is experimental evidence with a CD37 specific antibody-like single chain molecule ("Small Modular ImmunoPharmaceutical", SMIP) that treatment with that molecule induces apoptosis *in vitro* and delays Burkitt lymphoma growth in a xenograft model *in vivo*. Anti-apoptotic activity of the recombinant anti-CD37 SMIP Tru16.4 from Trubion was described recently (Zhao et al., 2004). Tru 16.4 induced caspase-independent apoptosis on primary CLL cells from tumor patients. Induction of apoptosis on these cells was greater than that of Rituximab and comparable to that of Alemtuzumab, a CD52 antagonist. The degree of apoptosis

induction was directly proportionate to CD37 cell surface expression and could be further enhanced by cross-linking with an anti-human IgG antibody. A correlation of CD37 expression and ADCC was demonstrated on cell lines *in vitro*. In a Burkitt lymphoma mouse model (Raji) treatment with anti-CD37 scFv revealed therapeutic efficacy (Zhao et al., 2007). These data provide first evidence that CD37-targeting is a promising approach for targeted anti-tumor therapy by induction of apoptosis and ADCC.

In conclusion, it has been shown that the CD37 antigen is frequently expressed on tumor cells in several human B cell malignancies and on mature normal B lymphocytes and that anti-CD37-based therapy may be a promising approach for treating B cell malignancies. The depletion of CD37-positive normal B cells is not considered critical since clinical data from numerous patients show that even prolonged depletion of B cells up to 6 months with an anti-CD20 mAb does not significantly reduce IgG serum levels or increases the risk of infections (Van der Kolk et al., 2002).

Although the anti-CD37 antibodies or antibody-like molecules described above (MB-1 and SMIP Tru16.4) have shown anti-tumor efficacy in B-cell malignancies and the potential to target CD37, there is a need for alternate anti-CD37 inhibitors to improve therapies based on B-cell depletion.

Summary of invention

It was an object of the invention to provide novel CD37 antagonists for the treatment of B cell malignancies and other disorders which respond to the depletion of CD37 positive B cells.

Furthermore, it was an object of the invention to provide anti-CD37 antibodies with improved effector functions. In particular, the inventors sought to provide anti-CD37 mABs with antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC).

To solve the problem underlying the invention, a murine monoclonal anti-CD37 antibody was used as a starting antibody for generating chimeric and humanized anti-CD37 antibodies that are useful in human therapy.

In a first aspect, the present invention provides an antibody molecule that binds to human CD37 and that is derived from

a) a murine monoclonal antibody that is defined by

i. a variable heavy chain comprising the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 2; and

ii. a variable light chain comprising the amino acid sequence shown in SEQ ID NO:4, or from

b) a non-human antibody recognizing the same epitope of human CD37 as the antibody defined in a) or recognizing an epitope that is close to or overlaps with said epitope;

wherein said antibody molecule is a chimeric or a humanized antibody.

As will be understood from the following, an antibody that is "derived" from another antibody, i.e. the starting antibody, means that said antibody has been generated by modification of the starting antibody as described below.

In a preferred embodiment, the antibody molecule is a chimeric or humanized antibody molecule derived from the starting antibody defined in a). An antibody with a related sequence was designated G28.1 and described in WO 2005/017148.

The starting antibody of category b) may, for example, be selected from the CD37-specific antibodies that characterized, like G28.1, the CD37 antigen in the Third HLDA Workshop; these antibodies were designated HD28, HH1, BI14, F97-3G6 (Ling and MacLennan, 1987). Other CD37-specific antibodies that have been described include RFB-7, Y29/55, MB-1, M-B371, M-B372 and IPO-24. According to Moldenhauer, 2000, and Schwartz-Albiez et al., 1988, all these antibodies (including G28.1) recognize the same or an overlapping or close CD37 epitope. Schwartz-Albiez et al., 1988, indicates that the epitope is situated in the

carbohydrate moiety of CD37. A number of the above antibodies is commercially available, e.g. HH1 (SantaCruz), RFB-7 (Biodesign), Y29/55 (Biogenesis), M-B371 (BD Biosciences), M-B372 (SantaCruz) and IPO-24 (AbCam).

Other CD37- specific antibodies are S-B3 (Biosys), NMN46 (Chemicon), and ICO-66 (Bioprobe). Whether an antibody recognizes the same epitope as G28.1 can be determined by competitive binding assays or by cross inhibition radioimmunoassays as described by Moldenhauer et al., 1987, and Moldenhauer, 2000.

By way of example, competitive binding may be determined in an ELISA, using plates coated with CD37 protein or CD37 peptides or with CD37 positive cells (Cell ELISA) and measuring binding of biotinylated antibody in the presence of a competitor candidate antibody. In the presence of a competing antibody or antibody-derived fragment, the binding of biotinylated G28.1 (or another antibody known to recognize the same epitope) is reduced in the case that the antibodies recognize a shared epitope. To identify the G28.1 epitope peptide, fragments or short polypeptides or recombinant proteins derived from the CD37 sequence can be synthesized or produced and the binding of G28.1 to said peptides/polypeptides measured in an ELISA assay. Competitive binding can also be determined by FACS analysis, as described in the Examples.

An antibody defined in b) may be used in an analogous manner as G28.1 as a starting antibody for the generation of chimeric or humanized antibody molecules.

A starting antibody of category b) may also be generated *de novo* by using peptides or protein fragments containing the relevant epitope, or DNA molecules encoding such peptides/fragments, respectively for immunization to obtain antibodies reactive with the same epitope as G28.1.

A starting antibody b) may also be obtained by immunization with whole cells carrying the relevant epitope; the thus obtained hybridoma cells are then screened for competitive binding of the secreted antibodies.

The term "anti-CD37 antibody molecule" encompasses anti-CD37 antibodies and anti-CD37 antibody fragments as well as conjugates with antibody molecules. Antibodies include, in the meaning of the present invention, chimeric monoclonal and humanized monoclonal antibodies. The term „antibody", which may interchangeably be used with "antibody molecule", shall encompass complete immunoglobulins (as they are produced by lymphocytes and for example present in blood sera), monoclonal antibodies secreted by hybridoma cell lines, polypeptides produced by recombinant expression in host cells, which have the binding specificity of immunoglobulins or monoclonal antibodies, and molecules which have been derived from such antibodies by modification or further processing while retaining their binding specificity.

In an embodiment of the invention, the anti-CD37 antibody molecule is a chimeric antibody defined by

i) a variable heavy chain comprising the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 2;
ii) a variable light chain comprising the amino acid sequence shown in SEQ ID NO:4;
iii) constant heavy and light chains that are of human origin.

The construction and production of chimeric mouse/human antibodies is well known in the art (Boulianne et al., 1984). The variable regions of the non-human antibody are typically linked to at least a portion (F_C) of the immunoglobulin constant region of a human immunoglobulin. Human constant region DNA sequences can be isolated in accordance with well-known procedures from a variety of human cells, preferably from immortalized B cells (see Kabat et al., 1991; and WO 87/02671). The antibody molecules may contain all or only a

portion of the constant region as long as they exhibit specific binding to the CD37 antigen and the Fc receptors. The choice of the type and length of the constant region depends on whether effector functions like complement fixation or antibody-dependent cell-mediated toxicity are desired, and on the desired pharmacological properties of the antibody molecule.

In certain embodiments, the antibody molecule of the invention is a chimeric CD37-specific antibody that has the heavy chain variable region of a non-human antibody defined in a) or b) fused to the human heavy chain constant region IgG1 and the light chain variable region of a non-human antibody defined in a) or b) fused to the human light chain constant region kappa.

In yet another embodiment, the antibody molecule is a chimeric CD37-specific antibody that has the heavy chain variable region shown in SEQ ID NO:2 fused to the human heavy chain constant region IgG1 which is an IgG1 molecule with the sequence shown in SEQ ID NO:24 (coding DNA sequence: SEQ ID NO: 23) or a mutated IgG1 molecule derived therefrom and that has the light chain variable region shown in SEQ ID NO:4 fused to the human light chain constant region kappa shown in SEQ ID NO:26 (coding DNA sequence: SEQ ID NO: 25).

Other human constant regions for chimerizing a non-human starting antibody defined in a) or b) are available to the person skilled in the art, e.g. IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE or IgM (instead of IgG1) or lambda (instead of kappa). The constant regions may also be chimeric, for example, a heavy chain IgG1/IgG2 or IgG1/IgG3 chimera.

In certain embodiments of the invention, the anti-CD37 antibody molecule is a humanized antibody that is defined by

i. CDRs contained within the variable heavy chain as shown in SEQ ID NO:2 and by
ii. CDRs contained within the variable light chain as shown in SEQ ID NO:4,

iii. frameworks supporting said CDRs that are derived from a human antibody,

iv. constant heavy and light chains that are from a human antibody.

Humanized forms of non-human (e.g. murine, rat or rabbit antbodies) antibodies are immunoglobulins, immunoglobulin chains or fragments thereof (such as Fv, Fab, Fab', $F(ab')_2$ or other antigen-binding molecules with subsequences of antibodies) that contain minimal sequences derived from non-human immunoglobulin.

Humanized antibodies include human immunoglobulins (from the recipient antibody) in which residues from a complementarity determining region (CDR) of the recipient antibody are replaced by residues from a CDR of a non-human species (donor antibody) such as mouse, rat or rabbit having the desired specificity, affinity and capacity. In some instances, Fv framework residues of the human immunoglobulin are replaced by corresponding non-human residues.

In the humanized antibodies of the invention, the sequences encoding CDRs of a non-human starting antibody defined in a) or b) have been grafted into the respective genes of human immunoglobulin heavy and light chains.

"Complementarity determining regions" (CDRs) of a monoclonal antibody are understood to be those amino acid sequences involved in specific antigen binding according to Kabat et al., 1991, in connection with Chothia and Lesk (1987). From the sequences of the variable regions as shown in SEQ ID NO:2 and SEQ ID NO:4, the CDR sequence can be routinely determined by searching the Kabat sequence database for sequence features.

Techniques for obtaining humanized antibodies are routinely available to the skilled person, they have been described, *inter alia*, in US 5,225,539; US 6,548,640; and US 6,982,321.

Appropriate framework residues of the CDR-grafted antibody may be reverted to

murine residues to improve binding affinity. As described above, from methods pertinent to the art, the expert knows how to obtain the CDRs from a given non-human antibody, to choose and obtain appropriate human immunoglobulin genes, to graft the CDRs into these genes, to modify selected framework residues, to express the CDR-grafted antibody in appropriate host cells, e.g. Chinese hamster ovary (CHO) cells, and to test the resulting recombinant antibodies for binding affinity and specificity.

To obtain a humanized antibody, the antigen binding sites, which are formed by the CDRs of the heavy chain and CDRs of the light chain, are excised from the DNA of cells secreting the rodent (murine) monoclonal antibody and grafted into the DNA coding for the framework of the human antibody.

Alternatively to CDR grafting, non-human, in particular murine, anti-CD37 antibodies can be humanized by the so-called "resurfacing" technology, whereby the rodent frameworks are left unchanged with the exception of surface-exposed residues, as described in US 5,639,641.

In a further aspect, the invention relates to humanized antibodies having a variable heavy chain with a sequence shown in SEQ ID NO:6 and a variable light chain with a sequence selected from the sequences shown in SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:20 and SEQ ID NO:22.

In another aspect, the invention relates to humanized antibodies having a variable heavy chain with a sequence shown in SEQ ID NO:8 and a variable light chain with a sequence selected from the sequences shown in SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:20 and SEQ ID NO:22.

In another aspect, the invention relates to humanized antibodies having a variable heavy chain with a sequence shown in SEQ ID NO:10 and a variable light chain

with a sequence selected from the sequences shown in SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:20 and SEQ ID NO:22.

The above defined humanized antibodies are shown in Table 1.

In certain embodiments, the humanized antibody has a human heavy chain constant region IgG1 and a human light chain constant region kappa. As described above for the chimeric antibodies, the constant regions may be selected from other classes and subclasses.

In certain embodiments, in humanized antibodies of the invention, the human constant heavy chain IgG1 is an IgG1 molecule with the sequence shown in SEQ ID NO:24 or a mutated IgG1 molecule derived therefrom and the human light chain constant region kappa has the sequence shown in SEQ ID NO:26.

Anti-CD37 antibody molecules of the invention may also be variants of the antibodies that are defined by the amino acid sequences shown in the sequence listing. Using routinely available technologies, the person skilled in the art will be able to prepare, test and utilize functional variants of the above-defined antibodies. Examples are variant antibodies with at least one position in a CDR and/or framework altered, variant antibodies with single amino acid substitutions in the framework region where there is a deviation from the germline sequence, antibodies with conservative amino substitutions, antibodies that are encoded by DNA molecules that hybridize, under stringent conditions, with the DNA molecules presented in the sequence listing encoding antibody variable chains.

Given the properties of individual amino acids, rational substitutions can be performed to obtain antibody variants that conserve the overall molecular structure of the starting antibody. Amino acid substitutions, i.e., "conservative substitutions", may be made, for instance, on the basis of similarity in polarity, charge, solubility, hydrophobicity, hydrophilicity, and/or the amphipathic nature of the respective

amino acid. The skilled person is familiar with commonly practiced amino acid substitutions, as described e.g. in WO 2007/042309, and methods for obtaining thus modified antibodies. Given the genetic code and recombinant and synthetic DNA techniques, DNA molecules encoding variant antibodies with one or more conservative amino acid exchanges can be routinely designed and the respective antibodies readily obtained.

In comparison with an antibody as defined by its variable chains shown in the sequence listing, antibody variants encompassed by the invention have a sequence identity in the CDR regions of at least 60%, more preferably, at least 70% or 80%, still more preferably at least 90% and most preferably at least 95%. Preferred antibodies also have a sequence similarity in the CDR regions of at least 80%, more preferably 90% and most preferably 95%. Preferred antibody variants have a sequence identity in the variable regions of at least 60%, more preferably, at least 70% or 80%, still more preferably at least 90% and most preferably at least 95%. Preferred antibodies also have a sequence similarity in the variable regions of at least 80%, more preferably 90% and most preferably 95%.

"Sequence identity" between two polypeptide sequences indicates the percentage of amino acids that are identical between the sequences. "Sequence similarity" indicates the percentage of amino acids that either are identical or that represent conservative amino acid substitutions.

A variant may also be obtained by using an antibody with a defined sequence as shown in the sequence listing as a starting point for optimization and diversifying one or more amino acid residues, preferably amino acid residues in one or more CDRs, and by screening the resulting collection of antibody variants for variants with improved properties. Diversification of one or more amino acid residues in CDR3 of the variable light chain, CDR3 of the variable heavy chain, CDR1 of the variable light and/or CDR2 of the variable heavy chain has been proven useful. Diversification can be done by methods known in the art, e.g. the so-called TRIM technology referred to in WO 2007/042309.

In a further embodiment, the anti-CD37 antibody molecule of the invention is an "affinity matured" antibody.

An "affinity matured" anti-CD37 antibody is an anti-CD37 antibody derived from an antibody with the sequences shown in the sequence listing, that has one or more alterations in one or more CDRs which result in an improvement in the affinity for the antigens, compared to the respective original non-matured antibody. One of the procedures for generating such antibody mutants involves phage display (Hawkins et al., 1992; and Lowman et al., 1991). Briefly, several hypervariable region sites (e.g. 6-7 sites) are mutated to generate all possible amino acid substitutions at each site. The antibody mutants thus generated are displayed in a monovalent fashion from filamentous phage particles as fusions to the gene III product of M13 packaged within each particle. The phage-displayed mutants are then screened for their biological activity (e.g. binding affinity) as herein disclosed.

Affinity matured antibodies may also be produced by methods as described, for example, by Marks et al., 1992, (affinity maturation by variable heavy chain (VH) and variable light chain (VL) domain shuffling), or Barbas, et al., 1994; Shier et al., 1995; Yelton et al., 1995; Jackson et al., 1995; and Hawkins et al., 1992 (random mutagenesis of CDR and/or framework residues). Preferred affinity matured antibodies will have nanomolar or even picomolar affinities for the target antigen. In a further embodiment, the anti-CD37 antibody molecule of the invention is a "de-immunized" antibody.

A "de-immunized" anti-CD37 antibody is an antibody derived from a humanized or chimeric antibody with a sequence shown in the sequence listing, that has one or more alterations in its amino acid sequence which result in a reduction of immunogenicity of the antibody, compared to the respective original non-dehumanized antibody. One of the procedures for generating such antibody mutants involves the identification and removal of T-cell epitopes of the antibody molecule (Baker and Jones, 2007). In a first step, the immunogenicity of the antibody molecule can be determined by several methods, e.g. by *in vitro*

determination of T-cell epitopes or in silico prediction of such epitopes, as has been described in the literature (Jones et al., 2004; Jones et al., 2005; Reche et al., 2004; Hertz et al., 2006). Once the critical residues for T-cell epitope function have been identified, mutations can be made to remove immunogenicity and retain antibody activity (Jones et al., 2005; Tangri et al., 2005). Methods for introduction of mutations in proteins are well-known in the art, e.g. by overlapping PCR techniques.

Since the Fc region of an antibody interacts with a number of Fc receptors, which results in a number of important functional capabilities (which are referred to as "effector functions"), the antibody is, in certain embodiments, a full length antibody or an antibody that contains a portion of the Fc region, the latter as long as the antibody exhibits specific binding both to the relevant portion of the antigen and to Fc receptors. The choice of the type and length of the constant region depends on whether effector functions like complement fixation or antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity are desirable features, and on the desired pharmacological properties of the antibody protein.

In an embodiment of the invention, the anti-CD37 antibody is a chimeric or humanized antibody with an Fc region, or the relevant section thereof, that has been engineered to modulate effector functions, in particular to enhance binding of the antibody to one or more Fc receptors, thereby enhancing the effector function ADDC. Engineering of the Fc region mediates the antibody's effector function in the presence of effector cells more effectively than that of the non-Fc-engineered parent antibody. In one embodiment, such antibody variant mediates ADCC that is greater than that mediated by the parent antibody. (In the following, if not otherwise stated, the term "parent" in the context of an antibody molecule, or in the context of IgG or the Fc region , refers to the non-engineered antibody molecule, Fc region or IgG, respectively, from which the mutated (engineered) molecule is derived.)

A variety of modifications of the Fc region have been suggested in the art, both in the scientific literature and in patent documents, e.g. in EP 0307434, WO 9304173, WO 9734631, WO 9744362, WO 9805787, WO 9943713, WO 9951642, WO 9958572, WO 02060919, WO 03074679, WO 2004016750, WO 2004029207, WO 2004063351, WO 2004074455, WO 2004035752, WO 2004099249, WO 2005077981, WO 2005092925, WO 2006019447, WO 2006031994, WO 2006047350, WO 2006053301, WO 2006088494 and WO 2007041635.

In preferred embodiments, the antibodies of the invention are Fc variants with amino acid substitutions at positions 332 and/or 239 and/or 236. In preferred embodiments, the antibodies of the invention have mutations in the Fc domain selected from the group of

i) a single substitution at position 332, preferably I332E;
ii) a combination of substitutions at positions 239 and 332, preferably S239D/I332E;
iii) a combination of substitutions at positions 236 and 332, preferably G236A/ I332E;
iv) a combination of substitutions at positions 236, 239 and, 332, preferably G236A /S239D/I332E.

The above defined substitutions have, for example, been described by Lazar et al., 2006, in WO 2004029207 and WO 2007041635.

The Fc variants in the antibodies of the present invention are defined according to the amino acid modifications that compose them. Thus, for example, I332E is an Fc variant with the substitution I332E relative to the parent Fc polypeptide. Likewise, S239D/I332E defines an Fc variant with the substitutions S239D and I332E and S239D/I332E/G236A defines an Fc variant with the substitutions S239D, I332E, and G236A relative to the parent Fc polypeptide.

Numbering is according to the EU numbering scheme (Kabat et al., 1991), which refers to the numbering of the EU antibody (Edelman et al., 1969). The person

skilled in the art will appreciate that these conventions consist of nonsequential numbering in specific regions of an immunoglobulin sequence, enabling a normalized reference to conserved positions in immunoglobulin families.

In the above defined antibodies, the substituted positions 236, 239 and 332 correspond to positions 119, 122 and 215, respectively, of the IgG1 heavy chain depicted in SEQ ID NO:24. (In the full-length sequences of the heavy chains of antibodies A2, A4, B2 and B4 shown in SEQ ID NOs: 28, 32, 36 and 40, the substituted amino acids are at positions 235, 238 and 331).

In certain embodiments, the Fc variants of the invention are based on human IgG sequences, and thus human IgG sequences are used as the "base" sequences against which other sequences are compared. For the antibodies of the present invention, the engineered Fc region is preferably IgG, in particular IgG1, but it may also be IgG2 or variant sequences from other immunoglobulin classes such as IgA, IgE, IgGD, IgM or chimeric versions of two or more immunoglobulin classes (e.g. IgG2/IgG1) and the like. Although the Fc variants of the present invention are engineered in the context of one parent IgG, the variants may be engineered in or "transferred" to the context of another, second parent IgG. This is done by determining the "equivalent" or "corresponding" residues and substitutions between the first and second IgG, typically based on sequence or structural homology between the sequences of the first and second IgGs. In order to establish homology, the amino acid sequence of a first IgG outlined herein is directly compared to the sequence of a second IgG. After aligning the sequences, using one or more of the homology alignment programs known in the art, allowing for necessary insertions and deletions in order to maintain alignment (i.e., avoiding the elimination of conserved residues through arbitrary deletion and insertion), the residues equivalent to particular amino acids in the primary sequence of the first Fc variant are defined. Regardless of how equivalent or corresponding residues are determined, and regardless of the identity of the parent IgG in which the IgGs are made, what is meant to be conveyed is that the Fc variants used in the present invention may be engineered into any second parent IgG that has significant

sequence or structural homology with the Fc variant. Thus for example, if a variant antibody is generated wherein the parent antibody is human IgG1, by using the methods described above or other methods for determining equivalent residues, the variant antibody may be engineered, for example, in a human lgG2 parent antibody, a human IgA parent antibody (see WO 2007041635).

The antibodies of the invention target the antigen CD37, which may be advantageous over targeting CD20 in diseases in which the level of CD37 expression is higher than that of CD20, as e.g. in chronic lymphocytic leukemia, where samples have shown high levels of CD37 mRNA expression compared to low level expression of CD20 mRNA.

It has been shown that antibodies of the invention are superior to rituximab, a registered anti-CD20 antibody, with respect to ADCC activity on Ramos cells, normal B cell depletion in whole blood and Ramos Burkitt's lymphoma cell depletion. As could be shown in the experiments of the invention, the antibodies of the invention (both the non-Fc engineered and the Fc-engineered ones) have a B cell depleting activity that is superior to that of rituximab. The antibodies with the mutated Fc region show a ca. 10 fold increase of B cell depletion activity as compared to rituximab (Figure 11B).

Representatives of CD37 antibodies of the invention show potent pro-apoptotic activity without cross-linking; in this respect, antibodies with this property are superior to the anti-CD37 SMIP Tru16.4, which does not show apoptosis without cross-linking (Zhao et al., 2007). Induction of apoptosis without cross-linking, which could be shown for antibodies of the invention both with and without Fc engineering, is advantageous in the absence of a cross-linking agent in vivo (e.g. effector cells harboring Fcγ receptors) or at low density of the target antigen CD37 (e.g. tumor cells with low level expression of CD37). An antibody which induces apoptosis without cross-linking may still cause cell death, whereas an antibody dependent on cross-linking does not.

In a further aspect, an anti-CD37 antibody molecule of the invention is an antibody fragment that is derived from a humanized or chimeric CD37 specific antibody according to the present invention. To obtain antibody fragments, e.g. Fab fragments, digestion can be accomplished by means of routine techniques, e.g. using papain. Examples of papain digestion are described in WO 94/29348 and US 4,342,566. Papain digestion of antibodies typically produces two identical antigen binding fragments, so-called Fab fragments, each with a single antigen binding site, and a residual Fc fragment. Pepsin treatment yields an $F(ab')_2$ fragment that has two antigen combining sites and is still capable of cross-linking the antigen.

The Fab fragments obtained by digestion of the antibody also contain the constant domains of the light chain and the first constant domain (CH_1) of the heavy chain. Fab' fragments differ from Fab fragments in that they contain additional residues at the carboxy terminus of the heavy chain CH_1 domain including one or more cysteines from the antibody hinge region. Fab'-SH is the designation herein for Fab' in which the cysteine residue(s) of the constant domains bear a free thiol group. $F(ab')_2$ antibody fragments originally were produced as pairs of Fab' fragments which have hinge cysteines between them. Antibody fragments can also be generated by molecular biology methods producing the respective coding DNA fragments.

The antibody molecule will typically be a tetramer consisting of two light chain/heavy chain pairs, but may also be dimeric, i.e. consist of a light chain/heavy chain pair, e.g. a Fab or Fv fragment, or it may be a monomeric single chain antibody (scFv; Johnson and Bird, 1991), a minibody, or a diabody.

The anti-CD37 antibody molecule may also be in the form of a conjugate, i.e. an antibody molecule that is chemically coupled to a cytotoxic agent, particularly a cytotoxic agent that induces cytotoxicity (e.g. apoptosis or mitotic arrest) of tumor cells. As a result of normal pharmacologic clearance mechanisms, an antibody employed in a drug conjugate (an "immunoconjugate") contacts and binds to target

cells only in limited amounts. Therefore, the cytotoxic agent employed in the conjugate must be highly cytotoxic such that sufficient cell killing occurs to elicit a therapeutic effect. As described in US 2004/0241174, examples of such cytotoxic agents include taxanes (see, e.g. WO 01/38318 and WO 03/097625), DNA-alkylating agents (e.g., CC-1065 analogs), anthracyclines, tubulysin analogs, duocarmycin analogs, doxorubicin, auristatin E, ricin A toxin, and cytotoxic agents comprising a reactive polyethylene glycol moiety (see, e.g., Sasse et al., 2000; Suzawa et al., 2000; Ichimura et al., 1991; Francisco et al., 2003; US 5,475,092; US 6,340,701; US 6,372,738; and US 6,436,931; US 2001/0036923; US 2004/0001838; US 2003/0199519; and WO 01/49698).

In a preferred embodiment, the cytotoxic agent is a maytansinoid, i.e. a derivative of maytansine (CAS 35846538), maytansinoids being known in the art to include maytansine, maytansinol, C-3 esters of maytansinol, and other maytansinol analogues and derivatives (see, e.g., US 5,208,020; and US 6,441,163).

Anti-CD37 antibody immunoconjugates may be designed and synthesized as described in WO 2007/077173 for anti-FAP immunoconjugates.

In a further embodiment, the anti-CD37 molecule of the invention may be radioactively labeled to form an radioimmunoconjugate, an approach suggested for the anti-CD37 antibody MB-1 (Buchsbaum et al., 1992, see above). Radionuclides with advantageous radiation properties are known in the art, examples are Phosphorus-32, Strontium-89, Yttrium-90, Iodine-131, Samarium-153, Erbium-169, Ytterbium-175, Rhenium-188, that have been successfully and stably coupled to MAbs. The anti-CD37 antibody molecules of the invention may be labeled with various radionuclides using direct labeling or indirect labeling methods known in the art, as described in US 6,241,961. A review on technologies for generating and applying novel radiolabled antibody conjugates that are useful in the present invention, is given by Goldenberg and Sharkey, 2007.

An antibody molecule of the invention, whether Fc-engineered or not, may also be

bispecific, i.e. an antibody molecule that binds to two different targets, one of them being CD37, the other one being selected from e.g. surface antigens expressed by T cells, e.g. CD3, CD16 and CD56.

The present invention also relates to DNA molecules that encode the chimeric or humanized anti-CD37 antibody molecules of the invention. The sequences encoding variable heavy chains of the antibody molecules of the invention are shown in SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7 and SEQ ID NO:9. The sequences encoding variable light chains of the antibody molecules of the invention are shown in SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO: 21.

Nucleic acid molecules coding for the light chain and the heavy chain may be synthesized chemically and enzymatically (PCR amplification) by standard methods. First, suitable oligonucleotides can be synthesized with methods known in the art (e.g. Gait, 1984), which can be used to produce a synthetic gene. Methods to generate synthetic genes from oligonucleotides are known in the art (e.g. Stemmer et al., 1995; Ye et al., 1992; Hayden et Mandecki, 1988; Frank et al., 1987).

The DNA molecules of the invention include, but are not limited to, the DNA molecules shown in the sequence listing. Accordingly, the present invention also relates to nucleic acid molecules that hybridize to the DNA molecules set forth in the sequence listing under high stringency binding and washing conditions, as defined in WO 2007/042309, where such nucleic molecules encode an antibody or functional fragment thereof that has properties equivalent or superior to an antibody encoded by a sequence shown in the sequence listing. Preferred molecules (from an mRNA perspective) are those that have at least 75% or 80% (preferably at least 85%, more preferably at least 90% and most preferably at least 95%) homology or sequence identity with one of the DNA molecules described herein.

Yet another class of DNA variants that are within the scope of the invention may

be defined with reference to the polypeptide they encode. These DNA molecules deviate with respect to their sequence from those depicted in the sequence listing, but encode, due to the degeneracy of the genetic code, antibodies with the identical amino acid sequences. By way of example, in view of expressing the antibodies in eukaryotic cells, the DNA sequences shown in the sequence listing have been designed to match codon usage in eukaryotic cells. If it is desired to express the antibodies in *E. coli*, these sequences can be changed to match *E. coli* codon usage. Variants of DNA molecules of the invention can be constructed in several different ways, as described e.g. in WO 2007/042309.

For producing the recombinant anti-CD37 antibody molecules of the invention, the DNA molecules encoding full-length light and heavy chains or fragments thereof are inserted into an expression vector such that the sequences are operatively linked to transcriptional and translational control sequences.

For manufacturing the antibodies of the invention, the skilled artisan may choose from a great variety of expression systems well known in the art, e.g. those reviewed by Kipriyanow and Le Gall, 2004.

Expression vectors include plasmids, retroviruses, cosmids, EBV-derived episomes, and the like. The expression vector and expression control sequences are selected to be compatible with the host cell. The antibody light chain gene and the antibody heavy chain gene can be inserted into separate vectors. In certain embodiments, both DNA sequences are inserted into the same expression vector. Convenient vectors are those that encode a functionally complete human CH or CL immunoglobulin sequence, with appropriate restriction sites engineered so that any VH or VL sequence can be easily inserted and expressed, as described above. The constant chain is usually kappa or lambda for the antibody light chain, for the antibody heavy chain, it can be, without limitation, any IgG isotype (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4) or other immunoglobulins, including allelic variants.

The recombinant expression vector may also encode a signal peptide that facilitates secretion of the antibody chain from a host cell. The DNA encoding the antibody

chain may be cloned into the vector such that the signal peptide is linked in-frame to the amino terminus of the mature antibody chain DNA. The signal peptide may be an immunoglobulin signal peptide or a heterologous peptide from a non-immunoglobulin protein. Alternatively, the DNA sequence encoding the antibody chain may already contain a signal peptide sequence.

In addition to the DNA sequences encoding the antibody chains, the recombinant expression vectors carry regulatory sequences including promoters, enhancers, termination and polyadenylation signals and other expression control elements that control the expression of the antibody chains in a host cell. Examples for promoter sequences (exemplified for expression in mammalian cells) are promoters and/or enhancers derived from (CMV) (such as the CMV Simian Virus 40 (SV40) (such as the SV40 promoter/enhancer), adenovirus, (e. g., the adenovirus major late promoter (AdMLP)), polyoma and strong mammalian promoters such as native immunoglobulin and actin promoters. Examples for polyadenylation signals are BGH polyA, SV40 late or early polyA; alternatively, 3´UTRs of immunoglobulin genes etc. can be used.

The recombinant expression vectors may also carry sequences that regulate replication of the vector in host cells (e. g. origins of replication) and selectable marker genes. Nucleic acid molecules encoding the heavy chain or an antigen-binding portion thereof and/or the light chain or an antigen-binding portion thereof of an anti-CD37 antibody, and vectors comprising these DNA molecules can be introduced into host cells, e.g. bacterial cells or higher eukaryotic cells, e.g. mammalian cells, according to transfection methods well known in the art, including liposome-mediated transfection, polycation-mediated transfection, protoplast fusion, microinjections, calcium phosphate precipitation, electroporation or transfer by viral vectors.

Preferably, the DNA molecules encoding the heavy chain and the light chain are present on two vectors which are co-transfected into the host cell, preferably a mammalian cell.

Mammalian cell lines available as hosts for expression are well known in the art and include, inter alia, Chinese hamster ovary (CHO, CHO-DG44) cells, NSO, SP2/0 cells, HeLa cells, baby hamster kidney (BHK) cells, monkey kidney cells (COS), human carcinoma cells (e. g., Hep G2), A549 cells, 3T3 cells or the derivatives/progenies of any such cell line. Other mammalian cells, including but not limited to human, mice, rat, monkey and rodent cells lines, or other eukaryotic cells, including but not limited to yeast, insect and plant cells, or prokaryotic cells such as bacteria may be used. The anti-CD37 antibody molecules of the invention are produced by culturing the host cells for a period of time sufficient to allow for expression of the antibody molecule in the host cells.

Antibody molecules are preferably recovered from the culture medium as a secreted polypeptide or it can be recovered from host cell lysates if for example expressed without a secretory signal. It is necessary to purify the antibody molecules using standard protein purification methods used for recombinant proteins and host cell proteins in a way that substantially homogenous preparations of the antibody are obtained. By way of example, state-of-the art purification methods useful for obtaining the anti-CD37 antibody molecule of the invention include, as a first step, removal of cells and/or particulate cell debris from the culture medium or lysate. The antibody is then purified from contaminant soluble proteins, polypeptides and nucleic acids, for example, by fractionation on immunoaffinity or ion-exchange columns, ethanol precipitation, reverse phase HPLC, Sephadex chromatography, chromatography on silica or on a cation exchange resin. As a final step in the process for obtaining an anti-CD37 antibody molecule preparation, the purified antibody molecule may be dried, e.g. lyophilized, as described below for therapeutic applications.
In a further aspect, the present invention relates to a pharmaceutical composition containing, as the active ingredient, the anti-CD37 antibody molecule of the invention.

To be used in therapy, the anti-CD37 antibody is included into pharmaceutical

compositions appropriate to facilitate administration to animals or humans. Typical formulations of the anti-CD37 antibody molecule can be prepared by mixing the anti-CD37 antibody molecule with physiologically acceptable carriers, excipients or stabilizers, in the form of lyophilized or otherwise dried formulations or aqueous solutions or aqueous or non-aqueous suspensions. Carriers, excipients, modifiers or stabilizers are nontoxic at the dosages and concentrations employed. They include buffer systems such as phosphate, citrate, acetate and other anorganic or organic acids and their salts; antioxidants including ascorbic acid and methionine; preservatives (such as octadecyldimethylbenzyl ammonium chloride; hexamethonium chloride; benzalkonium chloride, benzethonium chloride; phenol, butyl or benzyl alcohol; alkyl parabens such as methyl or propyl paraben; catechol; resorcinol; cyclohexanol; 3-pentanol; and m-cresol); proteins, such as serum albumin, gelatin, or immunoglobulins; hydrophilic polymers such as polyvinylpyrrolidone or polyethylene glycol (PEG); amino acids such as glycine, glutamine, asparagine, histidine, arginine, or lysine; monosaccharides, disaccharides, oligosaccharides or polysaccharides and other carbohydrates including glucose, mannose, sucrose, trehalose, dextrins or dextrans; chelating agents such as EDTA; sugar alcohols such as, mannitol or sorbitol; salt-forming counter-ions such as sodium; metal complexes (e.g. Zn-protein complexes); and/or ionic or non-ionic surfactants such as TWEEN™ (polysorbates), PLURONICS™ or fatty acid esters, fatty acid ethers or sugar esters. Also organic solvents can be contained in the antibody formulation such as ethanol or isopropanol. The excipients may also have a release-modifying or absorption-modifying function.

The anti-CD37 antibody molecules may also be dried (freeze-dried, spray-dried, spray-freeze dried, dried by near or supercritical gases, vacuum dried, air-dried), precipitated or crystallized or entrapped in microcapsules that are prepared, for example, by coacervation techniques or by interfacial polymerization using, for example, hydroxymethylcellulose or gelatin and poly-(methylmethacylate), respectively, in colloidal drug delivery systems (for example, liposomes, albumin microspheres, microemulsions, nano-particles and nanocapsules), in macroemulsions or precipitated or immobilized onto carriers or surfaces, for

example by pcmc technology (protein coated microcrystals). Such techniques are disclosed in Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21st edition, Hendrickson R. Ed.

Naturally, the formulations to be used for in vivo administration must be sterile; sterilization may be accomplished be conventional techniques, e.g. by filtration through sterile filtration membranes.

It may be useful to increase the concentration of the anti-CD37 antibody to come to a so-called high concentration liquid formulation (HCLF); various ways to generate such HCLFs have been described.

The anti-CD37 antibody molecule may also be contained in a sustained-release preparation. Such preparations include solid, semi-solid or liquid matrices of hydrophobic or hydrophilic polymers, and may be in the form of shaped articles, e.g. films, sticks or microcapsules and may be applied via an application device. Examples of sustained-release matrices include polyesters, hydrogels (for example, poly(2-hydroxyethyl-methacrylate) or sucrose acetate butyrate), or poly(vinylalcohol)), polylactides (US 3,773,919), copolymers of L-glutamic acid and γ ethyl-L-glutamate, non-degradable ethylene-vinyl acetate, degradable lactic acid-glycolic acid copolymers such as the LUPRON DEPOT™ (injectable microspheres composed of lactic acid-glycolic acid copolymer and leuprolide acetate), and poly-D-(-)-3-hydroxybutyric acid. While polymers such as ethylene-vinyl acetate and lactic acid-glycolic acid enable release of molecules for over 100 days, certain hydrogels release proteins for shorter time periods. When encapsulated antibodies remain in the body for a long time, they may denature or aggregate as a result of exposure to moisture at 37°C, resulting in a loss of biological activity and possible changes in immunogenicity. Rational strategies can be devised for stabilization depending on the mechanism involved. For example, if the aggregation mechanism is discovered to be intermolecular S-S bond formation through thio-disulfide interchange, stabilization may be achieved by modifying sulfhydryl residues, lyophilization (e.g. as described in WO 89/011297) from acidic

solutions, controlling moisture content, using appropriate additives, and developing specific polymer matrix compositions.

Formulations that may also be used for the anti-CD37 antibody molecule of the invention are described in US 7,060,268 and US 6,991,790.

The CD37 antibody molecule can be incorporated also in other application forms, such as dispersions, suspensions or liposomes, tablets, capsules, powders, sprays, transdermal or intradermal patches or creams with or without permeation enhancing devices, wafers, nasal, buccal or pulmonary formulations, or may be produced by implanted cells or – after gene therapy – by the individual's own cells.

An anti-CD37 antibody molecule may also be derivatized with a chemical group such as polyethylene glycol (PEG), a methyl or ethyl group, or a carbohydrate group. These groups may be useful to improve the biological characteristics of the antibody, e.g. to increase serum half-life or to increase tissue binding.

The preferred mode of application is parenteral, by infusion or injection (intraveneous, intramuscular, subcutaneous, intraperitoneal, intradermal), but other modes of application such as by inhalation, transdermal, intranasal, buccal, oral, may also be applicable.

For the prevention or treatment of disease, the appropriate dosage of antibody will depend on the type of disease to be treated, the severity and course of the disease, whether the antibody is administered for preventive or therapeutic purposes, previous therapy, the patient's clinical history and response to the antibody, and the discretion of the attending physician. The antibody is suitably administered to the patient at one time or over a series of treatments.

Depending on the type and severity of the disease, about 0.01 μg/kg to 40 mg/kg (e.g. 0.1 – 20 mg/kg) of antibody is an initial candidate dosage for administration to the patient, whether, for example, by one or more separate administrations, or by

continuous infusion. For repeated administrations over several days or longer, depending on the condition, the treatment is sustained until a desired suppression of disease symptoms occurs. However, other dosage regimens may be useful. The progress of this therapy is easily monitored by conventional techniques and assays, e.g. by determining the extent of B cell depletion (e.g. using flow cytometry).

The "therapeutically effective amount" of the antibody to be administered is the minimum amount necessary to prevent, ameliorate, or treat a disease or disorder.

The anti-CD37 antibody molecule of the invention and pharmaceutical compositions containing it are useful to deplete B cells that express CD37 on their surface and that cause cancerous or autoimmune/inflammatory disease.

In a first aspect, the pharmaceutical composition of the invention is useful for the treatment of cancers, in particular any CD37-positive malignancies.

B cell malignancies include, without limitation, B cell lymphomas (e.g. various forms of Hodgkin's disease, B cell non-Hodgkin's lymphoma (NHL) and related lymphomas (e.g. Waldenström's macroglobulinaemia (also called lymphoplasmacytic lymphoma or immunocytoma) or central nervous system lymphomas), leukemias (e.g. acute lymphoblastic leukemia (ALL), chronic lymphocytic leukemia (CLL; also termed B cell chronic lymphocytic leukemia BCLL), hairy cell leukemia and chronic myoblastic leukemia) and myelomas (e.g. multiple myeloma). Additional B cell malignancies 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's lymphoma/leukemia, grey zone lymphoma, B cell proliferations of uncertain malignant potential, lymphomatoid

granulomatosis, and post-transplant lymphoproliferative disorder.

In a further aspect, a pharmaceutical composition containing anti-CD37 antibodies is useful for the treatment of autoimmune and inflammatory diseases that involve B cells in their pathology.

Such 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, myasthenia 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 thrombocytopenic 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 (see WO 2007/014278).

Depending on the disorder to be treated, the anti-CD37 antibody molecule of the invention may be used on its own or in combination with one or more additional therapeutic agents, in particular selected from DNA damaging or tubulin binding agents or therapeutically active compounds that inhibit angiogenesis, signal transduction pathways or mitotic checkpoints in cancer cells.

The additional therapeutic agent may be administered simultaneously with, optionally as a component of the same pharmaceutical preparation, or before or

after administration of the anti-CD37 antibody molecule.

In certain embodiments, the additional therapeutic agent may be, without limitation, one or more inhibitors selected from the group of inhibitors of EGFR family, VEGFR family, IGF-1R, Insulin receptors, AuroraA, AuroraB, PLK and PI3 kinase, FGFR, PDGFR, Raf, KSP or PDK1.

Further examples of additional therapeutic agents are inhibitors of CDKs, Akt, Src, Bcr-Abl, cKit, cMet/HGF, c-Myc, Flt3, HSP90, hedgehog antagonists, inhibitors of JAK/STAT, Mek, mTor, NFkappaB, the proteasome, Rho, an inhibitor of Wnt signaling or Notch signaling or an ubiquitination pathway inhibitor.

Examples for Aurora inhibitors are, without limitation, PHA-739358, AZD-1152, AT-9283, CYC-116, R-763, VX-667, MLN-8045, PF-3814735, SNS-314, VX-689, GSK-1070916, TTP-607, PHA-680626, MLN-8237 and ENMD-2076.

An example for a PLK inhibitor is GSK-461364.

Examples for raf inhibitors are BAY-73-4506 (also a VEGFR inhibitor), PLX-4032, RAF-265 (also a VEGFR inhibitor), sorafenib (also a VEGFR inhibitor), XL-281, and Nevavar (also an inhibitor of the VEGFR).

Examples for KSP inhibitors are ispinesib, ARRY-520, AZD-4877, CK-1122697, GSK-246053A, GSK-923295, MK-0731, SB-743921, LY-2523355, and EMD-534085.

Examples for a src and/or bcr-abl inhibitors are dasatinib, AZD-0530, bosutinib, XL-228 (also an IGF-1R inhibitor), nilotinib (also a PDGFR and cKit inhibitor), imatinib (also a cKit inhibitor), NS-187, KX2-391, AP-24534 (also an inhibitor of EGFR, FGFR, Tie2, Flt3), KM-80 and LS-104 (also an inhibitor of Flt3, Jak2).

An example for a PDK1 inhibitor is AR-12.
An example for a Rho inhibitor is BA-210.

Examples for PI3 kinase inhibitors are PX-866, PX-867, BEZ-235 (also an mTor inhibitor), XL-147, and XL-765 (also an mTor inhibitor), BGT-226, CDC-0941.

Examples for inhibitors of cMet or HGF are XL-184 (also an inhibitor of VEGFR, cKit, Flt3), PF-2341066, MK-2461, XL-880 (also an inhibitor of VEGFR), MGCD-265 (also an inhibitor of VEGFR, Ron, Tie2), SU-11274, PHA-665752, AMG-102, AV-299, ARQ-197, MetMAb, CGEN-241, BMS-777607, JNJ-38877605, PF-4217903, SGX-126, CEP-17940, AMG-458, INCB-028060, and E-7050.

An example for a c-Myc inhibitor is CX-3543.

Examples for Flt3 inhibitors are AC-220 (also an inhibitor of cKit and PDGFR), KW-2449, LS-104 (also an inhibitor of bcr-abl and Jak2), MC-2002, SB-1317, lestaurtinib (also an inhibitor of VEGFR, PDGFR, PKC), TG-101348 (also an inhibitor of JAK2), XL-999 (also an inhibitor of cKit, FGFR, PDGFR and VEGFR), sunitinib (also an inhibitor of PDGFR, VEGFR and cKit), and tandutinib (also an inhibitor of PDGFR, and cKit).

Examples for HSP90 inhibitors are, tanespimycin, alvespimycin, IPI-504, STA-9090, MEDI-561, AUY-922, CNF-2024, and SNX-5422.

Examples for JAK/STAT inhibitors are CYT-997 (also interacting with tubulin), TG-101348 (also an inhibitor of Flt3), and XL-019.

Examples for Mek inhibitors are ARRY-142886, AS-703026, PD-325901, AZD-8330, ARRY-704, RDEA-119, and XL-518.

Examples for mTor inhibitors are temsirolimus, deforolimus (which also acts as a

VEGF inhibitor), everolimus (a VEGF inhibitor in addition). XL-765 (also a PI3 kinase inhibitor), and BEZ-235 (also a PI3 kinase inhibitor).

Examples for Akt inhibitors are perifosine, GSK-690693, RX-0201, and triciribine.

Examples for cKit inhibitors are masitinib, OSI-930 (also acts as a VEGFR inhibitor), AC-220 (also an inhibitor of Flt3 and PDGFR), tandutinib (also an inhibitor of Flt3 and PDGFR), axitinib (also an inhibitor of VEGFR and PDGFR), sunitinib (also an inhibitor of Flt3, PDGFR, VEGFR), and XL-820 (also acts as a VEGFR- and PDGFR inhibitor), imatinib (also a bcr-abl inhibitor), nilotinib (also an inhibitor of bcr-abl and PDGFR).

Examples for hedgehog antagonists are IPI-609, CUR-61414, GDC-0449, IPI-926, and XL-139.

Examples for CDK inhibitors are seliciclib, AT-7519, P-276, ZK-CDK (also inhibiting VEGFR2 and PDGFR), PD-332991, R-547, SNS-032, PHA-690509, PHA-848125, and SCH-727965.

Examples for proteasome inhibitors are bortezomib, carfilzomib, and NPI-0052 (also an inhibitor of NFkappaB).

Examples for proteasome inhibitors/NFkappaB pathway inhibitors are bortezomib, carfilzomib, NPI-0052, CEP-18770, MLN-2238, PR-047, PR-957, AVE-8680, and SPC-839.

An example for an inhibitor of the ubiquitination pathway is HBX-41108.

Examples for anti-angiogenic agents are inhibitors of the FGFR, PDGFR and VEGF(R), and thalidomides, such agents being selected from, without limitation, bevacizumab, motesanib, CDP-791, SU-14813, telatinib, KRN-951, ZK-CDK (also an inhibitor of CDK), ABT-869, BMS-690514, RAF-265, IMC-KDR, IMC-18F1,

IMiDs, thalidomide, CC-4047, lenalidomide, ENMD-0995, IMC-D11, Ki-23057, brivanib, cediranib, 1B3, CP-868596, IMC-3G3, R-1530 (also an inhibitor of Flt3), sunitinib (also an inhibitor of cKit and Flt3), axitinib (also an inhibitor of cKit), lestaurtinib (also an inhibitor of Flt3 and PKC), vatalanib, tandutinib (also an inhibitor of Flt3 and cKit), pazopanib, PF-337210, aflibercept, E-7080, CHIR-258, sorafenib tosylate (also an inhibitor of Raf), vandetanib, CP-547632, OSI-930, AEE-788 (also an inhibitor of EGFR and Her2), BAY-57-9352 (also an inhibitor of Raf), BAY-73-4506 (also an inhibitor of Raf), XL-880 (also an inhibitor of cMet), XL-647 (also an inhibitor of EGFR and EphB4), XL-820 (also an inhibitor of cKit), nilotinib (also an inhibitor of cKit and brc-abl), CYT-116, PTC-299, BMS-584622, CEP-11981, dovitinib, CY-2401401, and ENMD-2976.

The additional therapeutic agent may also be selected from EGFR inhibitors, it may be a small molecule EGFR inhibitor or an anti-EGFR antibody. Examples for anti-EGFR antibodies, without limitation, are cetuximab, panitumumab, nimotuzumab, zalutumumab; examples for small molecule EGFR inhibitors are gefitinib, erlotinib and vandetanib (also an inhibitor of the VEGFR). Another example for an EGFR modulator is the EGF fusion toxin.

Further EGFR and/or Her2 inhibitors useful for combination with an anti-CD37 antibody molecule of the invention are lapatinib, trastuzumab, pertuzumab, XL-647, neratinib, BMS-599626 ARRY-334543, AV-412, mAB-806, BMS-690514, JNJ-26483327, AEE-788 (also an inhibitor of VEGFR), AZD-8931, ARRY-380 ARRY-333786, IMC-11F8, Zemab, TAK-285, AZD-4769.

The additional drug may also be selected from agents that target the IGF-1R and insulin receptor pathways. Such agents include antibodies that bind to IGF-1R (e.g. CP-751871, AMG-479, IMC-A12, MK-0646, AVE-1642, R-1507, BIIB-022, SCH-717454, rhu Mab IGFR and novel chemical entities that target the kinase domain of the IGF1-R (e.g. OSI-906 or BMS-554417, XL-228, BMS-754807).

Other agents that may be advantageously combined in a therapy with the

anti-CD37 antibody molecule of the invention are molecules targeting CD20, including CD20 specific antibodies like rituximab, LY-2469298, ocrelizumab, MEDI-552, IMMU-106, GA-101 (= R7159), XmAb-0367, ofatumumab, radiolabbeled CD20 antibodies,like tositumumab and ibritumomab tiuxetan or other CD20 directed proteins, like the SMIP Tru015, PRO-131921, FBT-A05, veltuzumab, R-7159.

CD37 antibodies may be combined with inhibitors of other surface antigens expressed on leukocytes, in particular antibodies or antibody-like molecules, e.g. anti-CD2 (siplizumab), anti-CD4 (zanolimumab), anti-CD19 (MT-103, MDX-1342, SAR-3419, XmAb-5574), anti-CD22 (epratuzumab), anti-CD23 (lumiliximab), anti-CD30 (iratumumab), anti-CD32B (MGA-321), anti-CD38 (HuMax-CD38), anti-CD40 (SGN40), anti-CD52 (alemtuzumab), anti-CD80 (galiximab). An antibody of the invention may also be combined with another CD37 antagonist, e.g. TRU-016.

Other agents to be combined with CD37 antibodies are immunotoxins like BL-22 (an anti-CD22 immunotoxin), inotuzumab ozogamicin (an anti-CD23 antibody-calicheamicin conjugate), RFT5.dgA (anti-CD25 Ricin toxin A-chain), SGN-35 (an anti-CD30-auristatin E conjugate), and gemtuzumab ozogamicin (an anti-CD33 calicheamicin conjugate), MDX-1411 (anti-CD70 conjugate), or radiolabelled antibodies like ^{90}Y-epratuzumab (anti-CD22 radioimmunoconjugate).

In addition, anti-CD37 antibodies may be combined with immunomodulators, agents, e.g. antibodies, that induce apoptosis or modify signal transduction pathways like the TRAIL receptor modulators mapatumumab (a TRAIL-1 receptor agonist), lexatumumab (a TRAIL-2 receptor agonist), tigatuzumab, Apomab, AMG-951 and AMG-655; an anti-HLA-DR antibody (like 1D09C3), an anti-CD74, an osteoclast differentiation factor ligand inhibitor (like denosumab), a BAFF antagonist (like AMG-623a) or an agonist of a Toll-like receptor (e.g. TLR-4 or TLR-9).

Other drugs that may be used in combination with the anti-CD37 antibody molecules of the present invention are selected from, but not limited to hormones, hormonal analogues and antihormonals (e.g. tamoxifen, toremifene, raloxifene, fulvestrant, megestrol acetate, flutamide, nilutamide, bicalutamide, cyproterone acetate, finasteride, buserelin acetate, fludrocortinsone, fluoxymesterone, medroxyprogesterone, hydroxyprogesterone caproate, diethylstilbestrol, testosterone propionate, fluoxymesterone/equivalents, octreotide, arzoxifene, pasireotide, vapreotide, adrenocorticosteroids/ antagonists, prednisone, dexamethasone, ainoglutethimide), aromatase inhibitors (e.g. anastrozole, letrozole, liarozole, exemestane, atamestane, formestane), LHRH agonists and antagonists (e.g. goserelin acetate, leuprolide, abarelix, cetrorelix, deslorelin, histrelin, triptorelin), antimetabolites (e.g. antifolates like methotrexate, trimetrexate, pemetrexed, pyrimidine analogues like 5-fluorouracil, fluorodeoxyuridine, capecitabine, decitabine, nelarabine, 5-azacytidine, and gemcitabine, purine and adenosine analogues such as mercaptopurine, thioguanine, azathioprine, cladribine and pentostatin, cytarabine, fludarabine, clofarabine); antitumor antibiotics (e.g. anthracyclines like doxorubicin, daunorubicin, epirubicin and idarubicin, mitomycin-C, bleomycin dactinomycin, plicamycin, splicamycin, actimomycin D, mitoxantrone, mitoxantroneidarubicin, pixantrone, streptozocin, aphidicolin); platinum derivatives (e.g. cisplatin, oxaliplatin, carboplatin, lobaplatin, satraplatin); alkylating agents (e.g. estramustine, semustine, mechlorethamine, melphalan, chlorambucil, busulphan, dacarbazine, cyclophosphamide, ifosfamide, hydroxyurea, temozolomide, nitrosoureas such as carmustine and lomustine, thiotepa); antimitotic agents (e.g. vinca alkaloids like vinblastine, vindesine, vinorelbine, vinflunine and vincristine; and taxanes like paclitaxel, docetaxel and their formulations, larotaxel; simotaxel, and epothilones like ixabepilone, patupilone, ZK-EPO); topoisomerase inhibitors (e.g. epipodophyllotoxins like etoposide and etopophos, teniposide, amsacrine, topotecan, irinotecan, banoxantrone, camptothecin) and miscellaneous chemotherapeutics such as retinoic acid derivatives, amifostine, anagrelide, interferon alpha, interferon beta, interferon gamma, interleukin-2, procarbazine, N-methylhydrazine, mitotane, and porfimer, bexarotene, celecoxib, ethylenemine/methyl-melamine, thriethyienemelamine,

triethylene thiophosphoramide, hexamethylmelamine, and enzymes L-asparaginase, L-arginase and metronidazole, misonidazole, desmethylmisonidazole, pimonidazole, etanidazole, nimorazole, RSU 1069, EO9, RB 6145, SR4233, nicotinamide, 5-bromodeozyuridine, 5-iododeoxyuridine, bromodeoxycytidine, erythrohydroxynonyl-adenine, anthracenedione, GRN-163L (a competitive telomerase template antagonist), SDX-101 (a PPAR agonist), talabostat (a DPP inhibitor), forodesine (a PNP inhibitor), atacicept (a soluble receptor targeting TNF family members BLyS and APRIL), TNF-alpha neutralizing agents (Enbrel, Humira, Remicade), XL-844 (a CHK1/2 inhibitor), VNP-40101M (a DNA alkylating agent), SPC-2996 (an antisense bcl2 inhibitor), obatoclax (a bcl2 inhibitor), enzastaurin (a PKC beta modulator), vorinistat (an HDAC inhibitor), romidepsin (an HDAC inhibitor), AT-101 (a Bcl-2/Bcl-xL inhibitor), plitidepsin (a multi-actioned depsipeptide), SL-11047 (a polyamine metabolism modulators).

In certain embodiments, the anti-CD37 antibody molecule is applied together with "CHOP" (a combination of cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine and prednisone).

The anti-CD37 antibody molecule of the invention may also be used in combination with other therapies including surgery, radiotherapy, endocrine therapy, biologic response modifiers, hyperthermia and cryotherapy and agents to attenuate any adverse effect (e.g. anticmetics), G-CSF, GM-CSF, photosensitizers such as hematoporphyrin derivatives, Photofrin®, benzoporphyrin derivatives, Npe6, tin etioporphyrin, pheoboride-a bacteriochlorophyll-a, naphthalocyanines, phthalocyanines, zinc phthalocyanines.

Monoclonal antibodies show exquisite antigen specificity and frequently only react with the human target antigen, but not with homologue proteins from animal species. To support development of therapeutic antibodies, appropriate animal models for assessment of *in vivo* toxicity and pharmacodynamic behavior are desirable. One possibility for an *in vivo* model is a transgenic mouse in which the

endogenous target antigen is replaced by its human homologue ("knock-out/ knock-in mouse"). In particular, for developing therapeutic anti-CD37 antibodies , the murine CD37 gene can be replaced by the human CD37 gene. This can be achieved by constructing a targeting vector which contains the coding genomic sequence of the human CD37 gene flanked by non-translated sequences. This targeting vector can be used for homologous recombination using mouse ES cells. Transgenic animals homozygous for human CD37 expression can be used to assess the pharmacodynamic effect of antibodies directed against human CD37, e.g. by monitoring the number of peripheral B cells after application of the antibodies. Alternatively, those mice can be used to investigate potential toxic effects of human CD37 specific antibodies, after i.v. application.

Another possibility in the case of lack of animal cross-reactivity of monoclonal antibodies is the generation of a so-called surrogate antibody. A surrogate antibody is an antibody which reacts with the homologous protein of an animal species which is relevant and useful for investigation of pharmacodynamic and toxic effects, e.g. the mouse or the cynomolgus monkey. In case of CD37, monoclonal antibodies are developed which are specific for macaque CD37 or mouse CD37, respectively Ideally, such a surrogate antibody should have similar binding and functional properties as the development antibody. This can be investigated by the use of assay systems which utilize macaque or mouse CD37 expressing cells as target cells, e.g. for binding, FACS Scatchard analysis, ADCC and apoptosis assays. Ultimately, the surrogate antibody can be selected by virtue of its B cell depleting activity in macaque or mouse blood in vitro.

Brief Description of the Figures:

Fig. 1: Chimeric Antibody A0 specifically recognizes the CD37 antigen, determined by FACS competition assay

Fig. 2: Binding of humanized versions of A0 to cellular CD37 antigen, determined by FACS

Fig. 3: Binding of humanized versions of A0 to cellular CD37 antigen,

determined by FACS

Fig. 4: Affinity of humanized versions of A0 to cellular CD37 antigen, determined by FACS scatchard analysis

Fig. 5: ADCC activity of humanized versions of A0 on Ramos cells

Fig. 6: Pro-apoptotic activity of humanized versions of A0 on Ramos cells

Fig. 7: ADCC activity of Fc-engineered versions of mAb A0 on Ramos cells

Fig. 8: ADCC activity of Fc-engineered versions of mAb B0 on Ramos cells

Fig. 9: Pro-apoptotic activity of mAb A0 and B0

Fig. 10: Pro-apoptotic activity of Fc-engineered versions of mAb A0

Fig. 11 A: Depletion of normal human B cells in a whole blood assay by Fc-engineered antibodies A2 and B2 in comparison to Rituximab

Fig. 11 B: Superior B cell depleting activity of antibodies after Fc-engineering in comparison to Rituximab

Fig. 11 C: Antibodies A2 and B2 do not deplete T cells and monocytes in whole blood assays

Fig. 12: Superior ADCC activity after Fc-engineering compared to Rituximab

Fig. 13: Depletion of Ramos Burkitt's lymphoma cells in a whole blood assay by Fc-engineered antibodies A2 and B2 in comparison to Rituximab

Fig. 14: In vivo tumor growth inhibition of Ramos xenograft tumors in nude mice by Fc-engineered antibodies A2 and B2

Fig. 15: Expression of CD37 on multiple myeloma cells

Fig. 16: ADCC activity of antibodies A2 and B2 on multiple myeloma cells

Fig. 17: Pro-apoptotic activity of antibodies A2 and B2 on patient-derived CLL cells

Example 1

Generation of chimeric and humanized anti-CD37 antibodies

a) Generation of chimeric antibody A0

Based on the variable heavy and light chain amino acid sequences shown in SEQ ID NO:2 and SEQ ID NO:4, the corresponding DNA sequences are synthesized applying codon usage optimized for mammalian cells (GeneArt,

Regensburg, Germany), adding at the 5' end a HindIII and at the 3' end a BamH1 cloning site. The synthesized DNA molecules are digested with HindIII and BamHI and the resulting DNA fragments (SEQ ID NO:1 and SEQ ID NO:3 plus restriction sites) are cloned into pcDNA3.1 based expression vectors coding for human IgG1 constant region and human kappa light chain constant region, respectively (SEQ ID NO:24 and SEQ ID NO:26). EndoFree plasmid preparations (Qiagen) are prepared and the heavy and light chain plasmids are co-transfected into HEK293 freestyle cells (Invitrogen) at a concentration of 1 mg/L of each plasmid according to the supplier's protocol. After 72 hours the supernatant is harvested and the IgG concentration is determined by ELISA. The resulting chimeric anti-CD37 antibody (designated A0) is purified on a modified protein A column (GE Healthcare), eluted into a citrate buffer then dialyzed in PBS.

b) Generation of humanized versions of chimeric antibody A0

Humanization of chimeric mAb A0, as obtained in a), is performed using a CDR grafting approach, as described e.g. in US 5,225,539; US 6,548,640; US 6,982,321.

To establish a structural model of the mAb A0 VL domain, a structural template is chosen from the Protein Data Bank (PDB) of Brookhaven National Laboratory. The VL domain from the murine monoclonal antibody entry "1KB5" is chosen with 88% sequence identity / 81% similarity and 2.5 Å resolution. For the mAb A0 VH domain, the same mouse monoclonal antibody structure "1KB5" with 90% sequence identity and 91 % similarity is chosen as the main modeling template. The best fit for human consensus framework is found to be of the type human Vkappa1 (hVK1) and human VH1 (hVH1). As an alternative design, a graft to the most stable human consensus domains hVK3 and hVH3 is chosen. For grafting, the mAb A0_VL and mAb A0_VH models are combined with human consensus domain models hVK1, hVK3, hVH1A and hVH3 and combined to produce to Fv-models. Loop grafting is performed by embedding the murine mAb A0 CDR regions into the human antibody frameworks and the DNA molecules of the humanized chain constructs are synthesized.

The respective humanized variable regions are synthesized and cloned into immunoglobulin expression vectors and transiently expressed in the HEK 293 freestyle expression system (Invitrogen), as described in a), in the combinations of heavy and light chain sequences as shown in Table 1, and purified on protein A columns.

Table 1

Sequences of heavy and light variable chains of the chimeric and humanized anti-CD37 antibodies used in the Examples.

Antibody	Heavy Chain SEQ ID NO: aa/DNA	Light Chain SEQ ID NO: aa/DNA
A (=A0)	seq 2/1	seq 4/3
B	seq 6/5	seq 12/11
C	seq 6/5	seq 14/13
D	seq 6/5	seq 16/15
H	seq 8/7	seq 18/17
I	seq 8/7	seq 20/19
J	seq 8/7	seq 22/21
K	seq 10/9	seq 18/17
L	seq 10/9	seq 20/19
M	seq 10/9	seq 22/21

c) Generation of Fc-engineered chimeric and humanized anti-CD37 antibodies

The generation of Fc mutants is performed as described by Lazar et al., 2006. The resulting Fc-engineered heavy chain sequence is introduced into the expression vector pAD-CMV1 (described in EP 393 438) and co-transfected together with a plasmid containing the light chain encoding sequence into CHO-DG44 cells. The antibody is harvested from cell culture media 5 to 7 days after transfection and purified via protein A chromatography, eluted into a citrate buffer then dialyzed in PBS. The protein content of the samples is determined via Protein A HPLC, the endotoxin content is determined via Kinetic-QCL Kinetic Chromogenic Assay

(Lonza). The monomer content of the samples is determined by HP-SEC, all samples used for functional testing show a monomer content of > 95%.

Table 2

Sequences of heavy and light variable chains (columns III and IV) and Fc mutations (coulum II) of the chimeric and humanized anti-CD37 antibodies (antibody A0, B0, C0 etc. is identical with antibody A and B, C etc. in Table 1).

Full-length sequences of heavy and light chains are listed in colums V and VI. (The sequences in column V marked with * refer to the IgG1 sequence of SEQ ID NOs 24 and 23 (wild-type sequences) that have been modified to have the substitution(s) corresponding to column II, and the respective mutation(s) in the coding DNA).

I	II	III	IV	V	VI
Ab	Fc substitution(s) (Kabat numbering)	SEQ ID NO: v heavy chain aa/DNA	SEQ ID NO: v light chain aa/DNA	SEQ ID NO: complete heavy chain aa/DNA	SEQ ID NO: complete light chain aa/DNA
A0	-	seq 2/1	seq 4/3	2/1 fused to 24/23	4/3 fused to 26/25
A1	I332E	seq 2/1	seq 4/3	2/1 fused to 24*/23*	4/3 fused to 26/25
A2	S239D/I332E	seq 2/1	seq 4/3	28/27	30/29
A3	I332E/G236A	seq 2/1	seq 4/3	2/1 fused to 24*/23*	4/3 fused to 26/25
A4	S239D/I332E/G236A	seq 2/1	seq 4/3	32/31	34/33
B0	-	seq 6/5	seq 12/11	6/5 fused to 24/23	12/11 fused to 26/25
B1	I332E	seq 6/5	seq 12/11	6/5 fused to 24*/23*	12/11 fused to 26/25
B2	S239D/I332E	seq 6/5	seq 12/11	36/35	38/37
B3	I332E/G236A	seq 6/5	seq 12/11	6/5 fused to 24*/23*	12/11 fused to 26/25

I	II	III	IV	V	VI
Ab	Fc substitution(s) (Kabat numbering)	SEQ ID NO: v heavy chain aa/DNA	SEQ ID NO: v light chain aa/DNA	SEQ ID NO: complete heavy chain aa/DNA	SEQ ID NO: complete light chain aa/DNA
B4	S239D/I332E/G236A	seq 6/5	seq 12/11	40/39	42/41
C0	-	seq 6/5	seq 14/13	6/5 fused to 24/23	14/13 fused to 26/25
C1	I332E	seq 6/5	seq 14/13	6/5 fused to 24*/23*	14/13 fused to 26/25
C2	S239D/I332E	seq 6/5	seq 14/13	6/5 fused to 24*/23*	14/13 fused to 26/25
C3	I332E/G236A	seq 6/5	seq 14/13	6/5 fused to 24*/23*	14/13 fused to 26/25
C4	S239D/I332E/G236A	seq 6/5	seq 14/13	6/5 fused to 24*/23*	14/13 fused to 26/25
D0	-	seq 6/5	seq 16/15	6/5 fused to 24/23	16/15 fused to 26/25
D1	I332E	seq 6/5	seq 16/15	6/5 fused to 24*/23*	16/15 fused to 26/25
D2	S239D/I332E	seq 6/5	seq 16/15	6/5 fused to 24*/23*	16/15 fused to 26/25
D3	I332E/G236A	seq 6/5	seq 16/15	6/5 fused to 24/*23*	16/15 fused to 26/25
D4	S239D/I332E/G236A	seq 6/5	seq 16/15	6/5 fused to 24/*23*	16/15 fused to 26/25
H0	-	seq 8/7	seq 18/17	8/7 fused to 24/23	18/17 fused to 26/25
H1	I332E	seq 8/7	seq 18/17	8/7 fused to 24*/23*	18/17 fused to 26/25

I	II	III	IV	V	VI
Ab	Fc substitution(s) (Kabat numbering)	SEQ ID NO: v heavy chain aa/DNA	SEQ ID NO: v light chain aa/DNA	SEQ ID NO: complete heavy chain aa/DNA	SEQ ID NO: complete light chain aa/DNA
H2	S239D/I332E	seq 8/7	seq 18/17	8/7 fused to 24*/23*	18/17 fused to 26/25
H3	I332E/G236A	seq 8/7	seq 18/17	8/7 fused to 24*/23*	18/17 fused to 26/25
H4	S239D/I332E/G236A	seq 8/7	seq 18/17	8/7 fused to 24*/23*	18/17 fused to 26/25
I-0	-	seq 8/7	seq 20/19	8/7 fused to 24/23	20/19 fused to 26/25
I-1	I332E	seq 8/7	seq 20/19	8/7 fused to 24*/23*	20/19 fused to 26/25
I-2	S239D/I332E	seq 8/7	seq 20/19	8/7 fused to 24*/23*	20/19 fused to 26/25
I-3	I332E/G236A	seq 8/7	seq 20/19	8/7 fused to 24*/23*	20/19 fused to 26/25
I-4	S239D/I332E/G236A	seq 8/7	seq 20/19	8/7 fused to 24*/23*	20/19 fused to 26/25
J0	-	seq 8/7	seq 22/21	8/7 fused to 24/23	22/21 fused to 26/25
J1	I332E	seq 8/7	seq 22/21	8/7 fused to 24*/23*	22/21 fused to 26/25
J2	S239D/I332E	seq 8/7	seq 22/21	8/7 fused to 24*/23*	22/21 fused to 26/25
J3	I332E/G236A	seq 8/7	seq 22/21	8/7 fused to 24*/23*	22/21 fused to 26/25
J4	S239D/I332E/G236A	seq 8/7	seq 22/21	8/7 fused to 24*/23*	22/21 fused to 26/25

I	II	III	IV	V	VI
Ab	Fc substitution(s) (Kabat numbering)	SEQ ID NO: v heavy chain aa/DNA	SEQ ID NO: v light chain aa/DNA	SEQ ID NO: complete heavy chain aa/DNA	SEQ ID NO: complete light chain aa/DNA
K0	-	seq 10/9	seq 18/17	10/9 fused to 24/23	18/17 fused to 26/25
K1	I332E	seq 10/9	seq 18/17	10/9 fused to 24*/23*	18/17 fused to 26/25
K2	S239D/I332E	seq 10/9	seq 18/17	10/9 fused to 24*/23*	18/17 fused to 26/25
K3	I332E/G236A	seq 10/9	seq 18/17	10/9 fused to 24*/23*	18/17 fused to 26/25
K4	S239D/I332E/G236A	seq 10/9	seq 18/17	10/9 fused to 24*/23*	18/17 fused to 26/25
L0	-	seq 10/9	seq 20/19	10/9 fused to 24/23	20/19 fused to 26/25
L1	I332E	seq 10/9	seq 20/19	10/9 fused to 24*/23*	20/19 fused to 26/25
L2	S239D/I332E	seq 10/9	seq 20/19	10/9 fused to 24*/23*	20/19 fused to 26/25
L3	I332E/G236A	seq 10/9	seq 20/19	10/9 fused to 24*/23*	20/19 fused to 26/25
L4	S239D/I332E/G236A	seq 10/9	seq 20/19	10/9 fused to 24*/23*	20/19 fused to 26/25
M0	-	seq 10/9	seq 22/21	10/9 fused to 24/23	22/21 fused to 26/25
M1	I332E	seq 10/9	seq 22/21	10/9 fused to 24*/23*	22/21 fused to 26/25
M2	S239D/I332E	seq 10/9	seq 22/21	10/9 fused to 24*/23*	22/21 fused to 26/25

I	II	III	IV	V	VI
Ab	Fc substitution(s) (Kabat numbering)	SEQ ID NO: v heavy chain aa/DNA	SEQ ID NO: v light chain aa/DNA	SEQ ID NO: complete heavy chain aa/DNA	SEQ ID NO: complete light chain aa/DNA
M3	I332E/G236A	seq 10/9	seq 22/21	10/9 fused to 24*/23*	22/21 fused to 26/25
M4	S239D/I332E/G236A	seq 10/9	seq 22/21	10/9 fused to 24*/23*	22/21 fused to 26/25

Example 2

Chimeric mAb A0 specifically recognizes the CD37 antigen

The specificity of MAb A0 for cellular CD37 is tested in a FACS competition assay on Ramos Burkitt lymphoma cells (ATCC #CRL-1596). Cells are grown in tissue culture flasks (175 cm^2) using RPMI-1640 + GlutaMAX supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum, 12.5 mM HEPES, 1 mM sodium pyruvat, 1% MEM non-essential amino acids as culture medium. Cells are cultivated with an initial density of $3x10^5$ cells/ml at 37°C and 5% CO_2 in a humidified atmosphere for three days. The cultures are maintained at a cell concentration between $3x10^5$ and $1.8x10^6$/ml by sub-cultivation in a ratio of 1:6 with fresh culture medium 2-3 times a week. For FACS competition analysis, the CD37-specific mAb HH1 (Santa Cruz) directly labeled with phycoerythrin (PE) is used at a concentration of 1 µg/ml. The antibody is preincubated with the unlabelled competitor antibody A0 for 10 min at 4°C at the indicated molar ratio. Thereafter, $1x10^5$ Ramos cells are incubated for 30 min with the antibody mixture on ice. Thereafter, cells are washed twice in phosphate buffered saline (PBS), resuspended in FACS buffer and measured on a BD FACS Canto. Results of such an assay are shown in Figure 1. Addition of a control human IgG1 antibody (Sigma IgG1 kappa) at 20-fold molar excess does not significantly reduce the mean fluorescence intensity (MFI) of Ramos cells. Addition of either unlabelled HH1 antibody or A0 antibody at 20-fold

molar excess almost completely abrogated binding of the directly labeled HH1 antibody. This indicates that A0 and HH1 antibodies recognize identical or similar epitopes on Ramos cells and compete for binding to cellular CD37 antigen.

Example 3

Binding of humanized versions of mAb A0 to cellular CD37 antigen

Humanized versions of A0 are tested for their binding to cellular CD37 antigen by FACS analysis. Antibodies are added to Ramos cells at the indicated concentrations and allowed for binding for 30 min at 4°C. Thereafter, bound antibody is detected with PE-labelled goat-anti-human IgG antibody (Sigma), cells are washed twice with PBS, and thereafter cells are resuspended in FACS buffer and analyzed by FACS on a BD FACS Canto. Examples are shown in Figure 2 and 3 (antibodies A, B, C, D, I or A, H, I, J, K, L and M, respectively; see Table 1). Several of the humanized versions of A0 show similar binding to Ramos cells as the parental antibody A0, indicating that humanization does not reduce binding to cellular CD37 antigen.

Example 4

FACS scatchard analysis of humanized versions of chimeric mAb A0

The affinity of humanized versions of antibody A0 (designated B, C, D, H, I and K; see Table 1) to cellular CD37 antigen is determined by FACS scatchard analysis as described elsewhere (Brockhoff et al., 1994). Briefly, antibody dilutions are prepared in a 96 well plate starting with 100-400 nM in the first well (80 µl), followed by 11 dilution steps (1:2, 40 + 40 µl). 50 µl of mAb dilutions are added to FACS tubes, 150 µl cells ($0{,}8x10^6$/ml=$1{,}2x10^5$ cells/tube) are added to each FACS tube. Cells are gently mixed and incubated for 1 h on ice. Thereafter 50 µl FITC conjugated secondary antibody (conc.15 µg/ml; mouse mAb anti-hu IgG all subclasses, Zymed 05-4211) is added, mixed, and incubated for 30 min on ice. 4 ml PBS ph7.2 containing 0.02% acid are added thereafter, cells are pelleted and resuspended in 300 µl PBS pH 7.2 and subjected to FACS analysis using a BD

FACS Canto. All experimental steps are performed on wet ice, all antibody dilutions are made in PBS/ 0,5%BSA + 0.02% acid. FACS calibration is performed using Quantum FITC MESF (Premix) High Level Beads (Bangs Laboratories). All samples are measured using the same FACS parameters. The ratio of bound IgG versus free IgG is calculated from MFI values at different antibody concentrations and displayed as scatchard blot. Figure 4 shows the MFI/ antibody concentration relationship of several humanized variants of A0. The results show similar binding to Ramos cells of some of the humanized versions as the starting antibody, with dissociation constants (K_d) ranging from 2.15 to 4.90 nanomoles/liter.

Example 5

ADCC activity of humanized versions of the chimeric mAb A0

The ability of humanized versions of A0 (designated B, C, D, H, J, K; see Table 1) to mediate antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC) is assessed using Ramos cells as target cells and IL2-stimulated human PBMCs as effector cells. Ramos cells (Burkitt's lymphoma; ATCC #CRL-1596) were purchased from ATCC. Cells are grown in tissue culture flasks (175 cm^2) using RPMI-1640 + GlutaMAX supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum, 12.5 mM HEPES, 1mM sodium pyruvat, 1% MEM non-essential amino acids as culture medium. Cells are cultivated with an initial density of $3x10^5$ cells/ml at 37°C and 5% CO_2 in a humidified atmosphere for three days. The cultures are maintained at a cell concentration between $3x10^5$ and $1.8x10^6$/ml by sub-cultivation in a ratio of 1:6 with fresh culture medium 2-3 times a week. An aliquot of the cell culture at a cell density between $1.5x10^6$/ml and $1.8x10^6$/ml and growing in the log-phase is centrifuged (200 x g, i.e. 1000 rpm) for 10 min. Cells are washed once with washing medium (RPMI 1640 w/o L-glutamine) and pelleted (200 x g, i.e. 1000 rpm; 10 min). Cell pellet is resuspended in assay medium [1% BSA in RPMI w/o L-glutamine] and cell count is determined. Cell concentration is adjusted to $2x10^5$/ml.

Approximately 50 - 80 ml whole blood drawn from healthy donors is used for the

isolation of PBMC. 10 ml whole blood are diluted 1:3.6 with 26 ml HBSS (Hanks' Balanced Salt Solution w/o calcium and magnesium) in a 50 ml tube. 18 ml diluted whole blood is layered on top of 12 ml Lymphoprep (Nycomed Pharma) in a 50 ml tube and centrifuged at 370 x g (1400rpm) for 35 min. The mononuclear cells from the interface are aspirated and washed first with HBSS (750 x g, i.e. 1900 rpm; 10 min), then a second time with HBSS (300 x g, i.e. 1200 rpm; 10 min) and at last with HBSS (160 x g, i.e. 900 rpm; 10 min). The pelleted cells are gently resuspended in culture medium/assay medium (10% heat-inactivated human AB serum in RPMI 1640 w/o L-glutamine) using a pipette and the cell count is determined in the cell counter. The PBMC concentration is adjusted to $1x10^7$/ml. The freshly isolated PBMC ($5x10^5$/ml) are maintained in culture medium (RPMI 1640 w/o L-glutamine supplemented with 10% human AB serum) in a tissue culture flask (75 cm^2) at 37°C in CO_2 incubator over night. On the following day cells are stimulated with hIL-2 at a final concentration of 1 U/ml for 3 further days. IL-2 stimulated PBMC are separated from cell debris on a Lymphoprep gradient. The purified IL-2 stimulated PBMC are suspended in culture medium/assay medium at a concentration of $1x10^7$/ml.

The co-cultivation of effector cells with target cells in presence of specific or unspecific antibody is performed in duplicates or triplicates in 96-well round-bottom microtiter plates in a final volume of 200 µl assay medium per well consisting of 10% human AB serum and 1% BSA in RPMI in 1:1 ratio. First effector cells (freshly isolated PBMC cells in 100 µl 10% human AB serum in RPMI per well) are plated, followed by target cells and antibody solution diluted in 50 µl 1% BSA in RPMI. As a control, effector cells are cultivated in assay medium alone (effector cell control) and target cells are cultivated either in assay medium alone (spontaneous lysis) or in assay medium supplemented with 1% Triton X-100 (maximal lysis). The co-culture is incubated at 37°C in a humid CO_2 incubator for 3 hours. At the end of the incubation cells are removed from the culture medium by centrifugation (200 x g, i.e. 1000 rpm; 10 min) at room temperature. Cell free supernatants (100 µl/well) are transferred into corresponding wells of a 96-well flat-bottom plate. To determine the LDH activity in these supernatants 100 µl

reaction mixture (freshly mixed 250 µl catalyst with 11.25 ml dye solution) are added to each well and incubated 30 min at room temperature in the dark. Then the absorbance is measured as described below.

Cytotoxicity Detection Kit (LDH; Roche) is used to measure ADCC activity. The detection of cytotoxicity is based on the measurement of LDH enzyme activity released from plasma membrane-damaged cells. LDH released into the culture supernatants reduces the tetrazolium salt from the kit to formazan. The absorption maximum of formazan dye is measured at 490 nm against a reference wavelength of 650 nm in an ELISA plate reader. To calculate percent cell mediated cytotoxicity five controls are performed in each experimental setup.

Background control I (1):	LDH activity contained in the assay medium, which is subtracted from values (3) and (5).
Background control II (2):	LDH activity contained in 1% Triton-X100 in assay medium, which is subtracted from maximal LDH release values (4).
Spontaneous LDH release (3):	LDH activity released from target cells alone.
Maximal LDH release (4):	Maximum releasable LDH activity in the target cells.
Effector cell control (5):	LDH activity released from effector cells only.

To determine the percentage cell mediated cytotoxicity, the average absorbance of the triplicates or duplicates is calculated and the background is subtracted according to the manufacturer's instructions. In Figure 5, the results from an ADCC assay using an E:T ratio of 25:1 and Ramos target cells are shown. Antibodies are added in a concentration of 30 ng/ml. Both the starting mAb and humanized versions thereof display similar ADCC activity against the Ramos cells. In conclusion, humanization of anti-CD37 mAb A does not significantly alter its ADCC inducing capacity.

Example 6

Pro-apoptotic activity of humanized versions of the chimeric mAb A0

The pro-apoptotic activity of mAb A0 (=A) and humanized versions thereof (B, C, D and I; see Table 1) is assessed by measurement of AnnexinV/ PI positive cells after incubation of Ramos cells with mAbs. Ramos cells (Burkitt's lymphoma; ATCC #CRL-1596) are received from ATCC. Cells are grown in tissue culture flasks (175 cm^2) using RPMI-1640 + GlutaMAX supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum, 12.5 mM HEPES, 1mM sodium pyruvat, 1% MEM non-essential amino acids as culture medium. Cells are cultivated with an initial density of $3x10^5$ cells/ml at 37°C and 5% CO_2 in a humidified atmosphere for three days. The cultures are maintained at a cell concentration between $3x10^5$ and $1.8x10^6$/ml by sub-cultivation in a ratio of 1:6 with fresh culture medium 2-3 times a week. An aliquot of the cell culture at a cell density between $1.5x10^6$/ml and $1.8x10^6$/ml and growing in the log-phase is centrifuged (200 x g, i.e. 1000 rpm) for 10 min. Cells are washed once with washing medium (RPMI 1640 w/o L-glutamine) and pelleted (200 x g, i.e. 1000 rpm; 10 min). Cell pellet is resuspended in culture medium and cell count is determined. Cell concentration is adjusted to $1x10^6$/ml. 100 µl cell suspension per well are plated into 96-well round bottom plates. Antibodies are diluted in cell culture medium containing 10% FBS and 100 µl antibody solution are added per well. Cells are incubated for 20 to 24 hrs at 37°C in CO_2 incubator and thereafter stained with Vybrant apoptosis assay kit #2. Alexa Fluor 488 labelled Annexin V and propidium iodide solution are added to the cells and incubated for 15 min in the dark. Thereafter cells are resuspended in 400 µl AnnexinV binding buffer and subjected to FACS analysis using a BD FACS Canto. The percentage of AnnexinV positive/ PI negative cells and AnnexinV/ PI positive cells is determined in two-dimensional dot blots using FL1/ FL2 channels. An isotype matched non-binding antibody (Sigma human IgG1) is used as negative control.

In Figure 6, the pro-apoptotic effect of various humanized versions of mAb A on Ramos cells are shown. Cells are incubated with antibody at 10 µg/ml for 24 hrs,

the total percentage of AnnexinV positive cells (PI positive and PI negative) is displayed. Parental mAb A shows potent pro-apoptotic activity. Surprisingly, humanized versions show a significantly reduced number of AnnexinV positive cells compared to the parental mAb A, indicative for altered pro-apoptotic activity of the humanized antibodies. In conclusion, humanization of MAb A leads to a reduction of its pro-apoptotic activity in this experimental setting.

Example 7

ADCC activity of Fc-engineered versions of chimeric mAb A0

ADCC activity of Fc-engineered versions of mAb A0 (designated A1, A2, A3, A4; see Table 2) is assessed using Ramos cells as target cells. ADCC assay is performed as described above (Example 5). The result of the experiment is shown in Figure 7. Fc-engineered versions of A0 show clearly improved potency and efficacy compared to the parent mAb A0. Certain Fc variants show improvement in maximal lysis of up to 100% compared to the parent mAb and improvement in EC_{50} of up to 10-fold compared to the parent mAb. In conclusion, introduction of specific Fc mutants strongly increases the ADCC activity of chimeric mAb A0.

Example 8

ADCC activity of Fc-engineered versions of mAb B0

ADCC activity of Fc-engineered versions of mAb B0 (designated B1, B2, B3, B4; see Table 2) is assessed using Ramos cells as target cells. ADCC assay is performed as described above (Example 5). Fc-engineered versions of B0 show clearly improved potency and efficacy compared to the parent mAb B0. Certain Fc variants show improvement in maximal lysis of up to 80% compared to the parent mAb and improvement in EC_{50} of up to 20-fold compared to the parent mAb. In conclusion, introduction of specific Fc mutants strongly increases the ADCC activity of humanized mAb B0. The results of the experiments are shown in Figure 8.

Example 9

Pro-apoptotic activity of mAbs A0 and B0

The pro-apoptotic activity of mAbs A0 and B0 on Ramos cells before and after cross-linking with anti-IgG mAb is displayed in Figure 9. The apoptotic assay is performed as described in Example 6, for antibody cross-linking an anti-human IgG antibody (γ-chain specific; Sigma) is added to the antibodies in a ratio of 1:1 and incubated for 15 min at 37°C prior to adding to the target cells. In Figure 9 the CD37-specific mAbs are added at a concentration of 1 μg/ml with and without cross-linking. Chimeric mAb A0 is a potent inducer of apoptosis even without cross-linking, this effect is significantly enhanced after cross-linking of the mAb. Surprisingly, without cross-linking, the humanized mAb B0 is completely devoid of pro-apoptotic activity, however shows potent pro-apoptotic activity after cross-linking with anti-IgG Ab. In conclusion, this experiment shows that pro-apoptotic activity of a humanized version of mAb A0 can be restored after antibody cross-linking.

Example 10

Pro-apoptotic activity of Fc-engineered versions of mAb A0

The pro-apoptotic activity of Fc-engineered versions of chimeric mAb A0 on Ramos cells is assessed by AnnexinV/ PI staining as described in Example 6. Parentl antibody A0 and Fc-engineered variants A2 and A4 are titrated over a concentration range from 0.1 to 10.000 ng/ml. As can be seen in Figure 10, all 3 antibodies show similar pro-apoptotic activity. In conclusion, this experiment shows that Fc-engineering of mAb A0 does not alter its pro-apoptotic activity.

Example 11

a) B cell depleting activity of Fc-engineered antibodies A2 and B2 in a whole blood assay

The efficacy and potency of depletion of normal B cells from human blood is assessed using a whole blood assay. In this assay format, the test antibody is added

to EDTA-treated samples of human blood from healthy individuals and subsequently, after 3 to 4 hrs incubation at 37°C, the number of B cells is quantitatively measured by a 4-color FACS assay. By comparison to buffer or IgG controls, the degree of B cell depletion by the test agent can be calculated. Due to the presence of human IgG levels and effector cells similar to the situation in human beings *in vivo*, this assay type is considered of high relevance for predicting the effect of the test antibodies *in vivo*.

A quantitative FACS assay is used to determine the number of B cells and/ or spiked Ramos cells in blood samples derived from healthy individuals. Quantification is performed using BD Trucount tubes which contain a known number of fluorescent beads which serve as internal standard for quantification of the cell population of interest. B cells are identified by 4-colour analysis using 4 different CD markers (CD3/ CD14/ CD19/ CD45) in combination with FSC/ SSC analysis.

270µl fresh blood per well is incubated in a 48 well plate together with 30µl antibody dilution (in PBS) or PBS (buffer control) in duplicates. Samples are incubated for 4h at 37°C and thereafter immediately placed on ice. 33µl of CD marker master mix is added to Trucount tubes and 50µl of the blood-antibody mixture is added. Samples are vortexed and incubated for 15 min at room temperature. Thereafter 450µl of lysis buffer is added, vortexed, and incubated for additional 15 min at room temperature. Samples are placed on ice and immediately subjected to FACS analysis using a BD FACS Canto™ Flow Cytometer. Evaluation of data is performed using the BD FACSDiva software (Version 5.0.2).

Fc-engineered chimeric and humanized mAbs A2 and B2 show excellent potency on normal B cell depletion with EC_{50} values ranging from 0.15 to 0.35 nM. The degree of normal B cell depletion ranges from 57% to 65%. Rituximab, a registered antibody used for the treatment of B-NHL, is tested in parallel and yields significantly lower depletion of B-cells in this assay format (Figure 11 A).

b) Fc-engineering introduces superior B cell depleting activity of A0 and B0 compared to Rituximab

The effect of mAbs on B cell depletion in human blood derived from healthy individuals is assessed as described in a). The non Fc-engineered mAbs A0 and B0 show B cell depleting activity in the range from 13% to 26%, similar to Rituximab. Fc-engineering results in a dramatic increase of B cell depleting activity for both mAbs, with a mean percentage of depletion of 75%. This clearly demonstrates the superiority of A2 and B2 compared to Rituximab (Figure 11 B).

c) Antibodies A2 and B2 do not deplete T cells and monocytes in whole blood assays

The effect of A2 and B2 on T lymphocytes (CD3-positive) and monocytes (CD14-positive) is assessed in parallel to the effect on B lymphocytes. No significant change of either T cell numbers or monocyte numbers is observed, whereas a significant reduction of the number of B cells is seen (Figure 11C). This indicates that A2 and B2 specifically deplete B cells from human blood.

Example 12

Fc-engineering introduces superior ADCC activity compared to Rituximab

ADCC activity of the Fc-engineered version A2 of mAb A0 is assessed using Ramos cells as target cells. ADCC assay is performed as described above (Example 5). The non Fc-engineered antibody A0 shows a maximal lysis of Ramos target cells which is inferior to Rituximab, an antibody specific for CD20 which is an approved treatment for patients suffering from B cell lymphomas. Surprisingly, Fc-engineering of A0 leads to a clearly improved potency and efficacy of A2 over Rituximab. This indicates, that at similar antigen densities of CD20 and CD37 on Ramos cells the Fc-engineered anti-CD37 mAb A2 shows clearly improved ADCC activity than Rituximab (Figure 12).

Example 13

Lymphoma cell depleting activity of Fc-engineered antibodies A2 and B2 in a whole blood assay

The efficacy and potency of depletion of Ramos cells, a Burkitt's lymphoma derived cell line from human blood is assessed using a whole blood assay as described in Example 11. In a modification of the assay, Ramos tumor cells are spiked in about a tenfold excess compared to endogenous B cells into the whole blood matrix, and their depletion is also monitored by FACS analysis.

Fc-engineered chimeric and humanized mAbs A2 and B2 show good potency on Ramos cell depletion with EC_{50} values ranging from 0.35 to 0.54 nM. The degree of Ramos cell depletion ranges from 36% to 55%. Rituximab, a registered antibody used for the treatment of B-NHL, is tested in parallel and yields significantly lower depletion of Ramos cells in this assay format (Figure 13).

Example 14

In vivo efficacy of Fc-engineered antibodies A2 and B2 in disease-related model

The *in vivo* anti-tumor efficacy of mAbs A2 and B2 is assessed using a Ramos Burkitt's lymphoma model in nude mice. CD37-positive Ramos cells are injected subcutaneously into the flank of the animals and i.v. treatment of the animals started when tumors are established. A twice weekly treatment schedule is chosen (q3/4d), two different doses (8 mg/kg and 25 mg/kg) are tested in parallel. Both mAbs show significant anti-tumor efficacy with T/C values ranging from 0.2% to 26%. No significant difference between the two dose levels and between the two antibodies are observed. However, there is a trend towards better efficacy in the high dose A2 treated animals, with T/C of 0.2% and 5/10 complete tumor regressions. All treatments are well tolerated with no apparent weight loss. In conclusion, mAbs A2 and B2 showed significant anti-tumor efficacy in the Ramos Burkitt's lymphoma model, with maximum activity already obtained at the 8 mg/kg dose level. The activity is comparable to that of rituximab which is tested in parallel. It has to be noted that the *in vivo* activity observed with the

Fc-engineered antibodies A2 and B2 may be underestimated since these mAbs are optimized for interaction with human but not murine effector cells. This optimized interaction, which leads to strongly improved ADCC activity *in vitro* when using human effector cells (Example 8), is not reflected in the mouse model used. However, the data obtained in this experiment (shown in Figure 14) provide *in vivo* proof of concept of CD37 targeting and thus can be used for estimating the therapeutic dose in humans.

Example 15

Correlation of pharmacokinetic and pharmacodynamic effect of A2 and B2 in mice for estimating the therapeutic dose in humans

A correlation between the serum concentrations of A2 and B2 to their pharmacodynamic effect is established in mice using the Ramos tumor xenograft model. These studies demonstrate that a dose of 8 mg/kg A2 and B2 (formulated in a citrate buffer: 25 mM Na-Citrate, 115 mM NaCl, 0.04% Tween 80, pH 6.0) causes significant retardation of tumor growth in this aggressive s.c. (subcutaneous) tumor model using a standard q3 or 4d antibody dosing schedule in mice, thus indicating continued activity throughout the dosing interval. Furthermore, pharmacokinetic data are established for the same dose.

Using this PK/PD association in mice, an estimated human dose can be calculated using published data for the clearance (CL) of humanized antibodies in humans (Lobo et al., 2004).

Full calculation for A2:

- Mean AUC(0-∞) after single dose of 8 mg/kg = 6099 µg·h/mL.
- Given AUC(0-∞) in mice = AUC(ss,τ) in mice, and AUC(ss,τ)/τ = C(ave,ss).
- C(ave,ss) in mice (for τ = 84 hours) = 73 µg/mL, which is presumably equivalent to C(ave,ss) in men (for τ = 168h).
- Since AUC(ss,τ) in men = D/CL, and using the humanized antibody clearance

(CL) range in humans reported by Lobo et al, 2004.: CL = 7 mL/h/70 kg to 15 mL/h/70 kg.

- For 7 mL/h/70 kg: 168 hr x 7 = 1176 mL x 73 µg = 86 mg.
- For 15 mL/h/70 kg: 168 hr x 15 = 2520 mL x 73 µg = 184 mg.

Therefore, for A2, the estimated weekly dose for a 70 kg human is in the range of 86 to 184 mg. Using the same assumptions as described above, the calculated estimated human weekly dose for B2 for a 70 kg human is 189 to 404 mg.

Example 16

Antibodies A2 and B2 show ADCC activity on multiple myeloma cells

The expression of CD37 on a panel of multiple myeloma cell lines is assessed by FACS analysis using antibodies specific for CD37. Cells are either incubated with a directly fluorescently labeled anti-CD37 antibody or an unlabeled CD37-specific antibody followed by a second fluorescently labeled antibody directed against the primary antibody. The fluorescence activity of the labeled cells is measured with a FACS Canto Flow Cytometer (BD Biosciences) and the fluorescence intensity is recorded as MFI using the FACS Diva Software. 6 out of 11 tested multiple myeloma demonstrate cell surface expression of CD37 (Figure 15). One cell line (RPMI 8226) is subsequently tested in an ADCC assay as described in Example 5 using the CD37-specific antibodies A2 and B2. Both antibodies demonstrate potent ADCC activity on RPMI 8226 cells with EC_{50} values in the range of 25 ng/ml and a maximal cell lysis of about 20% (Figure 16). This example demonstrates that CD37-positive multiple myeloma cells are susceptible to ADCC mediated cell lysis using the CD37-specific mAbs A2 and B2.

Figure 15 shows the FACS analysis of six multiple myeloma derived cell lines for CD37 expression. The open curves indicate reactivity with the CD37-specific antibody, the filled curves represent the negative control antibody.

Example 17

Pro-apoptotic activity of antibodies A2 and B2 on patient-derived CLL cells

The pro-apoptotic activity of A2 and B2 is assessed on patient-derived chronic lymphocytic leukemia (CLL) cells. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) are prepared from a patient with diagnosed CLL, after informed consent according to the declaration of Helsinki has been obtained. The primary CLL cells are purified from freshly collected blood according to Ficoll-Paque® plus procedure (StemCell Technologies, Meylan, France) and stored at 4°C in RPMI 1640 culture medium containing 10 % heat inactivated human AB serum (Sigma, France) until use. The culture medium for primary CLL cells is RPMI 1640 supplemented with 2 mM L-glutamine and 10% of heat inactivated human AB serum. For experimental use, primary CLL cells are counted in a hemocytometer and their viability is assessed by 0.25% trypan blue exclusion. The viability of CLL samples is more than 90%. Cells are incubated at 37°C for 24 hours with the antibodies at 30 µg/ml and thereafter the percentage of AnnexinV positive cells is determined as described in Example 6. As shown in Figure 17, Fc-engineered antibodies A2 and B2 show strong pro-apoptotic activity on the primary CLL cells with about 90% (A2) and 40% (B2) AnnexinV positive cells. Both mAbs are clearly superior to rituximab, a B cell-specific antibody approved for the treatment of B-NHL. Mab A2 demonstrates also clearly superior activity compared to alemtuzumab, an antibody approved for the treatment of B-CLL.

Example 18

Generation of a transgenic mouse model in which the endogenous CD37 gene is replaced by its human homologue

A targeting vector is constructed which contains the coding sequence of human CD37 (BAC (bacterial artificial chromosome) IDs: RP11-433N13, RP11-50I11) flanked by non-translated sequences. This targeting vector (which contains, in addition, loxP sites flanking exons 3 – 4 and the neo selection marker flanked by frt sites) is then used for homologous recombination, using mouse ES cells and

standard technology to replace exons 1 – 8 of the mouse genomic sequence with the human counterpart sequences, To this end, the C57BL/6N ES cell line is grown on a mitotically inactivated feeder layer comprised of mouse embryonic fibroblasts (MEF) in DMEM High Glucose medium containing 20% FBS (PAN) and 1200 u/mL Leukemia Inhibitory Factor (Millipore ESG 1107). $1x10^7$ cells and 30 g of linearized DNA vector are electroporated (Biorad Gene Pulser) at 240 V and 500 F. G418 selection (200 g/mL) started on d2. Counterselection with Gancyclovir (2 M) starts on d5 after electroporation. ES clones are isolated on d8 and analyzed by Southern Blotting according to standard procedures, e.g. by the use of radiolabelled DNA probes specific for the target gene after expansion and freezing of clones in liquid nitrogen. Transgenic animals are then generated by standard procedures known in the art, e.g. by blastocyst injection and subsequent generation of chimeric animals. Animals heterozygous and homozygous for human CD37 are obtained by conventional breeding of chimeric and heterozygous animals, respectively. The successful knock-out of the murine CD37 gene and the knock-in of the human CD37 gene is monitored at the protein level using standard procedures, e.g. FACS analysis of peripheral blood lymphocytes or immunohistochemical analysis of tissue sections.

Example 19

Generation of surrogate antibodies

Monoclonal antibodies specific for macaque CD37 are generated by genetic immunization of mice and rabbits using the complete coding sequence of the macaque CD37 antigen (Acc. No. ENSMMUT00000020744). Specific antibodies are selected using recombinant HEK293 or CHO cells expressing the macaque CD37 antigen, e.g. by standard ELISA or FACS techniques. The variable heavy and light chain coding sequences of these antibodies are retrieved by PCR cloning and used for generation of chimeric antibodies (as described in Example 1) which harbor the VH and VL region derived from the murine or rabbit starting antibody and an Fc portion identical to that of an antibody of the invention, e.g. A2 or B2. The binding and functional properties can be investigated by the use of assay

systems which utilize macaque CD37 expressing cells as target cells, e.g. for binding, FACS, Scatchard analysis, ADCC and apoptosis assays. Ultimately, the surrogate antibody is selected by virtue of its B cell depleting activity in Cynomolgus monkey blood *in vitro*.

Example 20
Preparation of clones for producing the antibodies

In order to prepare clones for producing antibodies of the invention, e.g. antibodies A2, A4, B2 or B4, the DNA molecule encoding the complete heavy chain, e.g. with the sequence shown in SEQ ID NO: 27, 31, 35 or 39, respectively, is inserted into the eukaryotic expression vector designated pBI-26, encoding in addition the selection marker dihydrofolate reductase from hamster.

The DNA molecule encoding the complete light chain, depicted in SEQ ID NO: 29, 33, 37 and 41, respectively, is inserted into the eukaryotic expression vector designated pBI-49, encoding in addition the selection marker neomycin phosphotransferase. The DNA sequences of the entire heavy and light chains are sequenced completely.

The hamster cell line CHO-DG44, grown in suspension in chemically defined media, is co-transfected with the eukaryotic expression vectors for the heavy and for the light chain of the antibodies, as described above. Transfected cells are selected in medium without hypoxanthine and thymidine and in the presence of the antibiotic G418. Subsequently, cells are subjected to stepwise selection and amplification using increasing concentrations of methotrexate (MTX). From the 800 nM MTX amplification step, a single cell clone is selected based on growth performance and antibody production in spinner runs, and is cryopreserved in a Safety Cell Bank (SCB).

References

American Cancer Society (Cancer Facts & Figures 2005).

Baker and Jones, Curr Opinion in Drug Discovery & Development, 10, 219-227, 2007.

Barbas, et al., Proc. Nat. Acad. Sci, USA 91:3809-3813, 1994.

Barrena et al., Leukemia 19: 1376-1383, 2005.

Belov et al., Cancer Research 61: 4483-4489, 2001.

Boulianne G. L., Hozumi N. and Shulman, M .J., Production of functional chimeric mouse/human antibody. Nature 312: 643, 1984.

Brockhoff G, Hofstaedter F, Knuechel R., Cytometry 1994, 17(1):75-83.

Buchsbaum et al., Cancer Research 52: 6476-6481, 1992.

Chothia and Lesk., J. Mol. Biol. 196: 901-917, 1987.

Coiffier B, et al. Rituximab (anti-CD20 monoclonal antibody) for the treatment of patients with relapsing or refractory aggressive lymphoma: a multicenter phase II study. Blood 1998; 92: 1927-1932.

Coiffier, JCO, 23, 6387-93, 2005.

Edelman et al. Proc Natl Acad Sci USA 63: 78-85, 1969.

Feugier P, et al. Long-term results of the R-CHOP study in the treatment of elderly patients with diffuse large B-cell lymphoma: a study by the Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte. J Clin Oncol 2005; 23: 4117-4126.

Foran JM, et al. European phase II study of rituximab (chimeric anti-CD20 monoclonal antibody) for patients with newly diagnosed mantle-cell lymphoma and previously treated mantle-cell lymphoma, immunocytoma, and small B-cell lymphocytic lymphoma. J Clin Oncol 2000; 18: 317-324.

Forstpointner R, et al. The addition of rituximab to a combination of fludarabine, cyclophosphamide, mitoxantrone (FCM) significantly increases the response rate and prolongs survival as compared with FCM alone in patients with relapsed and refractory follicular and mantle cell lymphomas: results of a prospective randomized study of the German Low-Grade Lymphoma Study Group. Blood, 2004; 104: 3064-3071.

Francisco et al., Blood, 2003 Aug 15;102(4):1458-65.

Frank, et al., Methods Enzymol. 154: 221-249, 1987.

Gait, M.J., Oligonucleotide Synthesis. A Practical Approach. IRL Press, Oxford, UK (1984).

Goldenberg DM and Sharkey RM, Oncogene (2007) 26, 3734–3744. Novel radiolabeled antibody conjugates.

Hainsworth JD. Prolonging remission with rituximab maintenance therapy. Semin Oncol 2004; 31: 17-21.

Hawkins et al., J. Mol. Biol. 254:889-896, 1992.

Hayden and Mandecki. Gene synthesis by serial cloning of oligonucleotides. DNA 7(8): 571-7, 1988.

Hertz T, Yanover C: PepDist: A new framework for protein-peptide binding prediction based on learning peptide distance functions. BMC Bioinform (2006) 7 (Suppl 1):S3-S17.

Hiddemann W, et al. Frontline therapy with rituximab added to the combination of cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone (CHOP) significantly improves the outcome for patients with advanced-stage follicular lymphoma compared with therapy with CHOP alone: results of a prospective randomized study of the German Low-Grade Lymphoma Study. Group. Blood 2005; 106: 3725-3732 (2005a).

Hiddemann W, et al. Treatment strategies in follicular lymphomas: current status and future perspectives. J Clin Oncol 2005b: 23; 6394-6399.

Howard OM, et al. Rituximab and CHOP induction therapy for newly diagnosed mantle-cell lymphoma: molecular complete responses are not predictive of progression-free survival. J Clin Oncol 2002; 20: 1288-1294.

Ichimura et al., J. Antibiot. (Tokyo), 44, 1045-53, 1991.

Jackson et al., 1995, J. Immunol. 154(7):3310-9.

Johnson S, Bird R E. Construction of single-chain derivatives of monoclonal antibodies and their production in Escherichia coli. Methods Enzymol. 203: 88-98, 1991.

Jones TD, Hanlon M, Smith BJ, Heise CT, Nayee PD, Sanders DA, Hamilton A, Sweet C, Unitt E, Alexander G, Lo KM et al: The development of a modified human IFN-α2b linked to the Fc portion of human IgG1 as a novel potential therapeutic for the treatment of hepatitis C virus infection. J Interferon Cytokine Res (2004) 24(9):560-572.

Jones TD, Phillips WJ, Smith BJ, Bamford CA, Nayee PD, Baglin TP, Gaston JS, Baker MP: Identification and removal of a promiscuous CD4+ T cell epitope from the C1 domain of Factor VIII. J Thromb Haemost (2005) 3(5): 991-1000.

Kabat E. A., Wu T. T., Perry H. M., Gottesman K. S. and Foeller C. Sequences of Proteins of Immunological Interest (5th Ed.). NIH Publication No. 91-3242. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD 1991.

Kahl B, et al. Maintenance rituximab following induction chemoimmunotherapy may prolong progression-free survival in mantle cell lymphoma: a pilot study from the Wisconsin Oncology Network. Ann Oncol, 2006; 17: 1418-1423.

Kaminski et al., JCO 10: 1696-1711, 1992.

Kipriyanow and Le Gall, Molecular Biotechnology 26: 39- 60, 2004.

Knobeloch et al., MolCellBiol 20: 5363-5369, 2000.

van der Kolk LE, Baars JW, Prins MH, van Oers MH. Rituximab treatment results in impaired secondary humoral immune responsiveness. Blood, 2002, Sept 15;100(6):2257-9.

McLaughlin P, et al. Rituximab chimeric anti-CD20 monoclonal antibody therapy for relapsed indolent lymphoma: half of patients respond to a four-dose treatment program. J Clin Oncol 1998; 16: 2825-2833.

Lazar et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 2006 Mar 14;103(11):4005-10, 2006.

Ling and MacLennan, pp. 302-335 in Leucocyte Typing III. White Cell Differentiation Antigens, Oxford University Press, 1987.

Link et al., Journal Immunol 137: 3013-3018, 1986.

Lobo et al., J Pharm Sci 2004;93(11):2645-2668.

Lowman et al., Biochemistry 30(45): 10832-10837, 1991.

Marks et al., Biotechnology 10:779-783, 1992.

Moldenhauer G., et al., 1987. Biochemical characterization and epitope analysis of B lymphocyte-specific surface antigens defined by clustering workshop monoclonal antibodies. In Leukocyte Typing 111. A. McMichael. ed. Oxford University Press, Oxford. p. 378.

Moldenhauer G.: CD37. J. Biol Regul Homeost Agents 2000; 14: 281-83.

Press et al., JCO 7, 1989.

Press OW, et al. Radiolabeled-antibody therapy of B-cell lymphoma with autologous bone marrow support. N Engl J Med 1993; 329: 1219-1224.

Reche PA, Glutting JP, Zhang H, Reinherz EL: Enhancement to the RANKPEP resource for the prediction of peptide binding to MHC molecules using profiles. Immunogenetics (2004), 56(6):405-419.

Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21st edition, Hendrickson R. Ed.

Romaguera JE, et al. High rate of durable remissions after treatment of newly diagnosed aggressive mantle-cell lymphoma with rituximab plus hyper-CVAD alternating with rituximab plus high-dose methotrexate and cytarabine. J Clin Oncol, 2005; 23: 7013-7023.

Sasse et al., J. Antibiot. (Tokyo), 53, 879-85, 2000.

Shier et al., 1995, Gene 169:147-155.

Schwartz-Albiez et al, Journal Immunol 140: 905-914, 1988.

Stemmer et al. Single-step assembly of a gene and entire plasmid from large numbers of oligodeoxyribonucleotides, Gene 164(1): 49-53, 1995.

van Spriel et al., Journal Immunol 172: 2953-2961, 2004.

Suzawa et al., Bioorg. Med. Chem., 8, 2175-84, 2000.

Tangri S, Mothe BR, Eisenbraun J, Sidney J, Southwood S, Briggs K, Zinckgraf J, Bilsel P, Newman M, Chesnut R, LiCalsi C, Sette A: Rationally engineered therapeutic proteins with reduced immunogenicity. J Immunol (2005) 174(6):3187-3196.

Thomas DA, et al. Chemoimmunotherapy with hyper-CVAD plus rituximab for the treatment of adult Burkitt and Burkitt-type lymphoma or acute lymphoblastic leukemia. Cancer 2006; 106: 1569-1580.

Ye et al. Gene synthesis and expression in E. coli for pump, a human matrix metalloproteinase. Biochem Biophys Res Commun 186(1):143-9, 1992.

Yelton et al., 1995, Immunol. 155:1994-2004.

Zhao et al., Blood 104: Abstract 2515, 2004.

Zhao XB, Lapalombella R, Joshi T, Cheney C, Gowda A, Hayden-Ledbetter MS, Baum PR, Lin TS, Jarjoura D, Lehman A, Kussewitt D, Lee RJ, Caligiuri MA, Tridandapani S, Muthusamy N, Byrd JC. Targeting CD37+ lymphoid malignancies with a novel engineered small modular immunopharmaceutical 2007; BLOOD, 1 OCTOBER 2007, VOLUME 110, NUMBER 7 (Epub ahead of print . Blood. 2007 Apr 17)

Claims

1) An antibody molecule that binds to human CD37 and that is derived from
   a) a murine monoclonal antibody that is defined by
      i) a variable heavy chain comprising the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 2; and
      ii) a variable light chain comprising the amino acid sequence shown in SEQ ID NO:4, or from
   b) a non-human antibody recognizing the same epitope of human CD37 as the antibody defined in a) or recognizing an epitope that is close to or overlaps with said epitope;

   wherein said antibody molecule is a chimeric or a humanized antibody.

2) An antibody molecule of claim 1 that is a chimeric antibody defined by
   i) a variable heavy chain comprising the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 2;
   ii) a variable light chain comprising the amino acid sequence shown in SEQ ID NO:4,
   iii) constant heavy and light chains that are of human origin.

3) An antibody of claim 2, wherein
   i) the constant heavy chain is a IgG1 chain, and
   ii) the constant light chain is a kappa chain.

4) An antibody of claim 3, wherein said constant heavy chain i) comprises the amino acid sequence shown in SEQ ID NO:24 and wherein said constant light chain ii) comprises the amino acid sequence shown in SEQ ID NO:26.

5) An antibody of claim 1 that is a humanized antibody defined by

a) CDRs contained within the variable heavy chain as shown in SEQ ID NO:2,

b) CDRs contained within the variable light chain as shown in SEQ ID NO:4,

c) frameworks supporting said CDRs that are derived from a human antibody,

d) constant heavy and light chains that are from a human antibody.

6) An antibody of claim 5 comprising a variable heavy chain with a sequence shown in SEQ ID NO:6.

7) An antibody of claim 6 comprising a variable light chain with a sequence shown in SEQ ID NO:12, 14, 16, 18, 20 or 22.

8) An antibody of claim 5 comprising a variable heavy chain with a sequence shown in SEQ ID NO:8.

9) An antibody of claim 8 comprising a variable light chain with a sequence shown in SEQ ID NO:12, 14, 16, 18, 20 or 22.

10) An antibody of claim 5 comprising a variable heavy chain with a sequence shown in SEQ ID NO:10.

11) An antibody of claim 10 comprising a variable light chain with a sequence shown in SEQ ID NO:12, 14, 16, 18, 20 or 22.

12) An antibody of any one of claims 1 to 11, wherein said antibody has one or more mutations in the Fc domain that modulate one or more effector functions.

13) An antibody of claim 12, wherein said modulation of effector function is an increase in antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity.

14) An antibody of claims 12 and 13, wherein said one or more mutations in the Fc domain is a single substitution at position 332, numbered according to the Kabat EU numbering index.

15) An antibody of claims 12 and 13, wherein said one or more mutations in the Fc domain is a combination of substitutions at positions 239 and 332, numbered according to the Kabat EU numbering index.

16) An antibody of claims 12 and 13, wherein said one or more mutations in the Fc domain is a combination of substitutions at positions 236 and 332, numbered according to the Kabat EU numbering index.

17) An antibody of claims 12 and 13, wherein said one or more mutations in the Fc domain is a combination of substitutions at positions 236, 239 and 332, numbered according to the Kabat EU numbering index.

18) An antibody of any one of claims 14 to 17, wherein said substitutions are I332E, S239D and G236A.

19) An antibody that binds to human CD37 and has a heavy chain comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:28.

20) The antibody of claim 19, which has a light chain comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:30.

21) An antibody that binds to human CD37 and has a heavy chain comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:36.

22) The antibody of claim 21, which has a light chain comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:38.

23) An antibody that binds to human CD37 and has a heavy chain comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:32.

24) The antibody of claim 23, which has a light chain comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:34.

25) An antibody that binds to human CD37 and has a heavy chain comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:40.

26) The antibody of claim 25, which has a light chain comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:42.

27) A DNA molecule comprising a region encoding the variable heavy chain of an antibody of any one of claims 1 to 26.

28) The DNA molecule of claim 27, wherein said variable heavy chain encoding region is fused to a region encoding a constant heavy chain of human origin.

29) The DNA molecule of claim 28, wherein said human constant heavy chain is IgG1.

30) The DNA molecule of claim 29, wherein said IgG1 is encoded by a sequence shown in SEQ ID NO:23.

31) The DNA molecule of any one of claims 28 to 30, wherein said human constant heavy chain has one or more substitutions in the Fc region as defined in any one of claims 14 to 18.

32) A DNA molecule comprising a region encoding the variable light chain of an antibody of any one of claims 1 to 26.

33) The DNA molecule of claim 32, wherein said variable light chain encoding region is fused to a region encoding a constant light chain of human origin.

34) The DNA molecule of claim 33, wherein said constant light chain is a kappa chain.

35) The DNA molecule of claim 34, wherein said kappa light chain is encoded by a sequence shown in SEQ ID NO:25.

36) An expression vector comprising a DNA molecule of any one of claims 27 to 31 and/or a DNA molecule of any one of claims 32 to 35.

37) A host cell carrying one or more vectors of claim 36.

38) A host cell of claim 37 carrying an expression vector comprising a DNA molecule of any one of claims 27 to 31, and a second expression vector comprising a DNA molecule of any one of claims 32 to 35.

39) The host cell of claim 37, which is a mammalian cell.

40) A method for producing an antibody of any one of claims 1 to 26, comprising transfecting a mammalian host cell with one or more vectors of claim 36, culturing the host cell and recovering and purifying the antibody molecule.

41) A pharmaceutical composition comprising, as the active ingredient, one or more anti-CD37 antibody molecules of any one of claims 1 to 26, and a pharmaceutically acceptable carrier.

42) The pharmaceutical composition of claim 41, further comprising one or more additional therapeutic agents.

43) The pharmaceutical composition of claim 42, wherein said one or more additional therapeutic agents are selected from agents that target a B cell antigen other than CD37.

44) The pharmaceutical composition of claim 43, wherein said B cell antigen is CD20.

45) The pharmaceutical composition of claim 42, wherein said one or more additional therapeutic agents are selected from agents that induce apoptosis.

46) The pharmaceutical composition of claim 45, wherein said agent is a modulator of a TRAIL receptor.

47) The pharmaceutical composition of any one of claims 41 to 46 for depleting B cells that express CD37 on their surface.

48) The pharmaceutical composition of claim 47 for the treatment of B cell malignancies.

49) The pharmaceutical composition of claim 48, wherein said B cell malignancy is selected from B cell non-Hodgkins lymphoma, B cell chronic lymphocytic leukemia and multiple myeloma.

50) The pharmaceutical composition of claim 47 for the treatment of autoimmune or inflammatory diseases that involve B cells in their pathology.

51) The method of depleting CD37 expressing B cells from a population of cells, comprising administering to said population of cells an antibody molecule of any one of claims 1 to 26 or a pharmaceutical composition containing such antibody molecule.

52) The method of claim 51, which is carried out *in vitro*.

53) A method for treating a patient suffering from a B cell malignancy selected from B cell non-Hodgkins lymphoma, B cell chronic lymphocytic leukemia and multiple myeloma, comprising administering to said patient an effective amount of a pharmaceutical composition of any one of claims 41 to 46.

1/19

Fig. 1

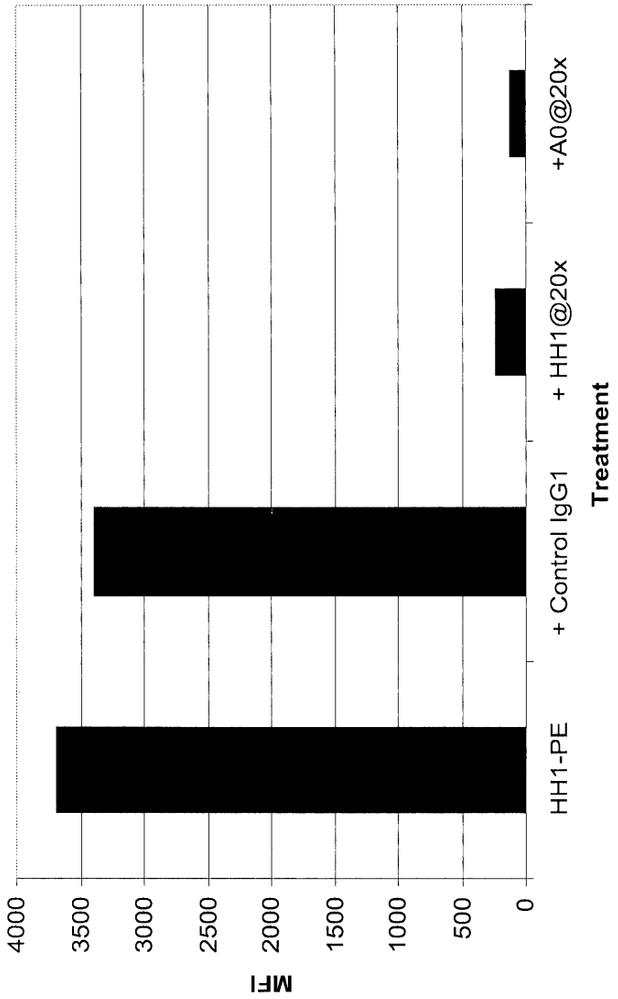

MFI
4000
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
HH1-PE
+ Control IgG1
+ HH1@20x
+A0@20x
Treatment

Fig. 2

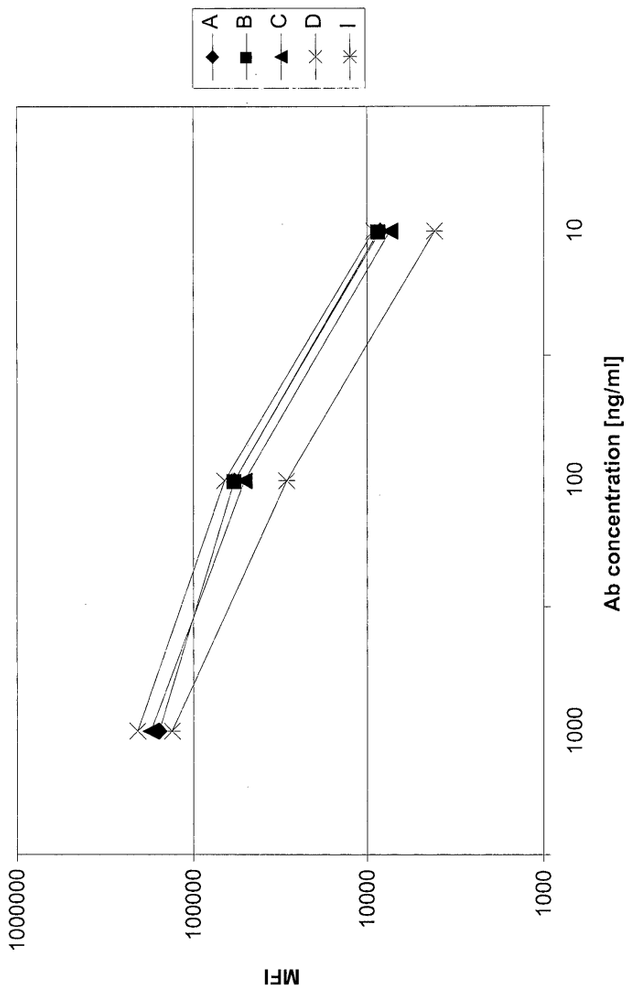
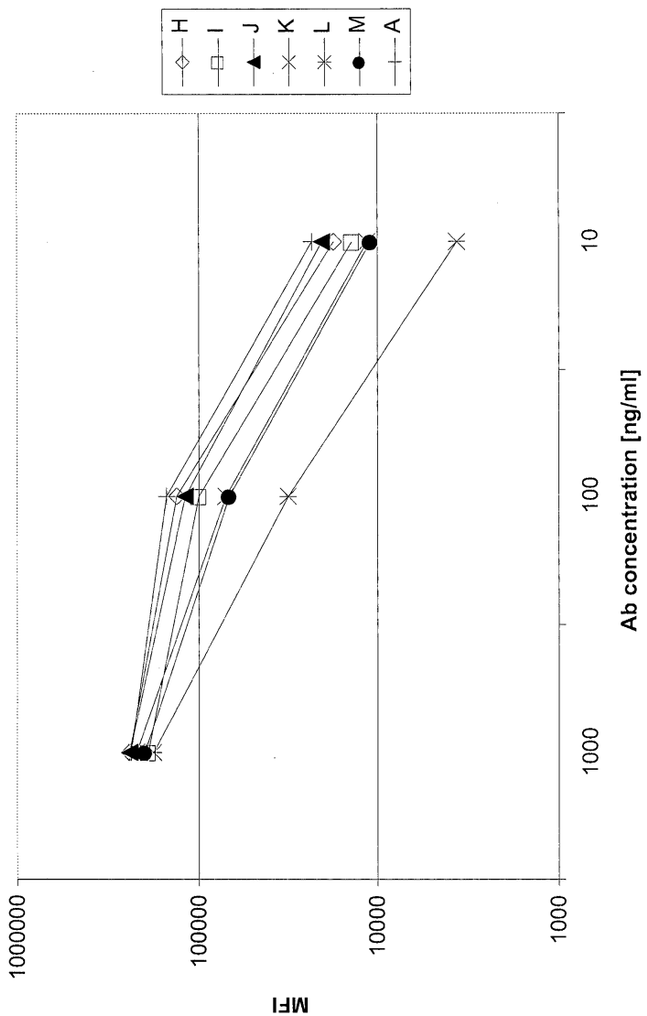
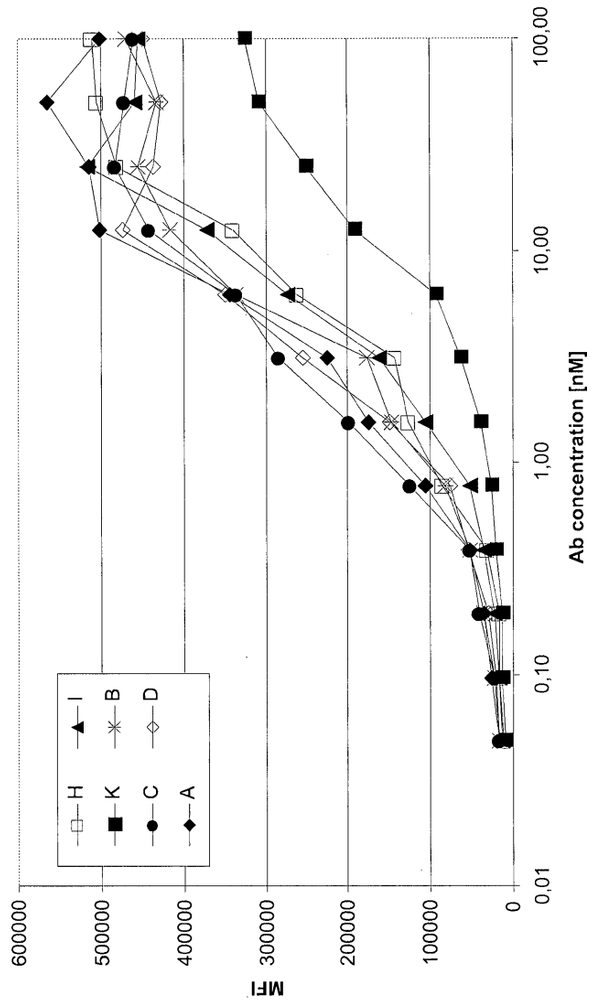

A
B
C
D
I
MFI
1000000
100000
10000
1000
Ab concentration [ng/ml]
10
100
1000

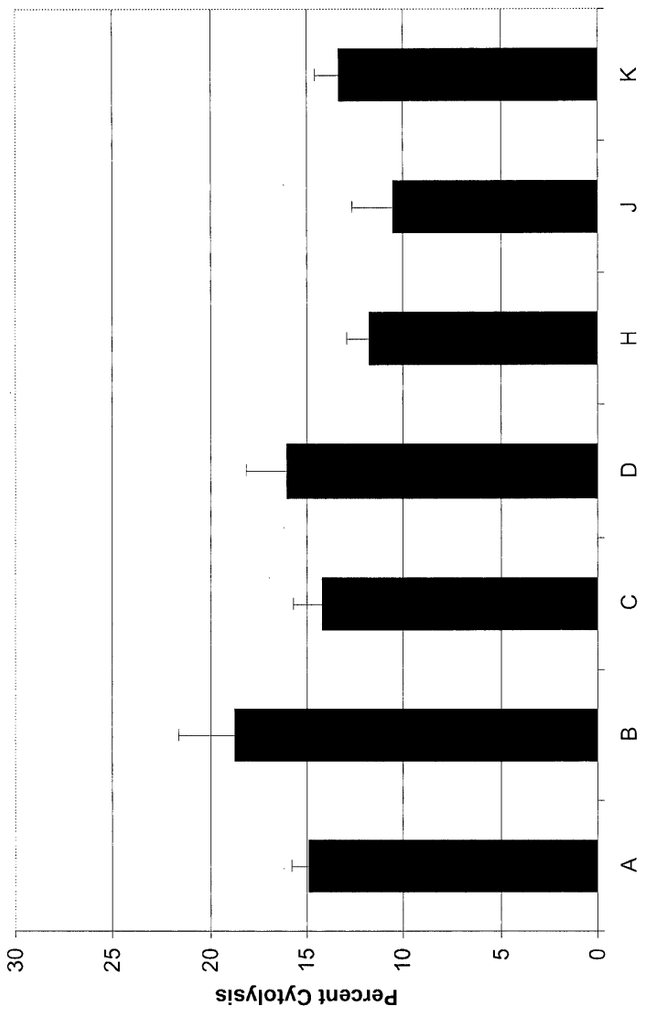
Fig. 3


H
I
J
K
L
M
A
1000000
100000
10000
1000
MFI
10
100
1000
Ab concentration [ng/ml]

4/19
Fig. 4


MFI
600000
500000
400000
300000
200000
100000
0
0,01
0,10
1,00
10,00
100,00
Ab concentration [nM]
H
K
C
A
I
B
D

5/19
Fig. 5



6/19
Fig. 6

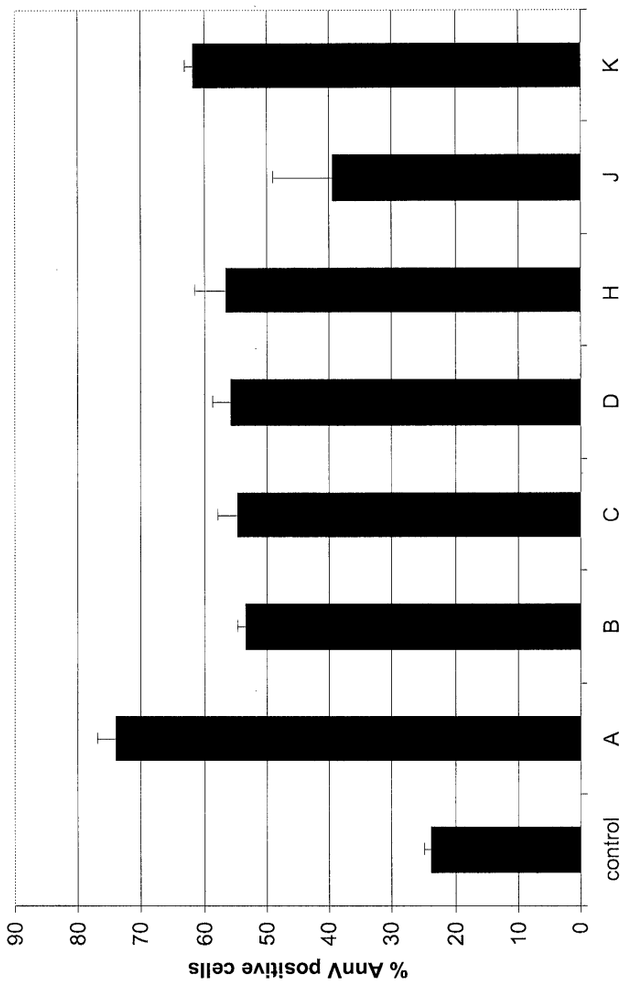
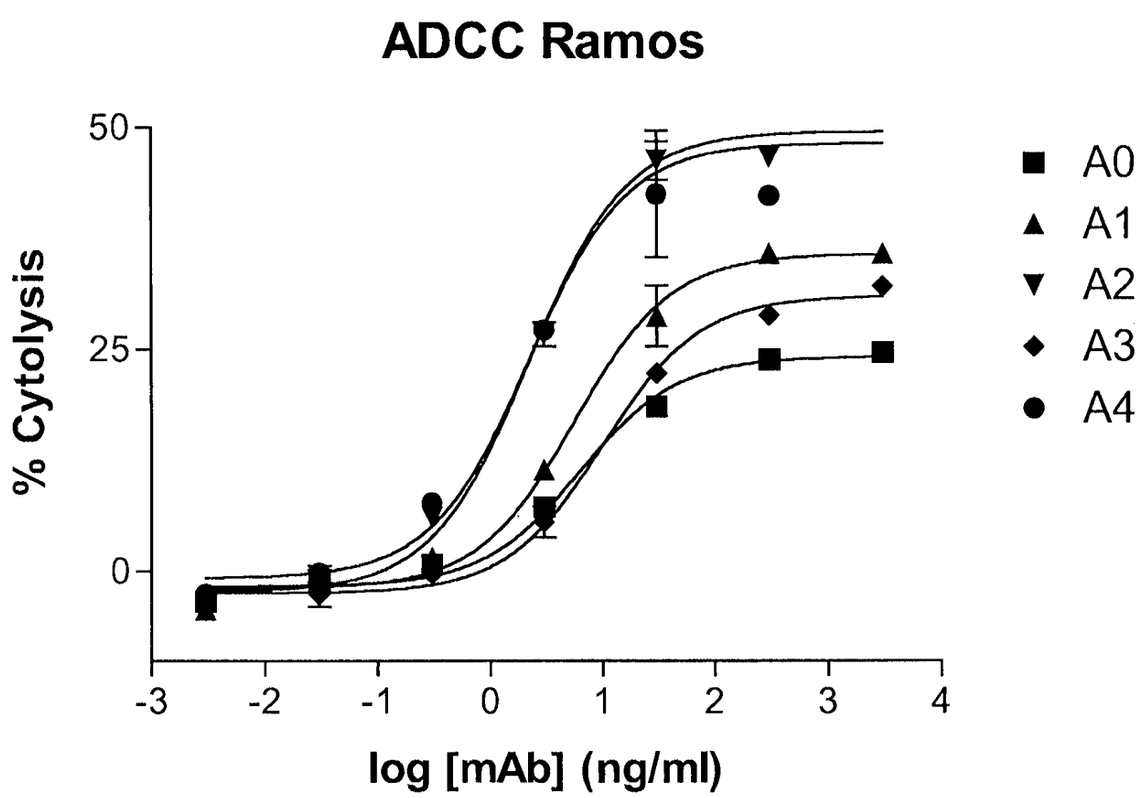
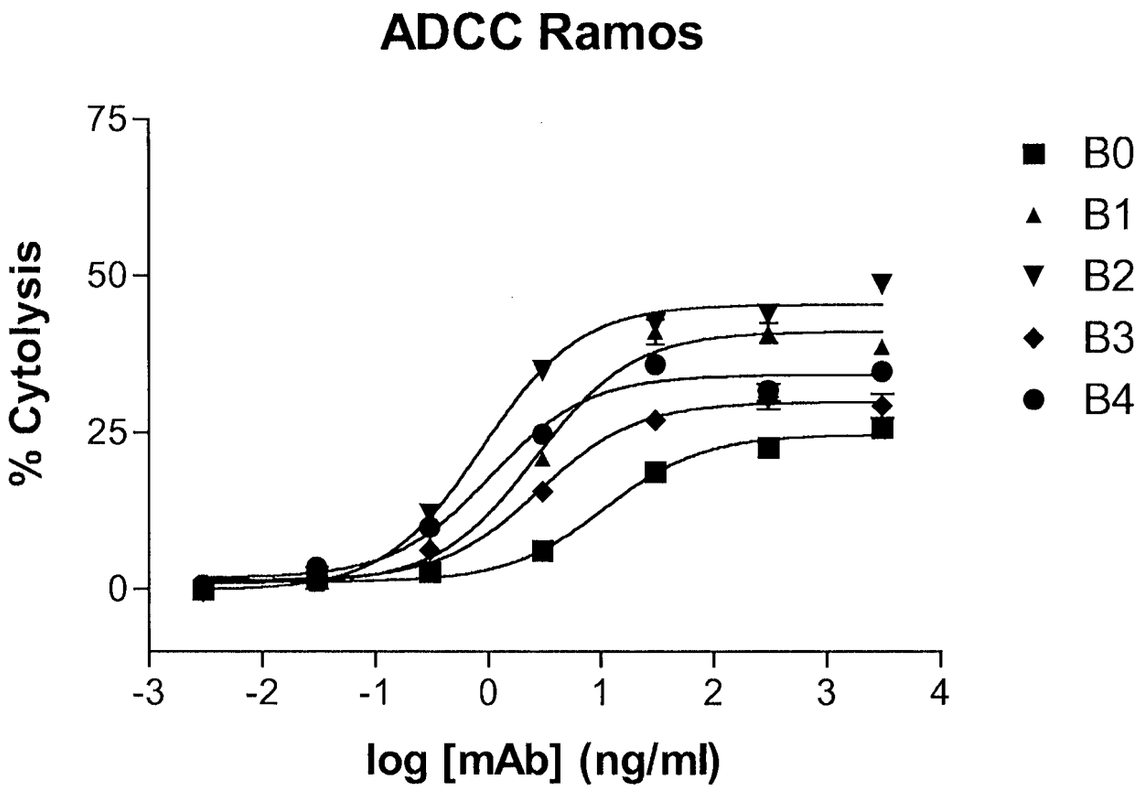

% AnnV positive cells
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
control
A
B
C
D
H
J
K

Fig. 7


ADCC Ramos
% Cytolysis
50
25
0
-3
-2
-1
0
1
2
3
4
log [mAb] (ng/ml)
A0
A1
A2
A3
A4

8/19
Fig. 8


ADCC Ramos
% Cytolysis
75
50
25
0
-3
-2
-1
0
1
2
3
4
log [mAb] (ng/ml)
B0
B1
B2
B3
B4

9/19
Fig. 9

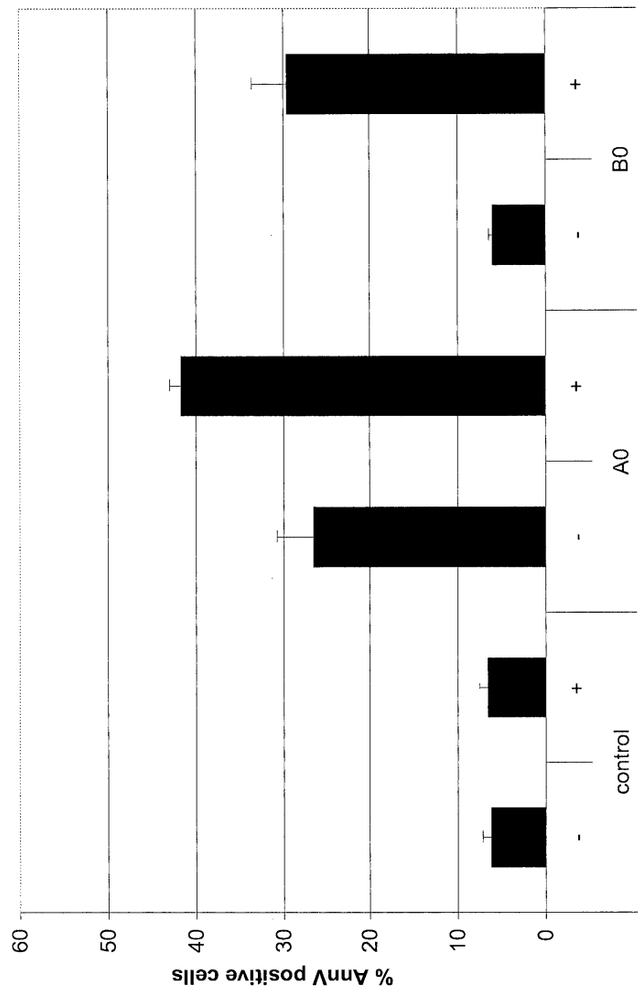
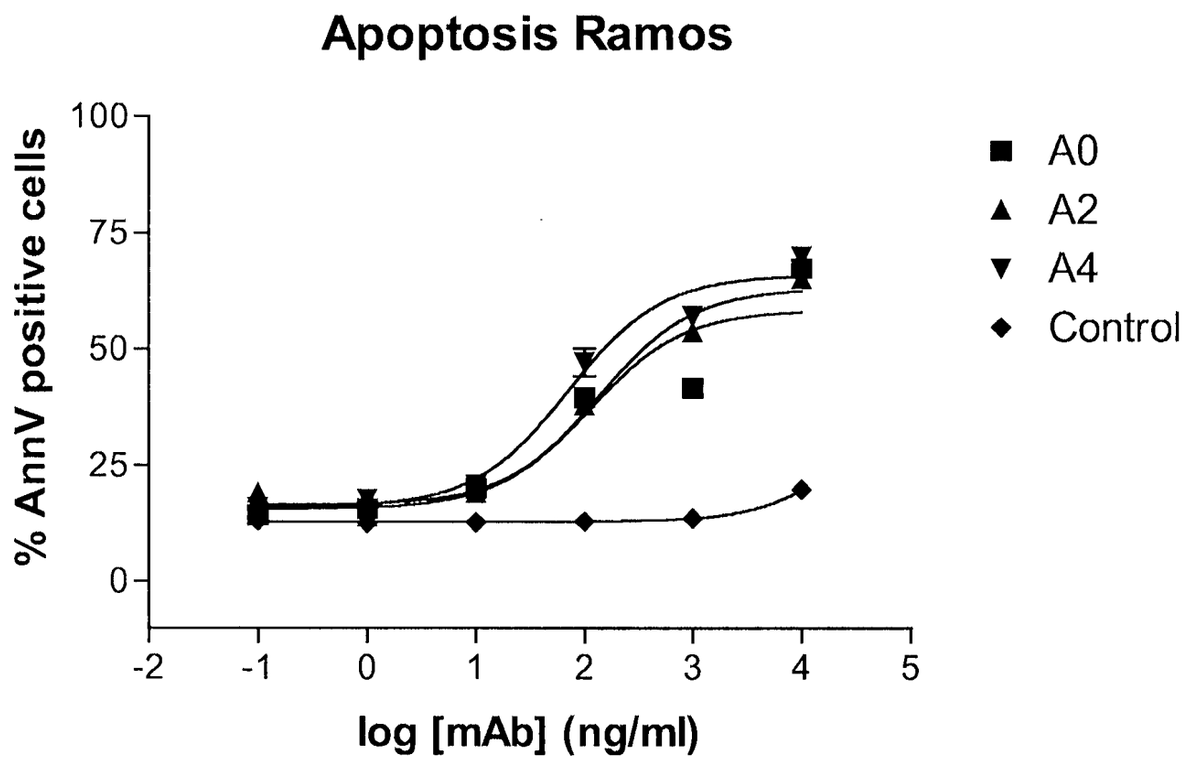
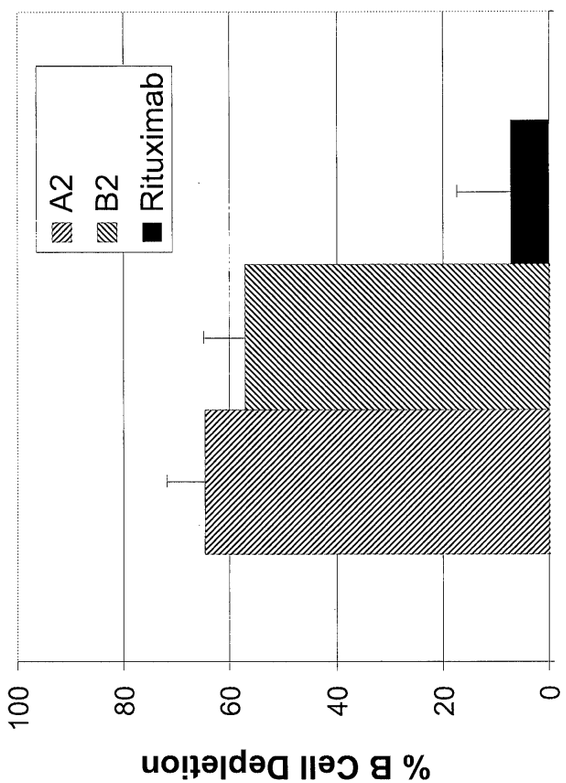


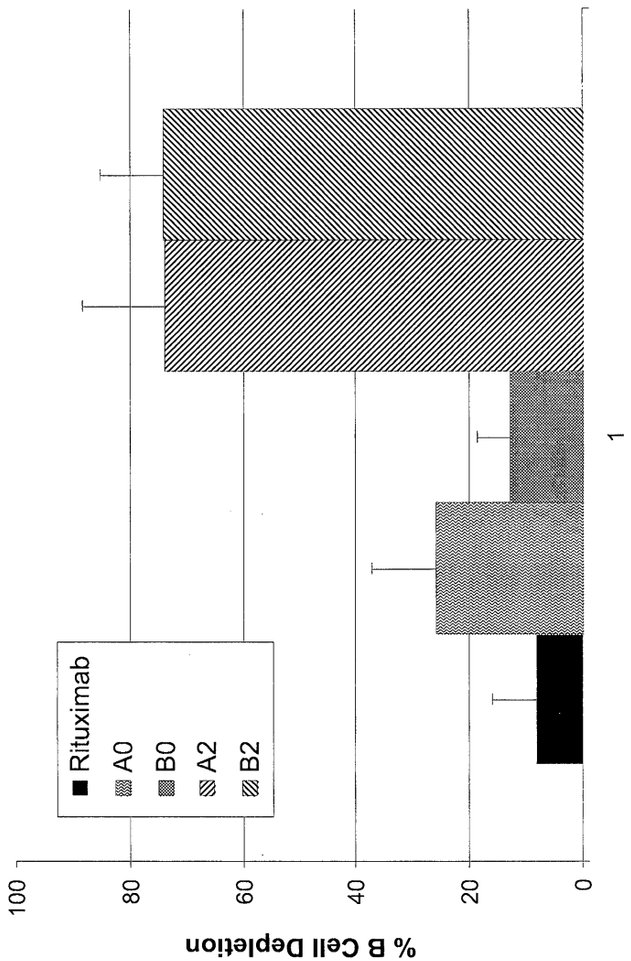
Fig. 10


Apoptosis Ramos
% AnnV positive cells
100
75
50
25
0
-2
-1
0
1
2
3
4
5
log [mAb] (ng/ml)
A0
A2
A4
Control

11/19
Fig. 11A



12/19
Fig. 11B



13/19
Fig. 11C

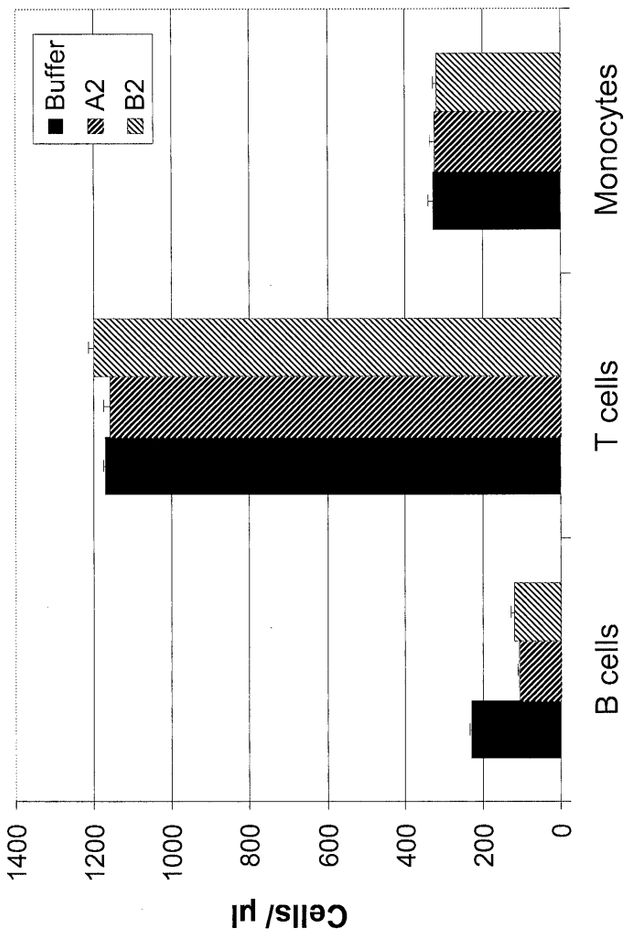
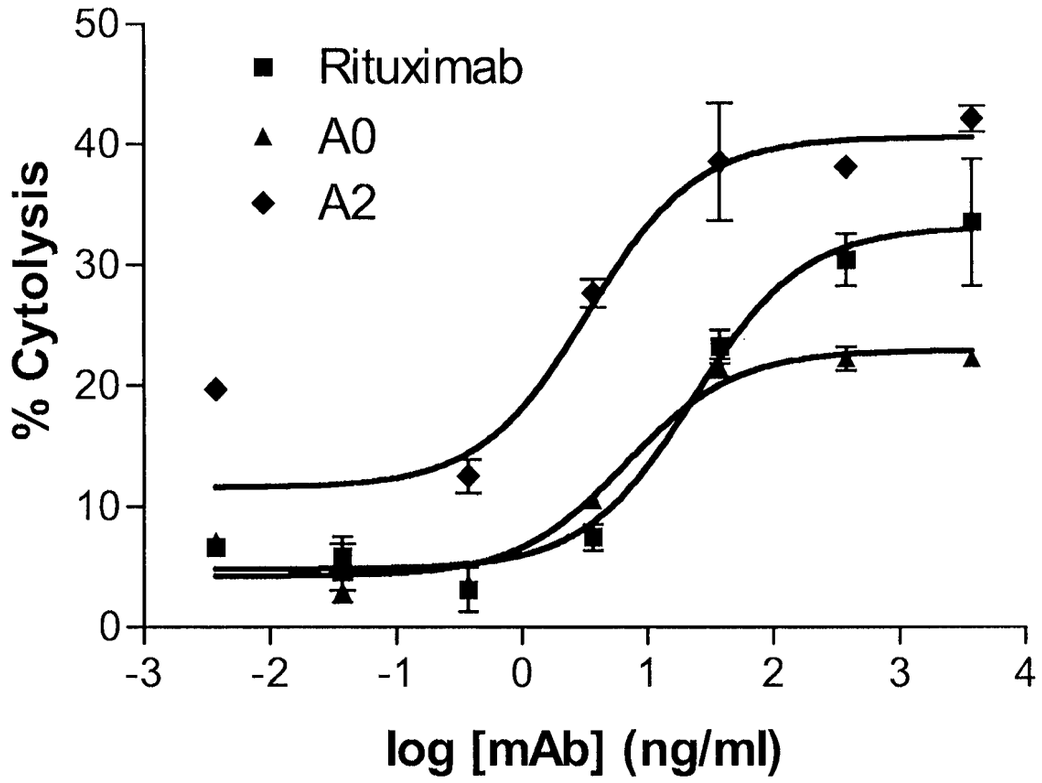

Buffer
A2
B2
Monocytes
T cells
B cells
Cells/ µl
1400
1200
1000
800
600
400
200
0

Fig. 12


Rituximab
A0
A2
% Cytolysis
log [mAb] (ng/ml)
50
40
30
20
10
0
-3
-2
-1
0
1
2
3
4

15/19
Fig. 13

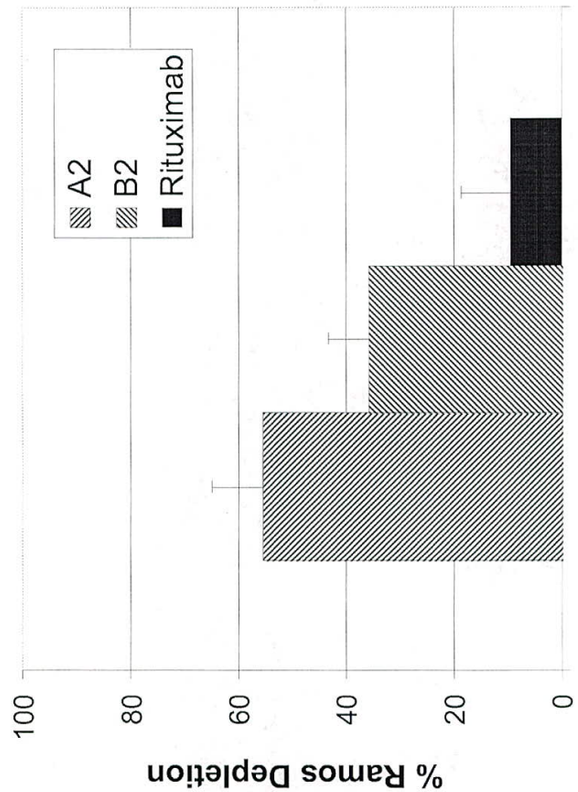
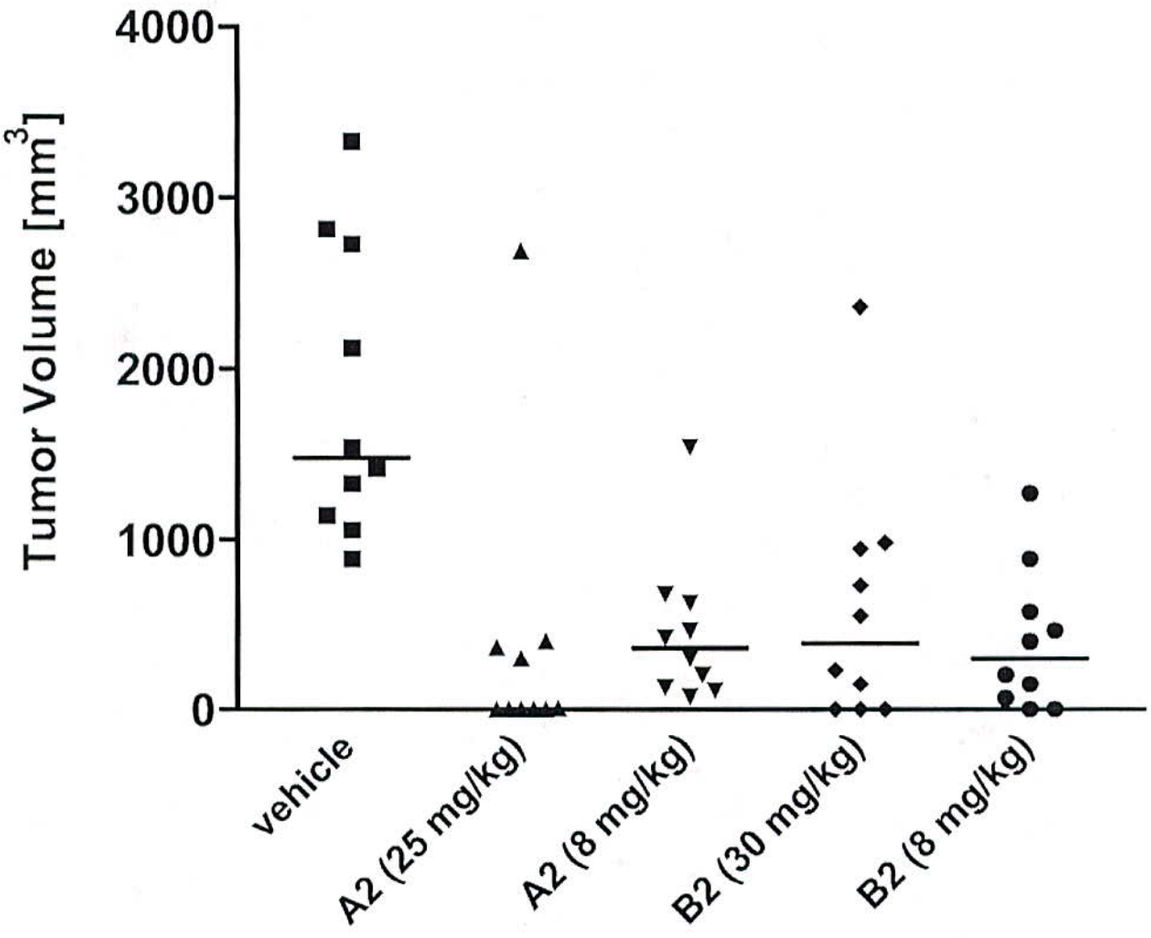
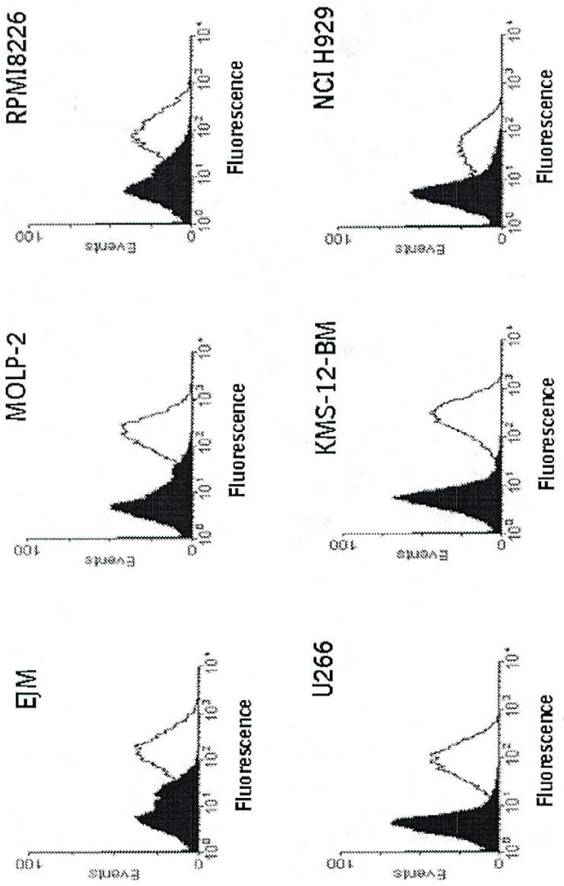


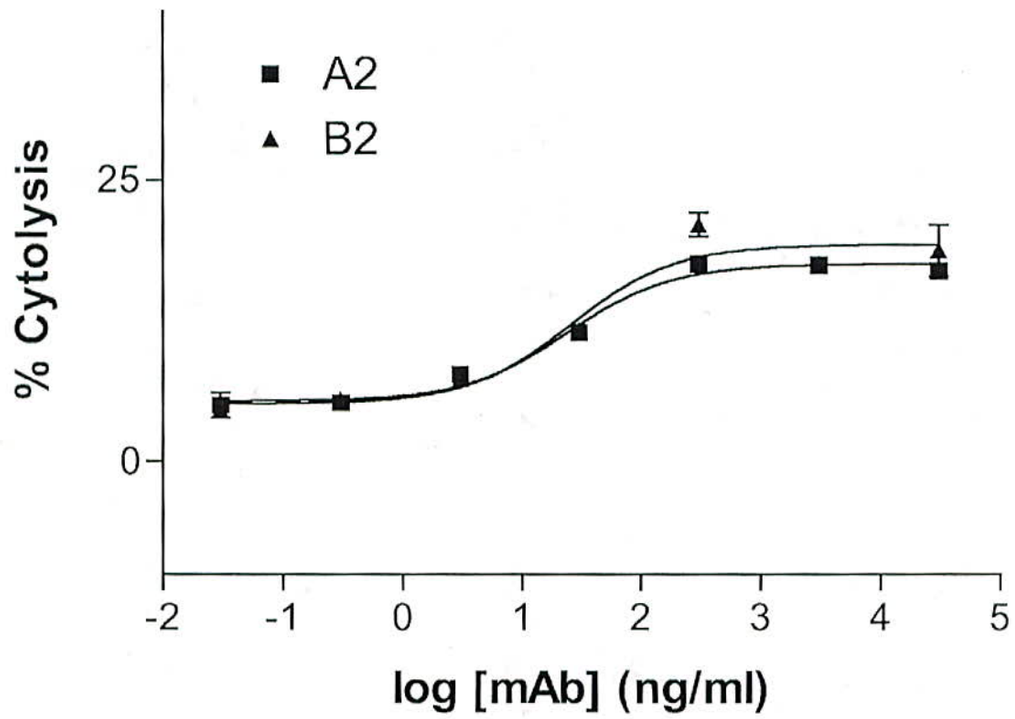
Fig. 14


Tumor Volume [mm3]
4000
3000
2000
1000
0
vehicle
A2 (25 mg/kg)
A2 (8 mg/kg)
B2 (30 mg/kg)
B2 (8 mg/kg)

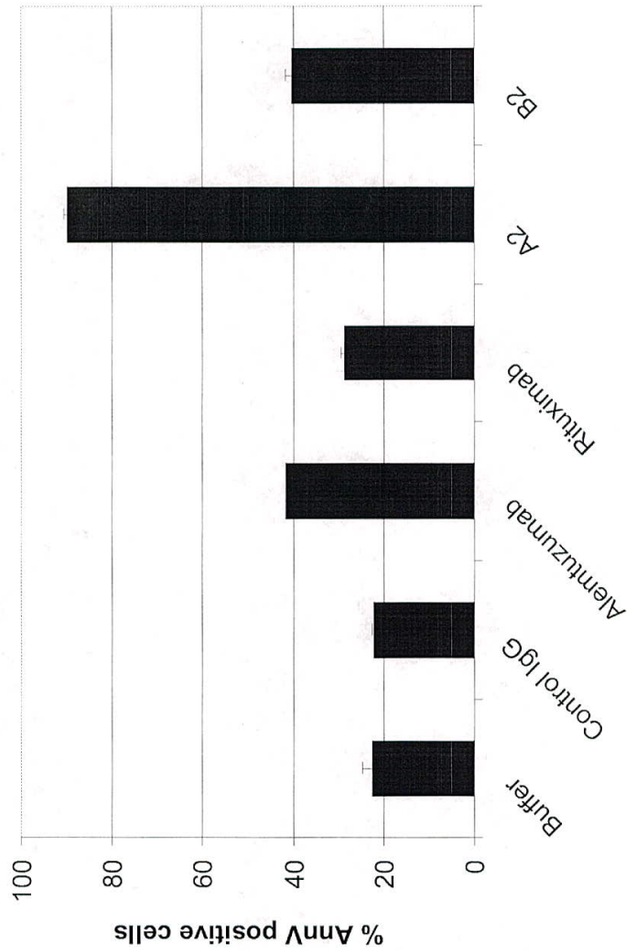
17/19
Fig. 15


RPMI8226
NCI H929
MOLP-2
KMS-12-BM
EJM
U266
Events
Fluorescence

18/19
Fig. 16



19/19
Fig. 17


% AnnV positive cells
100
80
60
40
20
0
Buffer
Control IgG
Alemtuzumab
Rituximab
A2
B2

Anticuerpos Anti-CD37

Introducción

La presente invención se refiere a inmunoterapias que están basadas en la supresión de las células B. En particular, la presente invención se refiere a moléculas de anticuerpo anti-CD37 para utilizarse en dichas terapias, por ejemplo, en el tratamiento de las malignidades de las células B y condiciones autoinmunes.

La inmunoterapia que utiliza anticuerpos monoclonales (mAb) ha surgido como un método seguro y selectivo para el tratamiento del cáncer y de otras enfermedades. En particular, el papel de los anticuerpos monoclonales en las terapias que están basadas en la supresión de las células B, por ejemplo, en el tratamiento de las malignidades de las células B, se ha extendido desde la introducción de rituximab (Rituxan®), un anticuerpo que está dirigido frente al antígeno CD20 de la superficie de las células B. Numerosos estudios han confirmado la eficacia de rituximab como un agente único y en terapia de combinación en NHL de bajo grado (Hiddemann et al., 2005a; Hiddemann et al., 2005b; Hainsworth 2004; McLaughlin et al., 1998), linfoma de células del manto (Forstpointner et al., 2004; Kahl et al., 2006; Foran et al., 2000; Howard et al., 2002; Romaguera et al., 2005), linfoma de células grandes difusas (DLCL) (Coiffier et al., 1998; Feugier et al., 2005) y leucemia/linfoma de Burkitt (Thomas et al., 2006). Sin embargo, sólo un subconjunto de pacientes responde a la terapia y la mayoría de éstos recae eventualmente después del tratamiento con rituximab. Por lo tanto, se han buscado nuevas dianas terapéuticas en las células B que son más eficaces potencialmente que CD20 para la terapia de las malignidades de las células B (Zhao et al., 2007).

El antígeno CD37 es un antígeno de la superficie celular que no se ha considerado, hasta ahora, como una diana para las malignidades de las células B en el mismo grado que el antígeno CD20 de las células B.

CD37, un miembro de la superfamilia de la tetraspanina, es una molécula de la superficie celular altamente glicosilada con cuatro dominios transmembrana y dos bucles extracelulares. CD37 se expresa casi exclusivamente en las células B maduras, con los niveles de expresión más altos en las células B de la sangre periférica, niveles reducidos en las células plasmáticas y niveles no detectables en las células B precursoras CD10+ en la médula ósea. También se ha mostrado un nivel bajo de

expresión de CD37 en células T sin activar y activadas, granulocitos y monocitos. En los neoplasmas de células B, la expresión de CD37 se observa principalmente en el linfoma no-Hodgkin agresivo (NHL) y en leucemia linfoide crónica (CLL). También se ha encontrado un nivel alto de expresión de CD37 en el linfoma de células del manto (MCL). Este patrón de expresión hace a CD37 una diana atractiva para una terapia de cáncer mediada por anticuerpos.

CD37 se describió por primera vez en 1986 y se caracterizó con el anticuerpo monoclonal murino MB-1 (Link et al., 1986).

El papel fisiológico de CD37 no se conoce. Los ratones deficientes en CD37 no presentan cambios en el desarrollo ni en la composición celular de los órganos linfoides, pero tienen niveles reducidos de IgG1 y reacciones inmunes mediadas por células T atenuadas (Knobeloch et al., 2000). Los estudios con células T $CD37^{-/-}$ sugieren un papel para CD37 en la proliferación de las células T (van Spriel et al., 2004).

Se ha mostrado la expresión de CD37 en células B malignas de varias enfermedades. CD37 se expresa en la mayoría de las malignidades de las células B maduras como linfoma de Burkitt, linfoma folicular y linfoma linfocítico (Link et al., 1986). Se han observado unos niveles altos de expresión de CD37 en leucemia de células vellosas y en muestras de pacientes con leucemia linfocítica crónica (CLL) y diferentes subtipos de linfoma no-Hodgkin (NHL) incluyendo linfoma de células del manto (MCL) (Schwartz-Albiez et al., 1988; Barrena et al., 2005). Una publicación que utiliza una micromatriz de anticuerpo para inmunofenotipado reivindica que CD37 es un buen discriminador entre células CLL malignas (alta expresión de CD37) y linfocitos normales de sangre periférica (PB) (baja expresión de CD37) (Belov et al., 2001).

La unión de un mAb específico de CD37 a células cancerosas puede desencadenar varios mecanismos de acción: En primer lugar, después de que el anticuerpo se haya unido al dominio extracelular del antígeno CD37, puede activar la cascada del complemento y lisar la célula diana. En segundo lugar, un anticuerpo anti-CD37 puede mediar la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo (ADCC) en la célula diana, que se produce después de que la parte Fc del anticuerpo unido sea reconocida por receptores apropiados en las células citotóxicas del sistema inmune.

En tercer lugar, el anticuerpo puede alterar la capacidad de las células B para responder al antígeno o a otros estímulos. Finalmente, el anticuerpo anti-CD37 puede iniciar la muerte celular programada (apoptosis).

El mAb anti-CD37 MB-1 se evaluó en dos ensayos de radioinmunoterapia en pacientes con B-NHL (linfoma de células B no-Hodgkin; Press et al., 1989; Kaminski et al., 1992). Se administraron dosis terapéuticas de ^{131}I-MB-1 a 6 pacientes con recaída de NHL en un ensayo y los 6 pacientes consiguieron una remisión clínica completa (CR) con una duración media de 7 meses. Es importante que dos de los seis pacientes mostraron regresiones clínicas después de la administración de sólo la dosis trazadora de MB-1 lo que sugiere un efecto antitumoral directo del anticuerpo en sí mismo. En el segundo ensayo, se aplicó MB-1 marcado radiactivamente para el tratamiento de pacientes refractarios con NHL y resultó que en 3 de 9 pacientes evaluables se obtuvieron respuestas objetivas de duración limitada (Kaminski et al., 1992). En ambos ensayos, se mostró una supresión rápida y transitoria de células B periféricas después de la inyección de la dosis trazadora de anticuerpo MB-1 marcado. Estas observaciones apoyan la conclusión de que MB-1 ejerce una actividad citotóxica por sí mismo. En resumen, estos ensayos clínicos recalcan la factibilidad de la utilización de CD37 como diana para las malignidades de las células B y apuntan a una relevancia clínica potencial de la terapia anti-CD37.

Existe una evidencia experimental con una molécula de cadena única semejante al anticuerpo específico de CD37 ("Small Modular ImmunoPharmaceutical", SMIP) de que el tratamiento con esa molécula induce la apoptosis *in vitro* y retrasa el crecimiento del linfoma de Burkitt en un modelo de xenotransplante *in vivo*. Recientemente, se ha descrito la actividad anti-apoptótica de SMIP Tru16.4 anti-CD37 recombinante de Trubion (Zhao et al., 2004). Tru 16.4 indujo la apoptosis independiente de caspasas en células CLL primarias de pacientes con tumor. La inducción de la apoptosis en estas células fue mayor que la de Rituximab y comparable con la de Alemtuzumab, un antagonista de CD52. El grado de la inducción de la apoptosis fue directamente proporcional a la expresión de CD37 en la superficie celular y podría aumentarse más por el entrecruzamiento con un anticuerpo anti-IgG humana. Se demostró una correlación de la expresión de CD37 y ADCC en líneas celulares *in vitro*. En un modelo de linfoma de Burkitt en ratón (Raji) el tratamiento con scFv anti-CD37 reveló eficacia terapéutica (Zhao et al., 2007). Estos datos proporcionan la primera evidencia de que la utilización de CD37 como diana es un método prometedor para la terapia antitumoral dirigida por la inducción de apoptosis y ADCC.

En conclusión, se ha mostrado que el antígeno CD37 se expresa frecuentemente en células tumorales en varias malignidades de las células B humanas

y en linfocitos B normales maduros y que la terapia basada en anti-CD37 puede ser un método prometedor para tratar las malignidades de las células B. La supresión de las células B normales CD37-positivas no se considera crítica ya que los datos clínicos de numerosos pacientes muestran que incluso la supresión prolongada de células B de hasta 6 meses con un mAb anti-CD20 no reduce significativamente los niveles séricos de IgG ni incrementa el riesgo de infecciones (Van der Kolk et al., 2002).

Aunque los anticuerpos o moléculas semejantes a anticuerpos anti-CD37 descritos anteriormente (MB-1 y SMIP Tru16.4) han mostrado una eficacia antitumoral en malignidades de las células B y el potencial de actuar sobre CD37, existe una necesidad de inhibidores alternativos anti-CD37 para mejorar las terapias basadas en la supresión de las células B.

Sumario de la invención

Era un objeto de la invención proporcionar antagonistas de CD37 nuevos para el tratamiento de las malignidades de las células B y otros trastornos que responden a la supresión de las células B CD37 positivas.

Además, era un objeto de la invención proporcionar anticuerpos anti-CD37 con funciones efectoras mejoradas. En particular, los inventores buscaron proporcionar mAB anti-CD37 con citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo (ADCC).

Para resolver el problema que subyace a la invención, se utilizó un anticuerpo monoclonal murino anti-CD37 como anticuerpo de partida para generar anticuerpos anti-CD37 quiméricos y humanizados que son útiles en la terapia humana.

En un primer aspecto, la presente invención proporciona una molécula de anticuerpo que se une a CD37 humano y que se obtiene a partir de

a) un anticuerpo monoclonal murino que está definido por
   i. una cadena pesada variable que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 2; y
   ii. una cadena ligera variable que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO:4, o a partir de
b) un anticuerpo no humano que reconoce el mismo epítopo de CD37 humano que el anticuerpo definido en a) o que reconoce un epítopo que está cerca de o se superpone con dicho epítopo;

en el que dicha molécula de anticuerpo es un anticuerpo quimérico o humanizado.

Como se entenderá a partir de lo que sigue, un anticuerpo que se "deriva" de otro anticuerpo, es decire, el anticuerpo de partida, significa que dicho anticuerpo ha sido generado por modificación del anticuerpo de partida según se describe más abajo.

En una realización preferida, la molécula de anticuerpo es una molécula de anticuerpo quimérica o humanizada que se deriva del anticuerpo de partida definido en a). Un anticuerpo con una secuencia relacionada se designó G28.1 y se describió en WO 2005/017148.

El anticuerpo de partida de la categoría b) puede seleccionarse, por ejemplo, de los anticuerpos específicos de CD37 que caracterizaron, como G28.1, el antígeno CD37 en el Third HLDA Workshop; estos anticuerpos se designaron HD28, HH1, BI14, F97-3G6 (Ling y MacLennan, 1987). Otros anticuerpos específicos de CD37 que se han descrito incluyen RFB-7, Y29/55, MB-1, M-B371, M-B372 e IPO-24. Según Moldenhauer, 2000 y Schwartz-Albiez et al., 1988, todos estos anticuerpos (incluyendo G28.1) reconocen el mismo epítopo de CD37 o uno que se superpone o está cerca. Schwartz-Albiez et al., 1988, indica que el epítopo está situado en el resto de carbohidrato de CD37. Varios de los anticuerpos anteriores se pueden conseguir comercialmente, por ejemplo, HH1 (SantaCruz), RFB-7 (Biodesign), Y29/55 (Biogenesis), M-B371 (BD Biosciences), M-B372 (SantaCruz) e IPO-24 (AbCam).

Otros anticuerpos específicos de CD37 son S-B3 (Biosys), NMN46 (Chemicon) e ICO-66 (Bioprobe). Puede determinarse si un anticuerpo reconoce el mismo epítopo que G28.1 por ensayos de unión competitiva o por radioinmunoensayos de inhibición cruzada como describen Moldenhauer et al., 1987 y Moldenhauer, 2000.

Como ejemplo, la unión competitiva puede determinarse en un ELISA, utilizando placas recubiertas con la proteína CD37 o péptidos de CD37 o con células CD37 positivas (ELISA Celular) y midiendo la unión de un anticuerpo biotinilado en presencia de un anticuerpo competidor candidato. En presencia de un anticuerpo o fragmento obtenido de un anticuerpo competidor, la unión de G28.1 biotinilado (u otro anticuerpo que se sabe que reconoce el mismo epítopo) se reduce en el caso en el que el anticuerpo reconozca un epítopo compartido. Para identificar el péptido del epítopo de G28.1, pueden sintetizarse o producirse fragmentos o polipéptidos cortos o proteínas recombinantes obtenidos a partir de la secuencia de CD37 y medirse la unión de G28.1 a dichos péptidos/polipéptidos en un ensayo ELISA. La unión competitiva también puede determinarse por análisis FACS, como se describe en los Ejemplos.

Puede utilizarse un anticuerpo definido en b) de una manera análoga a G28.1 como anticuerpo de partida para la generación de moléculas de anticuerpo quiméricas o humanizadas.

Un anticuerpo de partida de la categoría b) también puede generarse *de novo* mediante la utilización de péptidos o fragmentos de proteína que contienen el epítopo relevante o moléculas de ADN que codifican dichos péptidos/fragmentos, respectivamente, para inmunización con el fin de obtener anticuerpos reactivos con el mismo epítopo que G28.1.

Un anticuerpo de partida b) también puede obtenerse mediante inmunización con células enteras que poseen el epítopo relevante; las células de hibridoma así obtenidas se criban para la unión competitiva de los anticuerpos secretados.

El término "molécula de anticuerpo anti-CD37" engloba anticuerpos anti-CD37 y fragmentos de anticuerpos anti-CD37 así como conjugados con moléculas de anticuerpo. Los anticuerpos incluyen, en el significado de la presente invención, anticuerpos monoclonales quiméricos y humanizados. El término "anticuerpo", que puede utilizarse de manera intercambiable con "molécula de anticuerpo", englobará inmunoglobulinas completas (como se producen por los linfocitos y, por ejemplo, están presentes en el suero sanguíneo), anticuerpos monoclonales secretados por líneas celulares de hibridomas, polipéptidos producidos por expresión recombinante en células anfitrionas, que tienen la especificidad de unión de las inmunoglobulinas o anticuerpos monoclonales, y moléculas que se han obtenido a partir de dichos anticuerpos por modificación o procesamiento adicional aunque reteniendo su especificidad de unión.

En una realización de la invención, la molécula de anticuerpo anti-CD37 es un anticuerpo quimérico definido por

i) una cadena pesada variable que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 2;

ii) una cadena ligera variable que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO:4;

iii) cadenas pesadas y ligeras constantes que son de origen humano.

La construcción y producción de anticuerpos quiméricos ratón/humano es muy conocida en la técnica (Boulianne et al., 1984). Las regiones variables del anticuerpo no humano se unen típicamente a al menos una parte (F_C) de la región constante de la inmunoglobulina de una inmunoglobulina humana. Las secuencias de ADN de la región constante humana se pueden aislar según procedimientos muy conocidos a

partir de varias células humanas, preferiblemente a partir de células B inmortalizadas (véanse Kabat et al., 1991; y WO 87/02671). Las moléculas de anticuerpo pueden contener toda o una parte de la región constante siempre que exhiban una unión específica al antígeno CD37 y a los receptores Fc. La elección del tipo y longitud de la región constante depende de si se desean funciones efectoras como fijación de complemento o toxicidad celular mediada por células dependiente de anticuerpo y de las propiedades farmacológicas deseadas de la molécula de anticuerpo.

En determinadas realizaciones, la molécula de anticuerpo de la invención es un anticuerpo específico de CD37 quimérico que tiene la región variable de la cadena pesada de un anticuerpo no humano definido en a) o b) fusionada con la región constante de la cadena pesada IgG1 humana y la región variable de la cadena ligera de un anticuerpo no humano definido en a) o b) fusionada con la región constante de la cadena ligera kappa humana.

En otra realización más, la molécula de anticuerpo es un anticuerpo específico de CD37 quimérico que tiene la región variable de la cadena pesada mostrada en SEQ ID NO:2 fusionada con la región constante de la cadena pesada IgG1 humana que es una molécula de IgG1 con la secuencia mostrada en SEQ ID NO:24 (secuencia de ADN codificante: SEQ ID NO:23) o una molécula de IgG1 mutada obtenida a partir de ésta y tiene la región variable de la cadena ligera mostrada en SEQ ID NO:4 fusionada con la región constante de la cadena ligera kappa humana mostrada en SEQ ID NO:26 (secuencia de ADN codificante: SEQ ID NO:25).

Otras regiones constantes humanas para quimerizar un anticuerpo de partida no humano definido en a) o b) están disponibles para el experto en la técnica, por ejemplo, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE o IgM (en lugar de IgG1) o lambda (en lugar de kappa). Las regiones constantes también pueden ser quiméricas, por ejemplo, una quimera de cadena pesada IgG1/IgG2 o IgG1/IgG3.

En determinadas realizaciones de la invención, la molécula de anticuerpo anti-CD37 es un anticuerpo humanizado que está definido por

i. CDR contenidas en la cadena pesada variable como se muestra en SEQ ID NO:2

y por

ii. CDR contenidas en la cadena ligera variable como se muestra en SEQ ID NO:4,

iii. marcos que soportan dichas CDR que se obtienen a partir de un anticuerpo

humano,

iv. cadenas pesadas y ligeras constantes que son de un anticuerpo humano.

Las formas humanizadas de los anticuerpos no humanos (por ejemplo, anticuerpos murinos, de rata o conejo) son inmunoglobulinas, cadenas de inmunoglobulinas o fragmentos de éstas (tales como Fv, Fab, Fab', $F(ab')_2$ u otras moléculas de unión a antígenos con subsecuencias de anticuerpos) que contienen secuencias mínimas obtenidas a partir de inmunoglobulinas no humanas.

Los anticuerpos humanizados incluyen inmunoglobulinas humanas (del anticuerpo receptor) en las que los restos de una región determinante de la complementariedad (CDR) del anticuerpo receptor se han reemplazado por restos de una CDR de una especie no humana (anticuerpo donante) tal como ratón, rata o conejo que tiene la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los restos del marco Fv de la inmunoglobulina humana se reemplazan por los restos no humanos correspondientes.

En los anticuerpos humanizados de la invención, las secuencias que codifican CDR de un anticuerpo de partida no humano definido en a) o b) se han injertado en los genes respectivos de cadenas pesadas y ligeras de inmunoglobulinas humanas.

Las "regiones determinantes de la complementariedad" (CDR) de un anticuerpo monoclonal se entiende que son las secuencias de aminoácidos implicadas en la unión específica al antígeno según Kabat et al., 1991, en conexión con Chothia y Lesk (1987). A partir de las secuencias de las regiones variables como se muestra en SEQ ID NO:2 y SEQ ID NO:4, puede determinarse rutinariamente la secuencia CDR buscando en la base de datos de secuencias Kabat las características de la secuencia.

Las técnicas para obtener anticuerpos humanizados están disponibles rutinariamente para el experto en la técnica y se han descrito, *inter alia*, en EEUU 5.225.539; EEUU 6.548.640; y EEUU 6.982.321.

Los restos marco apropiados del anticuerpo injertado con CDR pueden revertirse a los restos murinos para mejorar la afinidad de unión. Como se ha descrito anteriormente, a partir de los métodos pertinentes en la técnica, el experto sabe cómo obtener las CDR a partir de un anticuerpo no humano dado, elegir y obtener los genes de inmunoglobulina humanos apropiados, injertar las CDR en estos genes, modificar los restos marco seleccionados, expresar el anticuerpo injertado con CDR en células anfitrionas apropiadas, por ejemplo, células de ovario de hámster chino (CHO) y ensayar los anticuerpos recombinantes resultantes para determinar la afinidad y

especificidad de unión.

Para obtener un anticuerpo humanizado, los sitios de unión al antígeno, que están formados por las CDR de la cadena pesada y las CDR de la cadena ligera, se escinden del ADN de las células que secretan el anticuerpo monoclonal de roedor (murino) y se injertan en el ADN que codifica el marco del anticuerpo humano.

Alternativamente al injerto de CDR, se pueden humanizar anticuerpos anti-CD37 no humanos, en particular murinos, mediante la tecnología denominada "modificación en superficie", mediante la que los marcos de roedor no se cambian con la excepción de los restos expuestos en la superficie, como se describe en EEUU 5.639.641.

En un aspecto adicional, la invención se refiere a anticuerpos humanizados que tienen una cadena pesada variable con una secuencia mostrada en SEQ ID NO:6 y una cadena ligera variable con una secuencia seleccionada de las secuencias mostradas en SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:20 y SEQ ID NO:22.

En otro aspecto, la invención se refiere a anticuerpos humanizados que tienen una cadena pesada variable con una secuencia mostrada en SEQ ID NO:8 y una cadena ligera variable con una secuencia seleccionada de las secuencias mostradas en SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:20 y SEQ ID NO:22.

En otro aspecto, la invención se refiere a anticuerpos humanizados que tienen una cadena pesada variable con una secuencia mostrada en SEQ ID NO:10 y una cadena ligera variable con una secuencia seleccionada de las secuencias mostradas en SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:20 y SEQ ID NO:22.

Los anticuerpos humanizados definidos anteriormente se muestran en la Tabla 1.

En determinadas realizaciones, el anticuerpo humanizado tiene una región constante de cadena pesada humana IgG1 y una región constante de cadena ligera kappa humana. Como se ha descrito anteriormente para los anticuerpos quiméricos, las regiones constantes pueden seleccionarse de otras clases y subclases.

En determinadas realizaciones, en los anticuerpos humanizados de la invención, la cadena pesada constante humana IgG1 es una molécula de IgG1 con la secuencia mostrada en SEQ ID NO:24 o una molécula de IgG1 mutada obtenida de ésta y la región constante de la cadena ligera kappa humana que tiene la secuencia

mostrada en SEQ ID NO:26.

Las moléculas de anticuerpo anti-CD37 de la invención también pueden ser variantes de los anticuerpos que están definidos por las secuencias de aminoácidos mostradas en el listado de secuencias. Utilizando las tecnologías disponibles rutinariamente, el experto en la técnica será capaz de preparar, ensayar y utilizar variantes funcionales de los anticuerpos definidos anteriormente. Los ejemplos son anticuerpos variantes con al menos una posición alterada en una CDR y/o marco, anticuerpos variantes con sustituciones de un único aminoácido en la región marco en la que hay una desviación de la secuencia de la línea germinal, anticuerpos con sustituciones conservativas de aminoácidos, anticuerpos que están codificados por moléculas de ADN que hibridan, en condiciones astringentes, con las moléculas de ADN presentadas en el listado de secuencias que codifican las cadenas variables de anticuerpos.

Dadas las propiedades de los aminoácidos individuales, pueden realizarse sustituciones racionales para obtener variantes de anticuerpos que conservan la estructura molecular global del anticuerpo de partida. Las sustituciones de aminoácidos, es decir, las "sustituciones conservativas", pueden hacerse, por ejemplo, sobre la base de la similitud en la polaridad, carga, solubilidad, hidrofobicidad, hidrofilicidad y/o la naturaleza anfipática del aminoácido respectivo. El experto está familiarizado con las sustituciones de aminoácidos usualmente practicadas, que se describen, por ejemplo, en WO 2007/042309 y con los métodos para obtener anticuerpos así modificados. Dado el código genético y las técnicas de ADN recombinante y sintético, las moléculas de ADN que codifican anticuerpos variantes con uno o más intercambios conservativos de aminoácidos pueden diseñarse rutinariamente y obtenerse fácilmente los anticuerpos respectivos.

En comparación con un anticuerpo definido por sus cadenas variables mostradas en el listado de secuencias, las variantes de anticuerpo englobadas por la invención tienen una identidad de secuencia en las regiones CDR de al menos 60%, más preferiblemente al menos 70% ó 80%, aún más preferiblemente al menos 90% y lo más preferiblemente al menos 95%. Los anticuerpos preferidos también tienen una similitud de secuencia en las regiones CDR de al menos 80%, más preferiblemente 90% y lo más preferiblemente 95%. Las variantes preferidas de anticuerpos tienen una identidad de secuencia en las regiones variables de al menos 60%, más preferiblemente al menos 70% u 80%, aún más preferiblemente al menos 90% y lo más preferiblemente al menos 95%. Los anticuerpos preferidos también tienen una

similitud de secuencia en las regiones variables de al menos 80%, más preferiblemente 90% y lo más preferiblemente 95%.

La "identidad de secuencia" entre dos secuencias de polipéptidos indica el porcentaje de aminoácidos que son idénticos entre las secuencias. La "similitud de secuencia" indica el porcentaje de aminoácidos que son idénticos o que representan sustituciones conservativas de aminoácidos.

También puede obtenerse una variante usando un anticuerpo con una secuencia definida como se muestra en el listado de secuencias como punto de partida para optimizar y diversificar uno o más restos de aminoácidos, preferiblemente restos de aminoácidos en una o más CDR y cribando la colección resultante de variantes de anticuerpos con respecto a variantes con propiedades mejoradas. Se ha demostrado que es útil la diversificación de uno o más restos de aminoácidos en la CDR3 de la cadena ligera variable, CDR3 de la cadena pesada variable, CDR1 de la cadena ligera variable y/o CDR2 de la cadena pesada variable. La diversificación puede hacerse por métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, la tecnología denominada TRIM a la que se hace referencia en WO 2007/042309.

En una realización adicional, la molécula de anticuerpo anti-CD37 de la invención es un anticuerpo de "afinidad madurada".

Un anticuerpo anti-CD37 de "afinidad madurada" es un anticuerpo anti-CD37 obtenido a partir de un anticuerpo con las secuencias mostradas en el listado de secuencias, que tiene una o más alteraciones en una o más CDR que resultan en una mejora de la afinidad para los antígenos comparada con el anticuerpo no madurado original respectivo. Uno de los procedimientos para generar dichos anticuerpos mutantes implica la expresión en fagos (Hawkins et al., 1992; y Lowman et al., 1991). Brevemente, se mutan varios sitios de regiones hipervariables (por ejemplo 6-7 sitios) para generar todas las sustituciones posibles de aminoácidos en cada sitio. Los anticuerpos mutantes así generados se expresan de una manera monovalente en partículas de fagos filamentosos como fusiones con el producto del gen III de M13 empaquetados dentro de cada partícula. Los mutantes expresados por los fagos se criban entonces respecto a su actividad biológica (por ejemplo, la afinidad de unión) como se describe en la presente memoria.

Los anticuerpos de afinidad madurada también pueden producirse por métodos como describen, por ejemplo, Marks et al., 1992, (maduración de la afinidad barajando dominios de cadena pesada variables (VH) y cadena ligera variables (VL)) o Barbas et al., 1994; Shier et al., 1995; Yelton et al., 1995; Jackson et al., 1995; y Hawkins et al.,

1992 (mutagénesis aleatoria de restos CDR y/o marco). Los anticuerpos preferidos de afinidad madurada tendrán afinidades del orden nanomolar o incluso picomolar por el antígeno diana.

En una realización adicional, la molécula de anticuerpo anti-CD37 de la invención es un anticuerpo "desinmunizado".

Un anticuerpo anti-CD37 "desinmunizado" es un anticuerpo obtenido a partir de un anticuerpo humanizado o quimérico con una secuencia mostrada en el listado de secuencias, que tiene una o más alteraciones en su secuencia de aminoácidos que resultan en una reducción de la inmunogenicidad del anticuerpo comparada con el anticuerpo no deshumanizado original respectivo. Uno de los procedimientos para generar dichos anticuerpos mutantes implica la identificación y eliminación de epítopos de células T de la molécula de anticuerpo (Baker y Jones, 2007). En una primera etapa, puede determinarse la inmunogenicidad de la molécula de anticuerpo por varios métodos, por ejemplo, por la determinación *in vitro* de los epítopos de la célula T o la predicción in silico de dichos epítopos, como se ha descrito en la bibliografía (Jones et al., 2004; Jones et al., 2005; Reche et al., 2004; Hertz et al., 2006). Una vez que se han identificado los restos críticos para la función de epítopo de la célula T pueden hacerse mutaciones para eliminar la inmunogenicidad y retener la actividad del anticuerpo (Jones et al., 2005; Tangri et al., 2005). Los métodos para introducir mutaciones en proteínas son muy conocidos en la técnica, por ejemplo, por técnicas de PCR con superposición.

Como la región Fc de un anticuerpo interacciona con varios receptores de Fc, que resulta en varias capacidades funcionales importantes (que se refieren como "funciones efectoras"), el anticuerpo, en determinadas realizaciones, es un anticuerpo de longitud completa o un anticuerpo que contiene una parte de la región Fc, esto último siempre que el anticuerpo exhiba una unión específica tanto a la parte relevante del antígeno como a los receptores de Fc. La elección del tipo y longitud de la región constante depende de que sean características deseables las funciones efectoras como la fijación de complemento o la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo y de las propiedades farmacológicas deseadas de la proteína de anticuerpo.

En una realización de la invención, el anticuerpo anti-CD37 es un anticuerpo quimérico o humanizado con una región Fc, o la sección relevante de ésta, que se ha modificado por ingeniería para modular las funciones efectoras, en particular para incrementar la unión del anticuerpo a uno o más receptores de Fc, incrementando de

esta manera la función efectora ADDC. La modificación por ingeniería de la región Fc media la función efectora del anticuerpo en presencia de células efectoras más eficazmente que la del anticuerpo parental con Fc no modificada por ingeniería. En una realización, dicha variante de anticuerpo media ADCC que es mayor que la mediada por el anticuerpo parental. (En el texto que sigue, a no ser que se indique otra cosa, el término "parental" en el contexto de una molécula de anticuerpo, o en el contexto de IgG o la región Fc, se refiere a la molécula de anticuerpo, región Fc o IgG no modificada por ingeniería, respectivamente, a partir de la que se obtiene la molécula mutada (modificada por ingeniería)).

Se han sugerido en la técnica varias modificaciones de la región Fc, tanto en la bibliografía científica como en los documentos de patentes, por ejemplo en EP 0307434, WO 9304173, WO 9734631, WO 9744362, WO 9805787, WO 9943713, WO 9951642, WO 9958572, WO 02060919, WO 03074679, WO 2004016750, WO 2004029207, WO 2004063351, WO 2004074455, WO 2004035752, WO 2004099249, WO 2005077981, WO 2005092925, WO 2006019447, WO 2006031994, WO 2006047350, WO 2006053301, WO 2006088494 y WO 2007041635.

En las realizaciones preferidas, los anticuerpos de la invención son variantes de Fc con sustituciones de aminoácidos en las posiciones 332 y/o 239 y/o 236. En las realizaciones preferidas, los anticuerpos de la invención tienen mutaciones en el dominio Fc seleccionadas del grupo de

i) una única sustitución en la posición 332, preferiblemente I332E;

ii) una combinación de sustituciones en las posiciones 239 y 332, preferiblemente S239D/I332E;

iii) una combinación de sustituciones en las posiciones 236 y 332, preferiblemente G236A/ I332E;

iv) una combinación de sustituciones en las posiciones 236, 239 y 332, preferiblemente G236A /S239D/I332E.

Las sustituciones definidas anteriormente han sido descritas, por ejemplo, por Lazar et al., 2006, en WO 2004029207 y WO 2007041635.

Las variantes de Fc en los anticuerpos de la presente invención se definen según las modificaciones de aminoácidos que las componen. Así, por ejemplo, I332E es una variante de Fc con la sustitución I332E respecto al polipéptido Fc parental. De la misma manera, S239D/I332E define una variante de Fc con las sustituciones S239D y I332E y S239D/I332E/G236A define una variante de Fc con las sustituciones S239D,

I332E y G236A respecto al polipéptido Fc parental.

La numeración es según el esquema de numeración de EU (Kabat et al., 1991), que se refiere a la numeración del anticuerpo EU (Edelman et al., 1969). El experto en la técnica apreciará que estas convenciones consisten en la numeración no secuencial en regiones específicas de una secuencia de inmunoglobulina, lo que permite una referencia normalizada a las posiciones conservadas en las familias de inmunoglobulinas.

En los anticuerpos definidos anteriormente, las posiciones sustituidas 236, 239 y 332 corresponden a las posiciones 119, 122 y 215, respectivamente, de la cadena pesada de IgG1 mostrada en SEQ ID NO:24. (En las secuencias de longitud completa de las cadenas pesadas de los anticuerpos A2, A4, B2 y B4 mostradas en SEQ ID NOs: 28, 32, 36 y 40, los aminoácidos sustituidos están en las posiciones 235, 238 y 331).

En determinadas realizaciones, las variantes de Fc de la invención están basadas en secuencias de IgG humanas y así se utilizan secuencias de IgG humanas como las secuencias "base" frente a las que se comparan otras secuencias. Para los anticuerpos de la presente invención, la región Fc modificada por ingeniería es preferiblemente IgG, en particular IgG1, pero puede ser también IgG2 o secuencias variantes de otras clases de inmunoglobulinas tales como IgA, IgE, IgGD, IgM o versiones quiméricas de dos o más clases de inmunoglobulinas (por ejemplo, IgG2/IgG1) y semejantes. Aunque las variantes de Fc de la presente invención se modifican por ingeniería en el contexto de una IgG parental, las variantes pueden modificarse por ingeniería en o "transferirse" al contexto de otra segunda IgG parental. Esto se hace determinando los restos y sustituciones "equivalentes" o "correspondientes" entre la primera y segunda IgG, típicamente tomando como base la homología de secuencia o estructural entre las secuencias de la primera y segunda IgG. Con el fin de establecer la homología, la secuencia de aminoácidos de una primera IgG indicada en la presente memoria se compara directamente con la secuencia de una segunda IgG. Después de alinear las secuencias, utilizando uno o más de los programas de alineamiento de homología conocidos en la técnica, permitiendo las inserciones y deleciones necesarias con el fin de mantener el alineamiento (es decir, evitando la eliminación de restos conservados por deleción e inserción arbitraria), se definen los restos equivalentes a aminoácidos particulares en la secuencia primaria de la primera variante de Fc. Independientemente de cómo se determinan los restos equivalentes o correspondientes e independientemente de la

identidad de la IgG parental en la que se hacen las IgG, lo que se pretende expresar es que las variantes de Fc utilizadas en la presente invención pueden modificarse por ingeniería en cualquier segunda IgG parental que tiene una homología de secuencia o estructural significativa con la variante de Fc. Así, por ejemplo, si se genera una variante de anticuerpo en la que el anticuerpo parental es IgG1 humana, utilizando los métodos descritos anteriormente u otros métodos para determinar los restos equivalentes, la variante del anticuerpo puede modificarse por ingeniería, por ejemplo, en un anticuerpo IgG2 parental humano, un anticuerpo IgA parental humano (véase WO 2007041635).

Los anticuerpos de la invención están dirigidos al antígeno CD37, lo que puede ser ventajoso respecto al direccionamiento de CD20 en enfermedades en las que el nivel de expresión de CD37 es mayor que el de CD20 como, por ejemplo, en leucemia linfocítica crónica, en la que las muestras han mostrado niveles altos de expresión del ARNm de CD37 comparados con el bajo nivel de expresión del ARNm de CD20.

Se ha mostrado que los anticuerpos de la invención son superiores al rituximab, un anticuerpo anti-CD20 registrado, respecto a la actividad ADCC en células Ramos, supresión de células B normales en sangre completa y supresión de células Ramos del linfoma de Burkitt. Como puede mostrarse en los experimentos de la invención, los anticuerpos de la invención (tanto los que tienen Fc no modificada por ingeniería como los que tienen Fc modificada por ingeniería) tienen una actividad supresora de células B que es superior a la del rituximab. Los anticuerpos con la región Fc mutada muestran un incremento de aproximadamente 10 veces en la actividad supresora de células B comparada con rituximab (Figura 11B).

Los representantes de los anticuerpos de CD37 de la invención muestran una actividad pro-apoptótica potente sin entrecruzamiento; a este respecto, los anticuerpos con esta propiedad son superiores al anti-CD37 SMIP Tru16.4, que no muestra apoptosis sin entrecruzamiento (Zhao et al., 2007). La inducción de la apoptosis sin entrecruzamiento, que puede mostrarse para los anticuerpos de la invención tanto con como sin modificación por ingeniería de Fc, es ventajosa en ausencia de un agente de entrecruzamiento in vivo (por ejemplo, células efectoras que poseen receptores Fcγ) o a una densidad baja del antígeno diana CD37 (por ejemplo, células tumorales con un bajo nivel de expresión de CD37). Un anticuerpo que induce la apoptosis sin entrecruzamiento puede aún causar la muerte celular, mientras que un anticuerpo dependiente de entrecruzamiento no puede.

En un aspecto adicional, una molécula de anticuerpo anti-CD37 de la invención

es un fragmento de anticuerpo que se obtiene a partir de un anticuerpo específico CD37 humanizado o quimérico según la presente invención. Para obtener fragmentos de anticuerpo, por ejemplo fragmentos Fab, la digestión puede conseguirse por medio de técnicas rutinarias, por ejemplo usando papaína. En WO 94/29348 y EEUU 4.342.566 se describen ejemplos de digestión con papaína. La digestión con papaína de anticuerpos produce típicamente dos fragmentos idénticos de unión al antígeno, denominados fragmentos Fab, cada uno con un único sitio de unión al antígeno, y un fragmento Fc residual. El tratamiento con pepsina da lugar a un fragmento $F(ab')_2$ que tiene dos sitios de combinación con el antígeno y es todavía capaz de entrecruzar el antígeno.

Los fragmentos Fab obtenidos por digestión del anticuerpo también contienen los dominios constantes de la cadena ligera y el primer dominio constante (CH_1) de la cadena pesada. Los fragmentos Fab' difieren de los fragmentos Fab en que contienen restos adicionales en el extremo carboxi del dominio CH_1 de la cadena pesada que incluye una o más cisteínas de la región bisagra del anticuerpo. En la presente memoria, Fab'-SH es la designación de Fab' en el que el o los restos de cisteína de los dominios constantes portan un grupo tiol libre. Los fragmentos $F(ab')_2$ de anticuerpos se produjeron originalmente como pares de fragmentos Fab' que tienen cisteínas bisagra entre ellos. Los fragmentos de anticuerpos también pueden generarse por métodos de biología molecular que producen los respectivos fragmentos de ADN codificadores.

La molécula de anticuerpo será típicamente un tetrámero que consiste en dos pares cadena ligera/cadena pesada, pero también puede ser dimérico, es decir consiste en un par cadena ligera/cadena pesada, por ejemplo un fragmento Fab o Fv, o puede ser un anticuerpo monomérico de una única cadena (scFv;Johnson y Bird, 1991), un fragmento monovalente o un fragmento divalente.

La molécula de anticuerpo anti-CD37 también puede estar en la forma de un conjugado, es decir, una molécula de anticuerpo que está acoplada químicamente a un agente citotóxico, particularmente a un agente citotóxico que induce citotoxicidad (por ejemplo, apoptosis o parada mitótica) de células tumorales. Como resultado de los mecanismos normales de aclaramiento farmacológico, un anticuerpo empleado en un conjugado de fármaco (un "inmunoconjugado") contacta y se une a las células diana sólo en cantidades limitadas. Por lo tanto, el agente citotóxico empleado en el conjugado debe ser altamente citotóxico de manera que se produce una muerte celular suficiente para incitar un efecto terapéutico. Como se describe en EEUU

2004/0241174, los ejemplos de dichos agentes citotóxicos incluyen taxanos (véanse, por ejemplo, WO 01/38318 y WO 03/097625), agentes alquilantes de ADN (por ejemplo, análogos de CC-1065), antraciclinas, análogos de tubulisina, análogos de duocarmicina, doxorrubicina, auristatina E, toxina ricina A y agentes citotóxicos que comprenden un resto de polietilen glicol reactivo (véanse, por ejemplo, Sasse et al., 2000; Suzawa et al., 2000; Ichimura et al., 1991; Francisco et al., 2003; EEUU 5.475.092; EEUU 6.340.701; EEUU 6.372.738; y EEUU 6.436.931; EEUU 2001/0036923; EEUU 2004/0001838; EEUU 2003/0199519; y WO 01/49698).

En una realización preferida, el agente citotóxico es un maitansinoide, es decir, un derivado de maitansina (CAS 35846538), sabiéndose en la técnica que los maitansinoides incluyen maitansina, maitansinol, ésteres C-3 del maitansinol y otros análogos y derivados del maitansinol (véanse, por ejemplo, EEUU 5.208.020 y EEUU 6.441.163).

Los inmunoconjugados del anticuerpo anti-CD37 pueden diseñarse y sintetizarse como se describe en WO2007/077173 para los inmunoconjugados anti-FAP.

En una realización adicional, la molécula anti-CD37 de la invención puede marcarse radiactivamente para formar un radioinmunoconjugado, un método sugerido para el anticuerpo anti-CD37 MB-1 (Buchsbaum et al., 1992, véase más arriba). Los radionúclidos con propiedades de radiación ventajosas se conocen en la técnica, los ejemplos son Fósforo-32, Estroncio-89, Itrio-90, Yodo-131, Samario-153, Erbio-169, Iterbio-175, Renio-188, que se han acoplado a MAb de forma exitosa y estable. Las moléculas de anticuerpo anti-CD37 de la invención pueden marcarse con varios radionúclidos utilizando métodos de marcaje directo o marcaje indirecto conocidos en la técnica, como se describe en EEUU 6.241.961. Una revisión de las tecnologías para generar y aplicar nuevos conjugados de anticuerpo marcados radiactivamente que son útiles en la presente invención la proporcionan Goldenberg y Sharkey, 2007.

Una molécula de anticuerpo de la invención, tanto si tiene Fc modificada por ingeniería como si no, también puede ser biespecífica, es decir, una molécula de anticuerpo que se une a dos dianas diferentes, siendo una de ellas CD37 y seleccionándose la otra, por ejemplo, de antígenos de superficie expresados por las células T, por ejemplo, CD3, CD16 y CD56.

La presente invención también se refiere a moléculas de ADN que codifican las moléculas de anticuerpo anti-CD37 quiméricas o humanizadas de la invención. Las secuencias que codifican las cadenas pesadas variables de las moléculas de

anticuerpo de la invención se muestran en SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7 y SEQ ID NO:9. Las secuencias que codifican las cadenas ligeras variables de las moléculas de anticuerpo de la invención se muestran en SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO: 21.

Las moléculas de ácido nucleico que codifican la cadena ligera y la cadena pesada pueden sintetizarse químicamente y enzimáticamente (amplificación por PCR) por métodos estándar. En primer lugar, los oligonucleótidos adecuados pueden sintetizarse con métodos conocidos en la técnica (por ejemplo, Gait, 1984), que pueden utilizarse para producir un gen sintético. Los métodos para generar genes sintéticos a partir de oligonucleótidos son conocidos en la técnica (por ejemplo, Stemmer et al., 1995; Ye et al., 1992; Hayden y Mandecki, 1988; Frank et al., 1987).

Las moléculas de ADN de la invención incluyen, pero no están limitadas a, las moléculas de ADN mostradas en el listado de secuencias. Por consiguiente, la presente invención también se refiere a moléculas de ácido nucleico que hibridan con las moléculas de ADN mostradas en el listado de secuencias en condiciones de unión y de lavado altamente astringentes, como se define en WO 2007/042309, en el que dichas moléculas de ácido nucleico codifican un anticuerpo o un fragmento funcional de éste que tiene propiedades equivalentes o superiores a un anticuerpo codificado por una secuencia mostrada en el listado de secuencias. Las moléculas preferidas (desde una perspectiva del ARNm) son las que tienen al menos 75% u 80% (preferiblemente al menos 85%, más preferiblemente al menos 90% y lo más preferiblemente al menos 95%) de homología o identidad de secuencia con una de las moléculas de ADN descritas en la presente memoria.

Otra clase más de variantes de ADN que están dentro del alcance de la invención pueden definirse con referencia al polipéptido que codifican. Estas moléculas de ADN se desvían respecto a su secuencia de las mostradas en el listado de secuencias pero codifican, debido a la degeneración del código genético, anticuerpos con secuencias de aminoácidos idénticas. Como ejemplo, con el fin de expresar los anticuerpos en células eucariotas, las secuencias de ADN mostradas en el listado de secuencias, se han diseñado para que se correspondan con la utilización de codones en las células eucariotas. Si se desea expresar los anticuerpos en *E. coli*, estas secuencias pueden cambiarse para que se correspondan con la utilización de codones de *E. coli*. Las variantes de moléculas de ADN de la invención pueden construirse de varias formas diferentes, como se describe, por ejemplo, en WO 2007/042309.

Para producir las moléculas de anticuerpos anti-CD37 recombinantes de la invención, las moléculas de ADN que codifican las cadenas ligeras y pesadas de longitud completa o fragmentos de éstas se insertan en un vector de expresión de manera que las secuencias se unan operativamente a secuencias de control de la transcripción y la traducción.

Para fabricar los anticuerpos de la invención, el experto en la técnica puede elegir de una gran variedad de sistemas de expresión muy conocidos en la técnica, por ejemplo, los revisados por Kipriyanow y Le Gall, 2004.

Los vectores de expresión incluyen plásmidos, retrovirus, cósmidos, episomas derivados de EBV, y semejantes. El vector de expresión y las secuencias de control de la expresión se seleccionan para que sean compatibles con la célula anfitriona. El gen de la cadena ligera del anticuerpo y el gen de la cadena pesada del anticuerpo pueden insertarse en vectores separados. En ciertas realizaciones, ambas secuencias de ADN se insertan en el mismo vector de expresión. Los vectores convenientes son los que codifican una secuencia de inmunoglobulina humana funcionalmente completa CH o CL, con sitios de restricción apropiados diseñados por ingeniería genética para que cualquier secuencia de VH o VL pueda insertarse y expresarse fácilmente, como se ha descrito anteriormente. La cadena constante es usualmente kappa o lambda para la cadena ligera del anticuerpo, y para la cadena pesada puede ser, sin limitación, cualquier isotipo de IgG (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4) u otras inmunoglobulinas, incluyendo las variantes alélicas.

El vector de expresión recombinante también puede codificar un péptido señal que facilite la secreción de la cadena del anticuerpo desde una célula anfitriona. El ADN que codifica la cadena del anticuerpo puede clonarse en el vector de manera que el péptido señal esté unido al extremo amino del ADN de la cadena del anticuerpo maduro. El péptido señal puede ser un péptido señal de inmunoglobulina o un péptido heterólogo de una proteína que no sea una inmunoglobulina. Alternativamente, la secuencia de ADN que codifica la cadena del anticuerpo ya puede contener una secuencia del péptido señal.

Además de las secuencias de ADN que codifican las cadenas del anticuerpo, los vectores de expresión recombinantes llevan secuencias reguladoras que incluyen promotores, amplificadores, señales de terminación y de poliadenilación y otros elementos de control de la expresión que controlan la expresión de las cadenas del anticuerpo en una célula anfitriona. Los ejemplos de secuencias de promotores (ejemplificados para la expresión en células de mamíferos) son promotores y/o

amplificadores derivados de (CMV) (tal como CMV del virus Simian 40 (SV40) (tal como el promotor/amplificador de SV40), adenovirus, (por ejemplo, el promotor tardío principal de adenovirus (AdMLP)), promotores derivados de poliomas y promotores fuertes de mamíferos tales como promotores nativos de inmunoglobulinas y actinas. Los ejemplos de señales de poliadenilación son BGH poliA, poliA SV40 tardío o temprano; alternativamente, pueden usarse 3'UTR de genes de inmunoglobulinas etc.

Los vectores de expresión recombinantes también pueden llevar secuencias que regulen la replicación del vector en las células anfitrionas (por ejemplo, orígenes de replicación) y genes marcadores seleccionables. Las moléculas de ácido nucleico que codifican la cadena pesada o una parte de unión al antígeno de ésta y/o la cadena ligera o una parte de unión al antígeno de ésta de un anticuerpo anti-CD37 y los vectores que comprenden estas moléculas de ADN pueden introducirse en células anfitrionas, por ejemplo células bacterianas o células eucariotas superiores, por ejemplo células de mamíferos, según métodos de transfección muy conocidos en la técnica, que incluyen transfección mediada por liposomas, transfección mediada por policationes, fusión de protoplastos, microinyecciones, precipitación con fosfato de calcio, electroporación o transferencia mediante vectores virales.

Preferiblemente, las moléculas de ADN que codifican la cadena pesada y la cadena ligera están presentes en dos vectores que se co-transfectan en la célula anfitriona, preferiblemente una célula de mamíferos.

Las líneas de células de mamíferos disponibles como anfitriones para llevar a cabo la expresión son muy conocidas en la técnica e incluyen, inter alia, células de ovario de hámster chino (CHO, CHO-DG44), NSO, células SP2/0, células HeLa, células de riñón de cría de hámster (BHK), células de riñón de mono (COS), células de carcinoma humano (por ejemplo, Hep G2), células A549, células 3T3 o los derivados/progenies de cualquiera de dichas líneas celulares. Pueden usarse otras células de mamíferos, que incluyen pero no se limitan a, líneas celulares de ser humano, ratones, ratas, monos y roedores, u otras células eucariotas, que incluyen pero no se limitan a, células de levadura, insectos y plantas, o células procariotas tales como las bacterias. Las moléculas de anticuerpo anti-CD37 de la invención se producen cultivando las células anfitrionas durante un período de tiempo suficiente para permitir la expresión de la molécula de anticuerpo en las células anfitrionas.

Las moléculas de anticuerpos se recuperan preferiblemente del medio de cultivo como un polipéptido secretado o pueden recuperarse de lisados de células anfitrionas si, por ejemplo, se expresan sin una señal secretora. Es necesario purificar

las moléculas del anticuerpo usando métodos estándar de purificación de proteínas usados para proteínas recombinantes y proteínas de células anfitrionas de manera que se obtengan preparaciones sustancialmente homogéneas del anticuerpo. Como ejemplo, los métodos de purificación de última generación útiles para obtener la molécula de anticuerpo anti-CD37 de la invención incluyen, como una primera etapa, la separación de las células y/o de los restos celulares en forma de partículas del medio de cultivo o del lisado. A continuación, el anticuerpo se purifica de las proteínas, polipéptidos y ácidos nucleicos contaminantes solubles, por ejemplo, por fraccionamiento en columnas de inmunoafinidad o de intercambio de iones, precipitación en etanol, HPLC en fase reversa, cromatografía en Sefadex, cromatografía sobre sílice o sobre una resina de intercambio de cationes. Como etapa final del proceso para obtener una preparación de molécula de anticuerpo anti-CD37, la molécula de anticuerpo purificada puede secarse, por ejemplo liofilizarse, como se describe más adelante para las aplicaciones terapéuticas.

En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que contiene, como ingrediente activo, la molécula de anticuerpo anti-CD37 de la invención.

Para ser usado en terapia, el anticuerpo anti-CD37 se incluye en composiciones farmacéuticas apropiadas para facilitar la administración a animales o a seres humanos. Pueden prepararse formulaciones típicas de la molécula de anticuerpo anti-CD37 mezclando la molécula de anticuerpo anti-CD37 con vehículos, excipientes o agentes estabilizantes aceptables fisiológicamente, en forma de formulaciones liofilizadas o secadas de cualquier otra forma o disoluciones acuosas o suspensiones acuosas o no acuosas. Los vehículos, excipientes, agentes modificadores o agentes estabilizantes no son tóxicos a las dosificaciones y concentraciones empleadas. Incluyen sistemas tamponadores tales como fosfato, citrato, acetato y otros ácidos orgánicos o inorgánicos y sus sales; antioxidantes que incluyen el ácido ascórbico y la metionina; agentes conservantes (tales como el cloruro de octadecildimetilbencil amonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio; fenol, alcohol butílico o bencílico; alquil-parabenes tales como metil o propil-paraben; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); proteínas, tales como albúmina de suero, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrofílicos tales como polivinil-pirrolidona o polietilen glicol (PEG); aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina, o lisina; monosacáridos, disacáridos, oligosacáridos o polisacáridos y otros hidratos de carbono que incluyen

glucosa, manosa, sacarosa, trehalosa, dextrinas o dextranos; agentes quelantes tales como EDTA; azúcares alcoholes tales como manitol o sorbitol; contraiones formadores de sales tales como sodio; complejos de metales (por ejemplo, complejos Zn-proteína); y/o tensioactivos iónicos o no iónicos tales como TWEEN™ (polisorbatos), PLURONICS™ o ésteres de ácidos grasos, éteres de ácidos grasos o ésteres de azúcares. En la formulación del anticuerpo también pueden estar contenidos disolventes orgánicos tales como etanol o isopropanol. Los excipientes también pueden tener una función modificadora de la liberación o modificadora de la absorción.

Las moléculas del anticuerpo anti-CD37 también pueden secarse (por liofilización, atomización, liofilización por pulverización, secarse mediante gases supercríticos o casi supercríticos, secarse en vacío o secarse con aire), precipitarse o cristalizarse o incluirse en microcápsulas que se preparan, por ejemplo, por técnicas de coacervación o por polimerización interfacial usando, por ejemplo, hidroximetilcelulosa o gelatina y poli-(metacrilato de metilo), respectivamente, en sistemas coloidales de administración de fármacos (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas), en macroemulsiones o precipitarse o inmovilizarse sobre vehículos o superficies, por ejemplo mediante la tecnología pcmc (microcristales revestidos con proteínas). Dichas técnicas se describen en Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21 edición, Hendrickson R. Ed.

Naturalmente, las formulaciones para ser usadas para la administración in vivo tienen que ser estériles; la esterilización puede conseguirse mediante técnicas convencionales, por ejemplo por filtración a través de membranas de filtración estériles.

Puede ser útil aumentar la concentración del anticuerpo anti-CD37 para llegar a una formulación líquida denominada de alta concentración (HCLF); para generar dichas HCLF se han descrito varias formas.

La molécula de anticuerpo anti-CD37 también puede estar contenida en una preparación de liberación sostenida. Dichas preparaciones incluyen matrices sólidas, semisólidas o líquidas de polímeros hidrofóbicos o hidrofílicos y pueden estar en forma de artículos conformados, por ejemplo, películas, barras o microcápsulas y pueden aplicarse mediante un dispositivo de aplicación. Los ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(metacrilato de 2-hidroxietilo) o acetato butirato de sacarosa), o poli(alcohol vinílico)), polilactidas (EEUU 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutámico y γ etil-L-glutamato, copolímeros

no degradables de etileno-acetato de vinilo, copolímeros degradables de ácido láctico-ácido glicólico tales como el LUPRON DEPOT™ (microesferas inyectables compuestas por un copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolida) y poli(ácido D-(-)-3-hidroxibutírico). Aunque los polímeros tales como etileno-acetato de vinilo y ácido láctico-ácido glicólico permiten la liberación de moléculas durante 100 días, ciertos hidrogeles liberan proteínas durante períodos de tiempo más cortos. Cuando los anticuerpos encapsulados permanecen en el cuerpo durante largo tiempo, pueden desnaturalizarse o agregarse como resultado de la exposición a la humedad a 37°C, dando lugar a una pérdida de actividad biológica y a posibles cambios en la inmunogenicidad. Dependiendo del mecanismo implicado pueden idearse estrategias racionales para la estabilización. Por ejemplo, si se descubre que el mecanismo de agregación es la formación de enlaces S-S intermoleculares por medio del intercambio tio-disulfuro, la estabilización puede conseguirse modificando los residuos sulfhidrilo, liofilización (como, por ejemplo, se describe en WO 89/011297) en disoluciones ácidas, controlando el contenido de humedad, usando aditivos apropiados y desarrollando composiciones de matrices poliméricas específicas.

En EEUU 7.060.268 y EEUU 6.991.790 se describen formulaciones que también pueden usarse para la molécula de anticuerpo anti-CD37 de la invención.

La molécula de anticuerpo CD37 también puede incorporarse en otras formas de aplicación, tales como dispersiones, suspensiones o liposomas, comprimidos, cápsulas, polvos, pulverizadores, parches o cremas transdérmicas o intradérmicas con o sin dispositivos que potencien la permeación, obleas, formulaciones nasales, bucales o pulmonares, o pueden producirse mediante células implantadas o – después de terapia génica – mediante las propias células del individuo.

Una molécula de anticuerpo anti-CD37 también puede derivatizarse con un grupo químico tal como polietilenglicol (PEG), un grupo metilo o etilo o un grupo carbohidrato. Estos grupos pueden ser útiles para mejorar las características biológicas del anticuerpo, por ejemplo, para aumentar la semivida en el suero o para aumentar la unión a los tejidos.

El modo preferido de aplicación es parenteral, por infusión o inyección (intravenosa, intramuscular, subcutánea, intraperitoneal, intradérmica), pero también pueden ser aplicables otros modos de aplicación tales como por inhalación, transdérmico, intranasal, bucal u oral.

Para la prevención o el tratamiento de una enfermedad, la dosificación apropiada de anticuerpo dependerá del tipo de enfermedad a ser tratada, de la

gravedad y del curso de la enfermedad, de si el anticuerpo se administra con fines preventivos o terapéuticos, de la terapia previa, de la historia clínica del paciente y de la respuesta al anticuerpo, y del criterio del médico que atiende. El anticuerpo se administra convenientemente al paciente de una vez o durante una serie de tratamientos.

Dependiendo del tipo y de la gravedad de la enfermedad, una dosificación candidata inicial para administrar al paciente es aproximadamente 0,01 µg/kg a 40 mg/kg (por ejemplo, 0,1 - 20 mg/kg) de anticuerpo, por ejemplo, mediante una o más administraciones separadas o mediante infusión continua. Para administraciones repetidas durante varios días o más, dependiendo de la enfermedad, el tratamiento se sostiene hasta que se produzca la supresión deseada de los síntomas de la enfermedad. Sin embargo, pueden ser útiles otros regímenes de dosificación. El progreso de esta terapia se evalúa fácilmente por técnicas y ensayos convencionales, por ejemplo, determinando el grado de supresión de las células B (por ejemplo, utilizando citometría de flujo).

La "cantidad eficaz terapéuticamente" del anticuerpo a ser administrada es la cantidad mínima necesaria para prevenir, mejorar o tratar una enfermedad o trastorno.

La molécula de anticuerpo anti-CD37 de la invención y las composiciones farmacéuticas que la contienen son útiles para suprimir células B que expresan CD37 en su superficie y que causan una enfermedad cancerosa o autoinmune/inflamatoria.

En un primer aspecto, la composición farmacéutica de la invención es útil para el tratamiento de cánceres, en particular de cualquier malignidad CD37 positiva.

Las malignidades de las células B incluyen, sin limitación, linfomas de células B (por ejemplo, varias formas de la enfermedad de Hodgkin, linfoma de células B no-Hodgkin (NHL) y linfomas relacionados (por ejemplo, macroglobulinemia de Waldenström (también denominada linfoma linfoplasmacítico o inmunocitoma) o linfomas del sistema nervioso central), leucemias (por ejemplo, leucemia linfoblástica aguda (ALL), leucemia linfocítica crónica (CLL; también denominada leucemia linfocítica crónica de células B BCLL), leucemia de células vellosas y leucemia mioblástica crónica) y mielomas (por ejemplo, mieloma múltiple). Las malignidades de las células B adicionales incluyen linfoma linfocítico pequeño, leucemia prolinfocítica de células B, linfoma linfoplasmacítico, linfoma esplénico de la zona marginal, mieloma múltiple, plasmacitoma solitario del hueso, plasmacitoma extraóseo, linfoma de células B de la zona marginal extra-nodal del tejido linfoide asociado a la mucosa (MALT), linfoma de células B de la zona marginal nodal, linfoma folicular, linfoma de células del

manto, linfoma de células B grandes difusas, linfoma de células B grandes del mediastino (tímico), linfoma intravascular de células B grandes, linfoma primario de cavidades, linfoma/leucemia de Burkitt, linfoma de la zona gris, proliferaciones de células B con un potencial maligno indeterminado, granulomatosis linfomatoide y trastorno linfoproliferativo posterior a transplantes.

En un aspecto adicional, una composición farmacéutica que contiene anticuerpos anti-CD37 es útil para el tratamiento de enfermedades autoinmunes e inflamatorias que implican células B en su patología.

Dichas enfermedades incluyen, pero no están limitadas a: artritis, artritis reumatoide, artritis reumatoide juvenil, osteoartritis, policondritis, artritis psoriásica, psoriasis, dermatitis, polimiositis/dermatomiositis, miositis de cuerpos de inclusión, miositis inflamatoria, necrolisis epidérmica tóxica, escleroderma y esclerosis sistémico, síndrome de CREST, respuestas asociadas con la enfermedad inflamatoria del intestino delgado, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, síndrome de distrés respiratorio, síndrome de distrés respiratorio del adulto (ARDS), meningitis, encefalitis, uveitis, colitis, glomerulonefritis, condiciones alérgicas, eccema, asma, condiciones que implican infiltración de células T y respuestas inflamatorias crónicas, aterosclerosis, miocarditis autoinmune, deficiencia en la adhesión de leucocitos, lupus eritematoso sistémico (SLE), lupus eritematoso cutáneo subagudo, lupus discoide, lupus mielitis, lupus cerebritis, diabetes juvenil, esclerosis múltiple, encefalomielitis alérgica, neuromielitis óptica, fiebre reumática, corea de Sydenham, respuestas inmunes asociadas con hipersensibilidad aguda y retardada mediada por citoquinas y linfocitos T, tuberculosis, sarcoidosis, granulomatosis incluyendo granulomatosis de Wegener y enfermedad de Churg-Strauss, agranulocitosis, vasculitis (incluyendo vasculitis/angiitis por hipersensibilidad, ANCA y vasculitis reumatoide), anemia aplásica, anemia de Diamond Blackfan, anemia hemolítica inmune incluyendo anemia hemolítica autoinmune (AIHA), anemia perniciosa, aplasia de células rojas pura (PRCA), deficiencia del Factor VIII, hemofilia A, neutropenia autoinmune, pancitopenia, leucopenia, enfermedades que implican diapedesis de leucocitos, trastornos inflamatorios del sistema nervioso central (CNS), síndrome de daño orgánico múltiple, miastenia gravis, enfermedades mediadas por complejos antígeno-anticuerpo, enfermedad por anticuerpos anti-membrana basal glomerular, síndrome del anticuerpo anti-fosfolípido, neuritis alérgica, enfermedad de Behcet, síndrome de Castleman, síndrome de Goodpasture, Síndrome Miasténico de Lambert-Eaton, síndrome de Reynaud, síndrome de Sjorgen, síndrome de Stevens-Johnson, rechazo de

transplante de órganos sólidos, enfermedad de injerto frente a anfitrión (GVHD), penfigoide ampolloso, pénfigo, poliendocrinopatías autoinmunes, espondiloartropatías seronegativas, enfermedad de Reiter, síndrome de la persona rígida, arteritis de células gigantes, nefritis por complejo inmune, nefropatía 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 ovarios incluyendo orquitis y ooforitis autoinmune, hipotiroidismo primario; enfermedades endocrinas autoinmunes incluyendo tiroiditis autoinmune, tiroiditis crónica (Tiroiditis de Hashimoto), tiroiditis subaguda, hipotiroidismo idiopático, enfermedad de Addison, enfermedad de Grave, síndromes poliglandulares autoinmunes (o síndromes poliglandulares endocrinopáticos), diabetes de Tipo I también referida como diabetes mellitus dependiente de insulina (IDDM) y síndrome de Sheehan; hepatitis autoinmune, neumonitis linfoide intersticial (HIV), bronquiolitis obliterante (no-transplante) vs NSIP, Síndrome de Guillain-Barre, vasculitis de vasos grandes (incluyendo polimialgia reumática y arteritis de células gigantes (de Takayasu)), vasculitis de vasos medios (incluyendo la enfermedad de Kawasaki y poliarteritis nodosa), poliarteritis nodosa (PAN), espondilitis anquilosante, enfermedad de Berger (nefropatía IgA), glomerulonefritis de progresión rápida, cirrosis biliar primaria, sprue celíaco (enteropatía por gluten), crioglobulinemia, crioglobulinemia asociada con hepatitis, esclerosis amiotrófica lateral (ALS), enfermedad arterial coronaria, fiebre Mediterránea familiar, poliangiitis microscópica, síndrome de Cogan, síndrome de Whiskott- Aldrich y tromboangiitis obliterante (véase WO 2007/014278).

Dependiendo del trastorno a ser tratado, la molécula de anticuerpo anti-CD37 de la invención puede usarse por sí misma o en combinación con uno o más agentes terapéuticos adicionales, en particular seleccionados de agentes que dañan al ADN o agentes que se unen a la tubulina o de compuestos activos terapéuticamente que inhiben la angiogénesis, las rutas de transducción de señales o los puntos de control mitóticos en las células cancerosas.

El agente terapéutico adicional puede administrarse simultáneamente con, opcionalmente como un componente de la misma preparación farmacéutica, o antes o después de la administración de la molécula de anticuerpo anti-CD37.

En determinadas realizaciones, el agente terapéutico adicional puede ser, sin limitación, uno o más inhibidores seleccionados del grupo de inhibidores de la familia EGFR, familia VEGFR, IGF-1R, Receptores de la insulina, AuroraA, AuroraB, PLK y

PI3 quinasa, FGFR, PDGFR, Raf, KSP o PDK1.

Los ejemplos adicionales de agentes terapéuticos adicionales son inhibidores de CDK, Akt, Src, Bcr-Abl, cKit, cMet/HGF, c-Myc, Flt3, HSP90, antagonistas hedgehog, inhibidores de JAK/STAT, Mek, mTor, NFkappaB, el proteosoma, Rho, un inhibidor de la señalización Wnt o señalización Notch o un inhibidor de la ruta de ubiquitinación.

Los ejemplos de inhibidores de Aurora son, sin limitación, PHA-739358, AZD-1152, AT-9283, CYC-116, R-763, VX-667, MLN-8045, PF-3814735, SNS-314, VX-689, GSK-1070916, TTP-607, PHA-680626, MLN-8237 y ENMD-2076.

Un ejemplo de un agente inhibidor de PLK es GSK-461364.

Los ejemplos de inhibidores de raf son BAY-73-4506 (también un inhibidor de VEGFR), PLX-4032, RAF-265 (también un inhibidor de VEGFR), sorafenib (también un inhibidor de VEGFR), XL-281 y Nevavar (también un inhibidor de VEGFR).

Los ejemplos de inhibidores de KSP son ispinesib, ARRY-520, AZD-4877, CK-1122697, GSK-246053A, GSK-923295, MK-0731, SB-743921, LY-2523355 y EMD-534085.

Los ejemplos de inhibidores de src y/o bcr-abl son dasatinib, AZD-0530, bosutinib, XL-228 (también un inhibidor de IGF-1R), nilotinib (también un inhibidor de PDGFR y cKit), imatinib (también un inhibidor de cKit), NS-187, KX2-391, AP-24534 (también un inhibidor de EGFR, FGFR, Tie2, Flt3), KM-80 y LS-104 (también un inhibidor de Flt3, Jak2).

Un ejemplo de un inhibidor de PDK1 es AR-12.

Un ejemplo de un inhibidor de Rho es BA-210.

Los ejemplos de inhibidores de la PI3 quinasa son PX-866, PX-867, BEZ-235 (también un inhibidor de mTor), XL-147 y XL-765 (también un inhibidor de mTor), BGT-226, CDC-0941.

Los ejemplos de inhibidores de cMet o HGF son XL-184 (también un inhibidor de VEGFR, cKit, Flt3), PF-2341066, MK-2461, XL-880 (también un inhibidor de VEGFR), MGCD-265 (también un inhibidor de VEGFR, Ron, Tie2), SU-11274, PHA-665752, AMG-102, AV-299, ARQ-197, MetMAb, CGEN-241, BMS-777607, JNJ-38877605, PF-4217903, SGX-126, CEP-17940, AMG-458, INCB-028060 y E-7050.

Un ejemplo de un inhibidor de c-Myc es CX-3543.

Los ejemplos de inhibidores de Flt3 son AC-220 (también un inhibidor de cKit y PDGFR), KW-2449, LS-104 (también un inhibidor de bcr-abl y Jak2), MC-2002, SB-1317, lestaurtinib (también un inhibidor de VEGFR, PDGFR, PKC), TG-101348

(también un inhibidor de JAK2), XL-999 (también un inhibidor de cKit, FGFR, PDGFR y VEGFR), sunitinib (también un inhibidor de PDGFR, VEGFR y cKit) y tandutinib (también un inhibidor de PDGFR y cKit).

Los ejemplos de inhibidores de HSP90 son tanespimicina, alvespimicina, IPI-504, STA-9090, MEDI-561, AUY-922, CNF-2024 y SNX-5422.

Los ejemplos de inhibidores de JAK/STAT son CYT-997 (que también interacciona con la tubulina), TG-101348 (también un inhibidor de Flt3) y XL-019.

Los ejemplos de inhibidores de Mek son ARRY-142886, AS-703026, PD-325901, AZD-8330, ARRY-704, RDEA-119 y XL-518.

Los ejemplos de inhibidores de mTor son temsirolimus, deforolimus (que también actúa como un inhibidor de VEGF), everolimus (además un inhibidor de VEGF). XL-765 (también un inhibidor de la PI3 quinasa) y BEZ-235 (también un inhibidor de la PI3 quinasa).

Los ejemplos de inhibidores de Akt son perifosina, GSK-690693, RX-0201 y triciribina.

Los ejemplos de inhibidores de cKit son masitinib, OSI-930 (también actúa como un inhibidor de VEGFR), AC-220 (también un inhibidor de Flt3 y PDGFR), tandutinib (también un inhibidor de Flt3 y PDGFR), axitinib (también un inhibidor de VEGFR y PDGFR), sunitinib (también un inhibidor de Flt3, PDGFR, VEGFR) y XL-820 (también actúa como un inhibidor de VEGFR y PDGFR), imatinib (también un inhibidor de bcr-abl), nilotinib (también un inhibidor de bcr-abl y PDGFR).

Los ejemplos de antagonistas hedgehog son IPI-609, CUR-61414, GDC-0449, IPI-926 y XL-139.

Los ejemplos de inhibidores de CDK son seliciclib, AT-7519, P-276, ZK-CDK (también inhibe VEGFR2 y PDGFR), PD-332991, R-547, SNS-032, PHA-690509, PHA-848125 y SCH-727965.

Los ejemplos de inhibidores de proteosomas son bortezomib, carfilzomib y NPI-0052 (también un inhibidor de NFkappaB).

Los ejemplos de inhibidores del proteosoma/inhibidores de la ruta NFkappaB son bortezomib, carfilzomib, NPI-0052, CEP-18770, MLN-2238, PR-047, PR-957, AVE-8680 y SPC-839.

Un ejemplo de un inhibidor de la ruta de ubiquitinación es HBX-41108.

Los ejemplos de agentes antiangiogénicos son inhibidores de FGFR, PDGFR y VEGF(R), y talidomidas, seleccionándose dichos agentes, sin limitación, de bevacizumab, motesanib, CDP-791, SU-14813, telatinib, KRN-951, ZK-CDK (también

un inhibidor de CDK), ABT-869, BMS-690514, RAF-265, IMC-KDR, IMC-18F1, IMiDs, talidomida, CC-4047, lenalidomida, ENMD-0995, IMC-D11, Ki-23057, brivanib, cediranib, 1B3, CP-868596, IMC-3G3, R-1530 (también un inhibidor de Flt3), sunitinib (también un inhibidor de cKit y Flt3), axitinib (también un inhibidor de cKit), lestaurtinib (también un inhibidor de Flt3 y PKC), vatalanib, tandutinib (también un inhibidor de Flt3 y cKit), pazopanib, PF-337210, aflibercept, E-7080, CHIR-258, tosilato de sorafenib (también un inhibidor de Raf), vandetanib, CP-547632, OSI-930, AEE-788 (también un inhibidor de EGFR y Her2), BAY-57-9352 (también un inhibidor de Raf), BAY-73-4506 (también un inhibidor de Raf), XL-880 (también un inhibidor de cMet), XL-647 (también un inhibidor de EGFR y EphB4), XL-820 (también un inhibidor de cKit), nilotinib (también un inhibidor de cKit y brc-abl), CYT-116, PTC-299, BMS-584622, CEP-11981, dovitinib, CY-2401401 y ENMD-2976.

El agente terapéutico adicional también puede seleccionarse de inhibidores de EGFR, puede ser una molécula pequeña inhibidora de EGFR o un anticuerpo anti-EGFR. Los ejemplos de anticuerpos anti-EGFR, sin limitación, son cetuximab, panitumumab, nimotuzumab, zalutumumab; los ejemplos de moléculas pequeñas inhibidoras de EGFR son gefitinib, erlotinib y vandetanib (también un inhibidor de VEGFR). Otro ejemplo de un agente modulador de EGFR es la toxina de fusión EGF.

Los inhibidores adicionales de EGFR y/o Her2 útiles para combinarse con una molécula de anticuerpo anti-CD37 de la invención son lapatinib, trastuzumab, pertuzumab, XL-647, neratinib, BMS-599626 ARRY-334543, AV-412, mAB-806, BMS-690514, JNJ-26483327, AEE-788 (también un inhibidor de VEGFR), AZD-8931, ARRY-380 ARRY-333786, IMC-11F8, Zemab, TAK-285, AZD-4769.

El fármaco adicional también puede seleccionarse de agentes dirigidos a las rutas de señalización de IGF-1R y del receptor de la insulina. Dichos agentes incluyen anticuerpos que se unen a IGF-1R (por ejemplo, CP-751871, AMG-479, IMC-A12, MK-0646, AVE-1642, R-1507, BIIB-022, SCH-717454, rhu Mab IGFR y entidades químicas nuevas dirigidas al dominio quinasa de IGF1-R (por ejemplo, OSI-906 o BMS-554417, XL-228, BMS-754807).

Otros agentes que pueden combinarse ventajosamente en una terapia con la molécula de anticuerpo anti-CD37 de la invención son moléculas dirigidas a CD20, incluyendo anticuerpos específicos de CD20 como rituximab, LY-2469298, ocrelizumab, MEDI-552, IMMU-106, GA-101 (= R7159), XmAb-0367, ofatumumab, anticuerpos frente a CD20 marcados radiactivamente como tositumumab e ibritumomab tiuxetán u otras proteínas dirigidas a CD20 como SMIP Tru015, PRO-

131921, FBT-A05, veltuzumab, R-7159.

Los anticuerpos CD37 pueden combinarse con inhibidores de otros antígenos de superficie expresados en leucocitos, en particular anticuerpos o moléculas semejantes a anticuerpos, por ejemplo, anti-CD2 (siplizumab), anti-CD4 (zanolimumab), anti-CD19 (MT-103, MDX-1342, SAR-3419, XmAb-5574), anti-CD22 (epratuzumab), anti-CD23 (lumiliximab), anti-CD30 (iratumumab), anti-CD32B (MGA-321), anti-CD38 (HuMax-CD38), anti-CD40 (SGN40), anti-CD52 (alemtuzumab), anti-CD80 (galiximab). Un anticuerpo de la invención también puede combinarse con otro antagonista de CD37, por ejemplo, TRU-016.

Otros agentes que pueden combinarse con anticuerpos CD37 son inmunotoxinas como BL-22 (una inmunotoxina anti-CD22), inotuzumab ozogamicin (un conjugado anticuerpo anti-CD23-caliqueamicina), RFT5.dgA (cadena A de la toxina Ricina anti-CD25), SGN-35 (un conjugado anti-CD30-auristatina E) y gemtuzumab ozogamicina (un conjugado anti-CD33 caliqueamicina), MDX-1411 (conjugado anti-CD70) o anticuerpos marcados radiactivamente como ^{90}I-epratuzumab (radioinmunoconjugado anti-CD22).

Además, los anticuerpos anti-CD37 pueden combinarse con agentes inmunomoduladores, por ejemplo, anticuerpos, que inducen apoptosis o modifican las rutas de transducción de las señales como los moduladores del receptor TRAIL mapatumumab (un agonista del receptor TRAIL-1), lexatumumab (un agonista del receptor TRAIL-2), tigatuzumab, Apomab, AMG-951 y AMG-655; , un anticuerpo anti-HLA-DR (como 1D09C3), un anti-CD74, un inhibidor del ligando del factor de diferenciación de osteoclastos (como denosumab), un antagonista de BAFF (como AMG-623a) o un agonista de un receptor semejante a Toll (por ejemplo, TLR-4 o TLR-9).

Otros fármacos que pueden utilizarse en combinación con las moléculas de anticuerpo anti-CD37 de la presente invención se seleccionan de, pero no se limitan a, hormonas, análogos de hormonas y antihormonas (por ejemplo, tamoxifeno, toremifeno, raloxifeno, fulvestrant, acetato de megestrol, flutamida, nilutamida, bicalutamida, acetato de ciproterona, finasterida, acetato de buserelina, fludrocortinsona, fluoximesterona, medroxiprogesterona, caproato de hidroxiprogesterona, dietilestilbestrol, propionato de testosterona, fluoximesterona/equivalentes, octreotida, arzoxifeno, pasireotida, vapreotida, adrenocorticosteroides/ antagonistas, prednisona, dexametasona, ainoglutetimida), inhibidores de aromatasa (por ejemplo, anastrozol, letrozol, liarozol, exemestano,

atamestano, formestano), agonistas y antagonistas de LHRH (por ejemplo, acetato de goserelina, leuprolida, abarelix, cetrorelix, deslorelina, histrelina, triptorelina), antimetabolitos (por ejemplo, antifolatos como metotrexato, trimetrexato, pemetrexed, análogos de pirimidina como 5-fluorouracilo, fluorodesoxiuridina, capecitabina, decitabina, nelarabina, 5-azacitidina y gemcitabina, análogos de purina y adenosina tales como mercaptopurina, tioguanina, azatioprina, cladribina y pentostatina, citarabina, fludarabina, clofarabina); antibióticos antitumorales (por ejemplo, antraciclinas como doxorrubicina, daunorrubicina, epirrubicina e idarrubicina, mitomicina-C, bleomicina dactinomicina, plicamicina, esplicamicina, actimomicina D, mitoxantrona, mitoxantroneidarrubicina, pixantrona, estreptozocina, afidicolina); derivados del platino (por ejemplo, cisplatino, oxaliplatino, carboplatino, lobaplatino, satraplatino); agentes alquilantes (por ejemplo, estramustina, semustina, mecloretamina, melfalán, clorambucilo, busulfán, dacarbazina, ciclofosfamida, ifosfamida, hidroxiurea, temozolomida, nitrosoureas tales como carmustina y lomustina, tiotepa); agentes antimitóticos (por ejemplo, alcaloides de la vinca como vinblastina, vindesina, vinorelbina, vinflunina y vincristina; y taxanos como paclitaxel, docetaxel y sus formulaciones, larotaxel; simotaxel, y epotilonas como ixabepilona, patupilona, ZK-EPO); inhibidores de topoisomerasa (por ejemplo, epipodofilotoxinas como etopósido y etopofos, teniposida, amsacrina, topotecán, irinotecán, banoxantrona, camptotecina) y quimioterapéuticos misceláneos tales como derivados del ácido retinoico, amifostina, anagrelida, interferón alfa, interferón beta, interferón gamma, interleuquina-2, procarbazina, N-metilhidrazina, mitotano y porfimer, bexaroteno, celecoxib, etilenmina/metil-melamina, trietiienmelamina, trietilen tiofosforamida, hexametilmelamina y enzimas L-asparaginasa, L-arginasa y metronidazol, misonidazol, desmetilmisonidazol, pimonidazol, etanidazol, nimorazol, RSU 1069, EO9, RB 6145, SR4233, nicotinamida, 5-bromodesoxiuridina, 5-yododesoxiuridina, bromodesoxicitidina, eritrohidroxinonil-adenina, antracendiona, GRN-163L (un antagonista competitivo del molde de telomerasa), SDX-101 (un agonista de PPAR), talabostat (un inhibidor de DPP), forodesina (un inhibidor de PNP), atacicept (un receptor soluble dirigido a los miembros de la familia TNF BLyS y APRIL), agentes neutralizantes de TNF-alfa (Enbrel, Humira, Remicade), XL-844 (un inhibidor de CHK1/2), VNP-40101M (un agente alquilante de ADN), SPC-2996 (un inhibidor antisentido de bcl2), obatoclax (un inhibidor de bcl2), enzastaurin (un modulador de PKC beta), vorinistat (un inhibidor de HDAC), romidepsina (un inhibidor de HDAC), AT-101 (un inhibidor de Bcl-2/Bcl-xL), plitidepsina (un depsipéptido con

múltiples acciones), SL-11047 (un modulador del metabolismo de las poliaminas).

En determinadas realizaciones, la molécula de anticuerpo anti-CD37 se aplica junto con "CHOP" (una combinación de ciclofosfamida, doxorrubicina, vincristina y prednisona).

La molécula de anticuerpo anti-CD37 de la invención también puede utilizarse en combinación con otras terapias incluyendo cirugía, radioterapia, terapia endocrina, modificadores de la respuesta biológica, hipertermia y crioterapia y agentes para atenuar cualquier efecto adverso (por ejemplo, antieméticos), G-CSF, GM-CSF, fotosensibilizadores tales como derivados de hematoporfirina, Photofrin®, derivados de benzoporfirina, Npe6, etioporfirina estaño, feoboride-una bacterioclorofila-a, naftalocianinas, ftalocianinas, ftalocianinas de cinc.

Los anticuerpos monoclonales muestran una especificidad de antígeno exquisita y frecuentemente sólo reaccionan con el antígeno diana humano pero no con proteínas homólogas de especies animales. Para apoyar el desarrollo de anticuerpos terapéuticos, son deseables modelos animales apropiados para evaluar la toxicidad y comportamiento farmacodinámico *in vivo*. Una posibilidad para un modelo *in vivo* es un ratón transgénico en el que el antígeno diana endógeno se reemplaza por su homólogo humano ("ratón knock-out/ knock-in"). En particular, para desarrollar anticuerpos anti-CD37 terapéuticos, el gen CD37 murino puede reemplazarse por el gen CD37 humano. Esto puede conseguirse construyendo un vector de direccionamiento que contiene la secuencia genómica codificadora del gen CD37 humano flanqueada por secuencias que no se traducen. Este vector de direccionamiento puede utilizarse para recombinación homóloga utilizando células ES de ratón. Los animales transgénicos homocigotos para la expresión de CD37 humano pueden utilizarse para evaluar el efecto farmacodinámico de anticuerpos dirigidos frente a CD37 humano, por ejemplo, evaluando el número de células B periféricas después de la aplicación de los anticuerpos. Alternativamente, estos ratones pueden utilizarse para investigar efectos tóxicos potenciales de anticuerpos específicos de CD37 humano después de una aplicación i.v.

Otra posibilidad en el caso en el que no exista reactividad cruzada animal de los anticuerpos monoclonales es la generación de un anticuerpo denominado sustituto. Un anticuerpo sustituto es un anticuerpo que reacciona con la proteína homóloga de una especie animal que es relevante y útil para la investigación de los efectos farmacodinámicos y tóxicos, por ejemplo, el ratón o el mono cinomolgus. En el caso de CD37, se desarrollan anticuerpos monoclonales que son específicos para CD37 de macaco o CD37 de ratón, respectivamente. Idealmente, dicho anticuerpo sustituto

debería tener propiedades similares de unión y funcionales respecto al anticuerpo de desarrollo. Esto puede investigarse mediante la utilización de sistemas de ensayo que utilizan células que expresan CD37 de macaco o de ratón como células diana, por ejemplo, para unión, análisis de Scatchard por FACS, ensayos de ADCC y apoptosis. Finalmente, el anticuerpo sustituto puede seleccionarse gracias a su actividad supresora de células B en sangre de macaco o de ratón in vitro.

Descripción Breve de las Figuras:

Fig. 1: El Anticuerpo Quimérico A0 reconoce específicamente el antígeno CD37, determinado por ensayo de competición por FACS

Fig. 2: Unión de versiones humanizadas de A0 al antígeno CD37 celular, determinada por FACS

Fig. 3: Unión de versiones humanizadas de A0 al antígeno CD37 celular, determinada por FACS

Fig. 4: Afinidad de versiones humanizadas de A0 por el antígeno CD37 celular, determinada por análisis de scatchard por FACS

Fig. 5: Actividad ADCC de versiones humanizadas de A0 en células Ramos

Fig. 6: Actividad pro-apoptótica de versiones humanizadas de A0 en células Ramos

Fig. 7: Actividad ADCC de versiones con Fc modificada por ingeniería del mAb A0 en células Ramos

Fig. 8: Actividad ADCC de versiones con Fc modificada por ingeniería del mAb B0 en células Ramos

Fig. 9: Actividad pro-apoptótica de mAb A0 y B0

Fig. 10: Actividad pro-apoptótica de versiones con Fc modificada por ingeniería del mAb A0

Fig. 11 A: Supresión de células B humanas normales en un ensayo con sangre completa por anticuerpos A2 y B2 con Fc modificada por ingeniería en comparación con Rituximab

Fig. 11 B: Actividad supresora de células B superior de los anticuerpos después de la modificación de Fc por ingeniería en comparación con Rituximab

Fig. 11 C: Anticuerpos A2 y B2 no agotan células T y monocitos en ensayos con sangre completa

Fig. 12: Actividad ADCC superior después de la modificación de Fc por ingeniería comparada con Rituximab

Fig. 13: Supresión de células Ramos del linfoma de Burkitt en un ensayo con sangre completa por anticuerpos A2 y B2 con Fc modificada por ingeniería en comparación con Rituximab

Fig. 14: Inhibición del crecimiento tumoral in vivo de tumores de xenoinjerto Ramos en ratones desnudos por anticuerpos A2 y B2 con Fc modificada por ingeniería

Fig. 15: Expresión de CD37 en células de mieloma múltiple

Fig. 16: Actividad ADCC de los anticuerpos A2 y B2 en células de mieloma múltiple

Fig. 17: Actividad pro-apoptótica de los anticuerpos A2 y B2 sobre células CLL derivadas de pacientes

Ejemplo 1

Generación de anticuerpos anti-CD37 quiméricos y humanizados

a) Generación del anticuerpo quimérico A0

Tomando como base las secuencias de aminoácidos de la cadena pesada y ligera variable mostradas en SEQ ID NO:2 y SEQ ID NO:4, se sintetizan las secuencias de ADN correspondientes aplicando la utilización de codones optimizada para las células de mamíferos (GeneArt, Regensburg, Alemania), añadiendo en el extremo 5' un sitio de clonación HindIII y en el extremo 3' un sitio de clonación BamH1. Las moléculas de ADN sintetizadas se digieren con HindIII y BamHI y los fragmentos de ADN resultantes (SEQ ID NO:1 y SEQ ID NO:3 más sitios de restricción) se clonan en vectores de expresión basados en pcADN3.1 que codifican la región constante de IgG1 humana y la región constante de la cadena ligera kappa humana, respectivamente (SEQ ID NO:24 y SEQ ID NO:26). Se preparan preparaciones de plásmidos EndoFree (Qiagen) y los plásmidos de la cadena pesada y ligera se co-transfectan en células freestyle HEK293 (Invitrogen) a una concentración de cada plásmido de 1 mg/L según el protocolo del proveedor. Después de 72 horas el sobrenadante se recoge y la concentración de IgG se determina mediante ELISA. El anticuerpo anti-CD37 quimérico resultante (designado A0) se purifica en una columna de proteína A modificada (GE Healthcare), se eluye en un tampón citrato y se dializa en PBS.

b) Generación de versiones humanizadas del anticuerpo quimérico A0

La humanización del mAb quimérico A0, como se obtiene en a), se realiza utilizando un método de injerto de CDR, como se describe, por ejemplo, en EEUU 5.225.539; EEUU 6.548.640; EEUU 6.982.321.

Para establecer un modelo estructural del dominio VL del mAb A0, se elige un molde estructural del Banco de Datos de Proteínas (PDB) del Brookhaven National Laboratory. El dominio VL de la entrada del anticuerpo monoclonal murino "1KB5" se elige con un 88% de identidad de secuencia / 81% de similitud y 2,5 Å de resolución. Para el dominio VH del mAb A0, se elige la misma estructura de anticuerpo monoclonal de ratón "1KB5" con 90% de identidad de secuencia y 91 % de similitud como el molde principal de modelado. Se encuentra que el mejor ajuste para el marco de consenso humano es del tipo Vkappa1 humano (hVK1) y VH1 humano (hVH1). Como un diseño alternativo, se elige un injerto de los dominios consenso humanos más estables hVK3 y hVH3. Para el injerto, los modelos de los mAb A0_VL y mAb A0_VH se combinan con los modelos de los dominios consenso humanos hVK1, hVK3, hVH1A y hVH3 y se combinan para producir modelos Fv. El injerto de bucles se realiza incluyendo las regiones CDR del mAb A0 murino en los marcos de anticuerpo humano y se sintetizan las moléculas de ADN de las construcciones de cadenas humanizadas.

Las regiones variables humanizadas respectivas se sintetizan y se clonan en vectores de expresión de inmunoglobulinas y se expresan de manera transitoria en el sistema de expresión HEK 293 freestyle (Invitrogen), como se describe en a), en las combinaciones de secuencias de cadenas pesadas y ligeras como se muestra en la Tabla 1 y se purifican en columnas de proteína A.

Tabla 1

Secuencias de cadenas pesadas y ligeras variables de los anticuerpos anti-CD37 quiméricos y humanizados utilizados en los Ejemplos.

Anticuerpo	Cadena Pesada SEQ ID NO: aa/ADN	Cadena Ligera SEQ ID NO: aa/ADN
A (=A0)	seq 2/1	seq 4/3
B	seq 6/5	seq 12/11
C	seq 6/5	seq 14/13
D	seq 6/5	seq 16/15
H	seq 8/7	seq 18/17
I	seq 8/7	seq 20/19

J	seq 8/7	seq 22/21
K	seq 10/9	seq 18/17
L	seq 10/9	seq 20/19
M	seq 10/9	seq 22/21

c) Generación de anticuerpos anti-CD37 quiméricos y humanizados con Fc modificada por ingeniería

La generación de mutantes de Fc se realiza como describen Lazar et al., 2006. La secuencia de cadena pesada con Fc modificada por ingeniería resultante se introduce en el vector de expresión pAD-CMV1 (descrito en EP 393 438) y se co-transfecta junto con un plásmido que contiene la secuencia codificadora de la cadena ligera en células CHO-DG44. El anticuerpo se recoge del medio de cultivo celular 5 a 7 días después de la transfección y se purifica mediante cromatografía en proteína A, se eluye en un tampón citrato y se dializa en PBS. El contenido proteico de las muestras se determina mediante Proteína A HPLC, el contenido en endotoxinas se determina mediante Kinetic-QCL Kinetic Chromogenic Assay (Lonza). El contenido en monómero de las muestras se determina mediante HP-SEC, todas las muestras utilizadas para el ensayo funcional muestran un contenido en monómero > 95%.

Tabla 2

Secuencias de cadenas pesadas y ligeras variables (columnas III y IV) y mutaciones en Fc (columna II) de los anticuerpos anti-CD37 quiméricos y humanizados (el anticuerpo A0, B0, C0 etc. es idéntico al anticuerpo A y B, C etc. de la Tabla 1).

(Las secuencias en la columna V marcadas con * se refieren a la secuencia de IgG1 de las SEQ ID Nºs 24 y 23 (secuencias de tipo salvaje) que han sido modificadas para que tengan la o las sustituciones correspondientes a la columna II, y la o las respectivas mutaciones en el ADN codificante).

Ab	Sustitución/sustituciones en Fc (numeración de Kabat)	SEQ ID NO: cadena pesada v aa/ADN	SEQ ID NO: cadena ligera v aa/ADN	SEQ ID NO: cadena pesada completa aa/ADN	SEQ ID NO: cadena ligera completa aa/ADN
A0	-	seq 2/1	seq 4/3	2/1 fusionada a 24/23	4/3 fusionada a 26/25
A1	I332E	seq 2/1	seq 4/3	2/1 fusionada a 24*/23*	4/3 fusionada a 26*/25*
A2	S239D/I332E	seq 2/1	seq 4/3	28/27	30/29
A3	I332E/G236A	seq 2/1	seq 4/3	2/1 fusionada a 24*/23*	4/3 fusionada a 26/25
A4	S239D/I332E/G236A	seq 2/1	seq 4/3	32/31	34/33
B0	-	seq 6/5	seq 12/11	6/5 fusionada a 24/23	12/11 fusionada a 26/25
B1	I332E	seq 6/5	seq 12/11	6/5 fusionada a 24*/23*	12/11 fusionada a 26/25
B2	S239D/I332E	seq 6/5	seq 12/11	36/35	38/37
B3	I332E/G236A	seq 6/5	seq 12/11	6/5 fusionada a 24*/23*	12/11 fusionada a 26/25
B4	S239D/I332E/G236A	seq 6/5	seq 12/11	40/39	42/41
C0	-	seq 6/5	seq 14/13	6/5 fusionada a 24/23	14/13 fusionada a 26/25
C1	I332E	seq 6/5	seq 14/13	6/5 fusionada a 24*/23*	14/13 fusionada a 26/25
C2	S239D/I332E	seq 6/5	seq 14/13	6/5 fusionada a 24*/23*	14/13 fusionada a 26/25
C3	I332E/G236A	seq 6/5	seq 14/13	6/5 fusionada a 24*/23*	14/13 fusionada a 26/25
C4	S239D/I332E/G236A	seq 6/5	seq 14/13	6/5 fusionada a 24*/23*	14/13 fusionada a 26/25
D0	-	seq 6/5	seq 16/15	6/5 fusionada a 24/23	16/15 fusionada a 26/25
D1	I332E	seq 6/5	seq 16/15	6/5 fusionada a 24*/23*	16/15 fusionada a 26/25
D2	S239D/I332E	seq 6/5	seq 16/15	6/5 fusionada a 24*/23*	16/15 fusionada a 26/25

Ab	Sustitución/sustituciones en Fc (numeración de Kabat)	SEQ ID NO: cadena pesada v aa/ADN	SEQ ID NO: cadena ligera v aa/ADN	SEQ ID NO: cadena pesada completa aa/ADN	SEQ ID NO: cadena ligera completa aa/ADN
D3	I332E/G236A	seq 6/5	seq 16/15	6/5 fusionada a 24*/23*	16/15 fusionada a 26/25
D4	S239D/I332E/G236A	seq 6/5	seq 16/15	6/5 fusionada a 24*/23*	16/15 fusionada a 26/25
H0	-	seq 8/7	seq 18/17	8/7 fusionada a 24/23	18/17 fusionada a 26/25
H1	I332E	seq 8/7	seq 18/17	8/7 fusionada a 24*/23*	18/17 fusionada a 26/25
H2	S239D/I332E	seq 8/7	seq 18/17	8/7 fusionada a 24*/23*	18/17 fusionada a 26/25
H3	I332E/G236A	seq 8/7	seq 18/17	8/7 fusionada a 24*/23*	18/17 fusionada a 26/25
H4	S239D/I332E/G236A	seq 8/7	seq 18/17	8/7 fusionada a 24*/23*	18/17 fusionada a 26/25
I-0	-	seq 8/7	seq 20/19	8/7 fusionada a 24/23	20/19 fusionada a 26/25
I-1	I332E	seq 8/7	seq 20/19	8/7 fusionada a 24*/23*	20/19 fusionada a 26/25
I-2	S239D/I332E	seq 8/7	seq 20/19	8/7 fusionada a 24*/23*	20/19 fusionada a 26/25
I-3	I332E/G236A	seq 8/7	seq 20/19	8/7 fusionada a 24*/23*	20/19 fusionada a 26/25
I-4	S239D/I332E/G236A	seq 8/7	seq 20/19	8/7 fusionada a 24*/23*	20/19 fusionada a 26/25
J0	-	seq 8/7	seq 22/21	8/7 fusionada a 24/23	22/21 fusionada a 26/25
J1	I332E	seq 8/7	seq 22/21	8/7 fusionada a 24*/23*	22/21 fusionada a 26/25
J2	S239D/I332E	seq 8/7	seq 22/21	8/7 fusionada a 24*/23*	22/21 fusionada a 26/25
J3	I332E/G236A	seq 8/7	seq 22/21	8/7 fusionada a	22/21 fusionada a

Ab	Sustitución/sustituciones en Fc (numeración de Kabat)	SEQ ID NO: cadena pesada v aa/ADN	SEQ ID NO: cadena ligera v aa/ADN	SEQ ID NO: cadena pesada completa aa/ADN	SEQ ID NO: cadena ligera completa aa/ADN
				24*/23*	26/25
J4	S239D/I332E/G236A	seq 8/7	seq 22/21	8/7 fusionada a 24*/23*	22/21 fusionada a 26/25
K0	-	seq 10/9	seq 18/17	10/9 fusionada a 24/23	18/17 fusionada a 26/25
K1	I332E	seq 10/9	seq 18/17	10/9 fusionada a 24*/23*	18/17 fusionada a 26/25
K2	S239D/I332E	seq 10/9	seq 18/17	10/9 fusionada a 24*/23*	18/17 fusionada a 26/25
K3	I332E/G236A	seq 10/9	seq 18/17	10/9 fusionada a 24*/23*	18/17 fusionada a 26/25
K4	S239D/I332E/G236A	seq 10/9	seq 18/17	10/9 fusionada a 24*/23*	18/17 fusionada a 26/25
L0	-	seq 10/9	seq 20/19	10/9 fusionada a 24/23	20/19 fusionada a 26/25
L1	I332E	seq 10/9	seq 20/19	10/9 fusionada a 24*/23*	20/19 fusionada a 26/25
L2	S239D/I332E	seq 10/9	seq 20/19	10/9 fusionada a 24*/23*	20/19 fusionada a 26/25
L3	I332E/G236A	seq 10/9	seq 20/19	10/9 fusionada a 24*/23*	20/19 fusionada a 26/25
L4	S239D/I332E/G236A	seq 10/9	seq 20/19	10/9 fusionada a 24*/23*	20/19 fusionada a 26/25
M0	-	seq 10/9	seq 22/21	10/9 fusionada a 24/23	22/21 fusionada a 26/25
M1	I332E	seq 10/9	seq 22/21	10/9 fusionada a 24*/23*	22/21 fusionada a 26/25
M2	S239D/I332E	seq 10/9	seq 22/21	10/9 fusionada a 24*/23*	22/21 fusionada a 26/25
M3	I332E/G236A	seq 10/9	seq 22/21	10/9 fusionada a 24*/23*	22/21 fusionada a 26/25

Ab	Sustitución/sustituciones en Fc (numeración de Kabat)	SEQ ID NO: cadena pesada v aa/ADN	SEQ ID NO: cadena ligera v aa/ADN	SEQ ID NO: cadena pesada completa aa/ADN	SEQ ID NO: cadena ligera completa aa/ADN
M4	S239D/I332E/G236A	seq 10/9	seq 22/21	10/9 fusionada a 24*/23*	22/21 fusionada a 26/25

Ejemplo 2

El mAb quimérico A0 reconoce específicamente el antígeno CD37

La especificidad del MAb A0 para CD37 celular se ensaya en un ensayo de competición por FACS en células Ramos de linfoma de Burkitt (ATCC #CRL-1596). Las células se crecen en frascos de cultivo de tejidos (175 cm^2) utilizando RPMI-1640 + GlutaMAX suplementado con 10% de suero fetal bovino inactivado con calor, 12,5 mM HEPES, 1 mM piruvato de sodio, 1% de MEM aminoácidos no esenciales como medio de cultivo. Las células se cultivan con una densidad inicial de $3x10^5$ células/ml a 37°C y 5% CO_2 en una atmósfera humidificada durante tres días. Los cultivos se mantienen a una concentración celular entre $3x10^5$ y $1,8x10^6$/ml por sub-cultivo en una proporción 1:6 con medio de cultivo fresco 2-3 veces por semana. Para el análisis de competición por FACS, se utiliza el mAb HH1 específico de CD37 (Santa Cruz) marcado directamente con ficoeritrina (PE) a una concentración de 1 µg/ml. El anticuerpo se preincuba con el anticuerpo competidor sin marcar A0 durante 10 min a 4°C en la proporción molar indicada. Posteriormente, se incuban $1x10^5$ células Ramos durante 30 min con la mezcla de anticuerpos en hielo. Posteriormente, las células se lavan dos veces en disolución salina tamponada con fosfato (PBS), se resuspenden en tampón FACS y se miden en un BD FACS Canto. Los resultados de dicho ensayo se muestran en la Figura 1. La adición de un anticuerpo IgG1 control humano (Sigma IgG1 kappa) en un exceso molar de 20 veces no reduce significativamente la intensidad media de fluorescencia (MFI) de las células Ramos. La adición del anticuerpo HH1 o del anticuerpo A0 sin marcar en un exceso molar de 20 veces suprimió casi completamente la unión del anticuerpo HH1 marcado directamente. Esto indica que los anticuerpos A0 y HH1 reconocen epítopos idénticos o similares en las células Ramos y que compiten para unirse al antígeno CD37 celular.

Ejemplo 3

Unión de versiones humanizadas del mAb A0 al antígeno CD37 celular

Las versiones humanizadas de A0 se ensayan para determinar su unión al antígeno CD37 celular por análisis FACS. Los anticuerpos se añaden a las células Ramos en las concentraciones indicadas y se permite que se unan durante 30 min a 4°C. Posteriormente, el anticuerpo unido se detecta con anticuerpo anti-IgG humana de cabra marcado con PE (Sigma), las células se lavan dos veces con PBS y posteriormente las células se resuspenden en tampón FACS y se analizan por FACS en un BD FACS Canto. Se muestran ejemplos en las Figuras 2 y 3 (anticuerpos A, B, C, D, I o A, H, I, J, K, L y M, respectivamente; véase la Tabla 1). Varias de las versiones humanizadas de A0 muestran una unión similar a las células Ramos respecto al anticuerpo parental A0, lo que indica que la humanización no reduce la unión al antígeno CD37 celular.

Ejemplo 4

Análisis scatchard por FACS de las versiones humanizadas del mAb quimérico A0

La afinidad de las versiones humanizadas del anticuerpo A0 (designadas B, C, D, H, I y K; véase la Tabla 1) para el antígeno CD37 celular se determina por análisis scatchard por FACS como se describe en otra parte (Brockhoff et al., 1994). Brevemente, se preparan diluciones del anticuerpo en una placa de 96 pocillos empezando con 100-400 nM en el primer pocillo (80 µl), seguido de 11 etapas de dilución (1:2, 40 + 40 µl). 50 µl de las diluciones del mAb se añaden a tubos FACS, 150 µl de células ($0,8x10^6$/ ml=$1,2x10^5$ células/tubo) se añaden a cada tubo FACS. Las células se mezclan suavemente y se incuban durante 1 h en hielo. Posteriormente, se añaden 50 µl de anticuerpo secundario conjugado con FITC (conc.15 µg/ml; mAb de ratón anti-todas las subclases de IgG humana, Zymed 05-4211) se mezcla y se incuba durante 30 min. en hielo. Posteriormente, se añaden 4 ml de PBS ph7,2 que contiene 0,02% de ácido, las células se sedimentan y se resuspenden en 300 µl de PBS pH 7,2 y se someten a análisis por FACS utilizando un BD FACS Canto. Todas las etapas experimentales se realizan en hielo común, todas las diluciones de anticuerpo se hacen en PBS/ 0,5%BSA + 0,02% de ácido. La calibración de FACS se realiza utilizando Quantum FITC MESF (Premix) High Level Beads (Bangs Laboratories). Todas las muestras se miden utilizando los mismos parámetros FACS. La proporción de IgG unida frente a IgG libre se calcula a partir de los valores MFI a diferentes

concentraciones de anticuerpo y se muestran como una representación scatchard. La Figura 4 muestra la relación MFI/ concentración de anticuerpo de varias variantes humanizadas de A0. Los resultados muestran una unión similar a las células Ramos de algunas de las versiones humanizadas respecto al anticuerpo de partida, con constantes de disociación (K_d) que varían de 2,15 a 4,90 nanomoles/litro.

Ejemplo 5

Actividad ADCC de versiones humanizadas del mAb quimérico A0

La capacidad de las versiones humanizadas de A0 (designadas B, C, D, H, J, K; véase la Tabla 1) para mediar la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC) se evalúa utilizando células Ramos como células diana y PBMC humanas estimuladas con IL-2 como células efectoras. Las células Ramos (linfoma de Burkitt; ATCC #CRL-1596) se obtuvieron de ATCC. Las células se crecen en frascos de cultivo de tejidos (175 cm^2) utilizando RPMI-1640 + GlutaMAX suplementado con 10% de suero fetal bovino inactivado con calor, 12,5 mM HEPES, 1 mM piruvato de sodio, 1% de MEM aminoácidos no esenciales como medio de cultivo. Las células se cultivan con una densidad inicial de $3x10^5$ células/ml a 37°C y 5% CO_2 en una atmósfera humidificada durante tres días. Los cultivos se mantienen a una concentración celular entre $3x10^5$ y $1,8x10^6$/ml por sub-cultivo en una proporción 1:6 con medio de cultivo fresco 2-3 veces por semana. Una alicuota del cultivo celular a una densidad celular entre $1,5x10^6$/ml y $1,8x10^6$/ml y creciendo en la fase log se centrifuga (200 x g, es decir, 1.000 rpm) durante 10 min. Las células se lavan una vez con medio de lavado (RPMI 1640 sin L-glutamina) y se sedimentan (200 x g, es decir, 1.000 rpm; 10 min). El sedimento celular se resuspende en medio de ensayo [1% BSA en RPMI sin L-glutamina] y se determina el número de células. La concentración celular se ajusta a $2x10^5$/ml.

Se utilizan aproximadamente 50 - 80 ml de sangre completa obtenida de donantes sanos para el aislamiento de PBMC. Se diluyen 10 ml de sangre completa 1:3,6 con 26 ml de HBSS (Disolución Salina Equilibrada de Hanks sin calcio ni magnesio) en un tubo de 50 ml. Se pone una capa con 18 ml de sangre completa diluida encima de 12 ml de Lymphoprep (Nycomed Pharma) en un tubo de 50 ml y se centrifuga a 370 x g (1.400rpm) durante 35 min. Las células mononucleares de la interfase se aspiran y se lavan primero con HBSS (750 x g, es decir, 1.900 rpm; 10 min) y una segunda vez con HBSS (300 x g, es decir, 1.200 rpm; 10 min) y por

último con HBSS (160 x g, es decir, 900 rpm; 10 min). Las células sedimentadas se resuspenden suavemente en medio de cultivo/medio de ensayo (10% de suero AB humano inactivado con calor en RPMI 1640 sin L-glutamina) utilizando una pipeta y el número de células se determina en el contador celular. La concentración de PBMC se ajusta a $1x10^7$/ml. Las PBMC recién aisladas ($5x10^5$/ml) se mantienen en medio de cultivo (RPMI 1640 sin L-glutamina suplementado con 10% de suero AB humano) en un frasco de cultivo de tejidos (75 cm^2) a 37°C en un incubador con CO_2 toda la noche. Al día siguiente, las células se estimulan con IL-2h a una concentración final de 1 U/ml durante 3 días más. Las PBMC estimuladas con IL-2 se separan de los restos celulares en un gradiente Lymphoprep. Las PBMC estimuladas con IL-2 purificadas se suspenden en medio de cultivo/medio de ensayo a una concentración de $1x10^7$/ml.

El co-cultivo de las células efectoras con las células diana en presencia de anticuerpo específico o inespecífico se realiza en duplicado o triplicado en placas de microtitulación de 96 pocillos de fondo redondo en un volumen final de 200 µl de medio de ensayo por pocillo que consiste en 10% de suero AB humano y 1% BSA en RPMI en una proporción 1:1. Primero se plaquean las células efectoras (células PBMC recién aisladas en 100 µl de 10% de suero AB humano en RPMI por pocillo), seguido de las células diana y la disolución de anticuerpo diluida en 50 µl de 1% BSA en RPMI. Como control, las células efectoras se cultivan en medio de ensayo solo (control de células efectoras) y las células diana se cultivan en medio de ensayo solo (lisis espontánea) o en medio de ensayo suplementado con 1% Tritón X-100 (lisis máxima). El co-cultivo se incuba a 37°C en un incubador húmedo con CO_2 durante 3 horas. Al final de la incubación, las células se separan del medio de cultivo por centrifugación (200 x g, es decir, 1.000 rpm; 10 min) a temperatura ambiente. Los sobrenadantes sin células (100 µl/pocillo) se transfieren a los pocillos correspondientes de una placa de 96 pocillos de fondo plano. Para determinar la actividad LDH en estos sobrenadantes, se añaden 100 µl de mezcla de reacción (250 µl de catalizador recién mezclado con 11,25 ml de disolución de tinción) a cada pocillo y se incuba 30 min a temperatura ambiente en oscuridad. Después, se mide la absorbancia como se describe a continuación.

Se utiliza el Kit de Detección de la Citotoxicidad (LDH; Roche) para medir la actividad ADCC. La detección de la citotoxicidad se basa en la medida de la actividad de la enzima LDH liberada de la membrana plasmática de las células dañadas. La LDH liberada en los sobrenadantes del cultivo reduce la sal de tetrazolio del kit a formazán. El máximo de absorción del colorante formazán se mide a 490 nm frente a

una longitud de onda de referencia de 650 nm en un lector de placas ELISA. Para calcular el porcentaje de citotoxicidad mediada por células se realizan cinco controles en cada experimento.

Control de fondo I (1):	Actividad LDH contenida en el medio de ensayo, que se sustrae de los valores (3) y (5).
Control de fondo II (2):	Actividad LDH contenida en 1% Tritón-X100 en el medio de ensayo, que se sustrae de los valores máximos de liberación de LDH (4).
Liberación de LDH espontánea (3):	Actividad LDH liberada de las células diana solas.
Liberación de LDH máxima (4):	Actividad LDH máxima liberable en las células diana.
Control de células efectoras (5):	Actividad LDH liberada de las células efectoras solas.

Para determinar el porcentaje de citotoxicidad mediada por células, se calcula la absorbancia media de los triplicados o duplicados y el fondo se sustrae según las instrucciones del fabricante. En la Figura 5, se muestran los resultados de un ensayo ADCC utilizando una proporción E:T de 25:1 y células Ramos diana. Los anticuerpos se añaden en una concentración de 30 ng/ml. Tanto el mAb de partida como las versiones humanizadas de éste muestran una actividad ADCC similar frente a las células Ramos. En conclusión, la humanización del mAb A anti-CD37 no altera significativamente su capacidad para inducir ADCC.

Ejemplo 6

Actividad pro-apoptótica de versiones humanizadas del mAb quimérico A0

La actividad pro-apoptótica del mAb A0 (=A) y las versiones humanizadas de éste (B, C, D e I; véase la Tabla 1) se evalúa midiendo las células AnexinaV/ PI positivas después de la incubación de las células Ramos con los mAb. Las células Ramos (linfoma de Burkitt; ATCC #CRL-1596) se reciben de ATCC. Las células se crecen en frascos de cultivo de tejidos (175 cm^2) utilizando RPMI-1640 + GlutaMAX suplementado con 10% de suero fetal bovino inactivado con calor, 12,5 mM HEPES, 1 mM piruvato de sodio, 1% de MEM aminoácidos no esenciales como medio de cultivo. Las células se cultivan con una densidad inicial de $3x10^5$ células/ml a 37°C y 5% CO_2

en una atmósfera humidificada durante tres días. Los cultivos se mantienen a una concentración celular entre $3x10^5$ y $1,8x10^6$/ml por sub-cultivo en una proporción 1:6 con medio de cultivo fresco 2-3 veces por semana. Una alicuota del cultivo celular a una densidad celular entre $1,5x10^6$/ml y $1,8x10^6$/ml y creciendo en la fase log se centrifuga (200 x g, es decir, 1.000 rpm) durante 10 min. Las células se lavan una vez con medio de lavado (RPMI 1640 sin L-glutamina) y se sedimentan (200 x g, es decir, 1.000 rpm; 10 min). El sedimento celular se resuspende en medio de cultivo y se determina el número de células. La concentración celular se ajusta a $1x10^6$/ml. Se plaquean 100 µl de suspensión celular por pocillo en placas de 96 pocillos de fondo redondo. Los anticuerpos se diluyen en medio de cultivo celular que contiene 10% de FBS y se añaden por pocillo 100 µl de disolución de anticuerpo. Las células se incuban durante 20 a 24 hrs a 37°C en un incubador con CO_2 y posteriormente se tiñen con el kit #2 de ensayo de apoptosis Vybrant. Se añaden Anexina V marcada con Alexa Fluor 488 y disolución de yoduro de propidio a las células y se incuba durante 15 min en oscuridad. Posteriormente, las células se resuspenden en 400 µl de tampón de unión de AnexinaV y se someten a análisis FACS utilizando un BD FACS Canto. El porcentaje de células AnexinaV positivas/ PI negativas y AnexinaV/ PI positivas se determina en hibridaciones sobre mancha bidimensionales utilizando los canales FL1/ FL2. Como control negativo se utiliza un anticuerpo correspondiente en isotipo que no se une (Sigma IgG1 humana).

En la Figura 6, se muestra el efecto pro-apoptótico de varias versiones humanizadas del mAb A en células Ramos. Las células se incuban con anticuerpo a 10 µg/ml durante 24 hrs, se muestra el porcentaje total de células AnexinaV positivas (PI positivas y PI negativas). El mAb A parental muestra una actividad pro-apoptótica potente. Sorprendentemente, las versiones humanizadas muestran un número significativamente reducido de células AnexinaV positivas comparado con el mAb A parental, lo que es indicativo de una actividad pro-apoptótica alterada de los anticuerpos humanizados. En conclusión, la humanización del MAb A da lugar a una reducción de su actividad pro-apoptótica en este diseño experimental.

Ejemplo 7

Actividad ADCC de versiones con Fc modificada por ingeniería del mAb quimérico A0

La actividad ADCC de versiones con Fc modificada por ingeniería del mAb A0 (designadas A1, A2, A3, A4, véase la Tabla 2) se evalúa utilizando células Ramos

como células diana. El ensayo de ADCC se realiza como se ha descrito anteriormente (Ejemplo 5). El resultado del experimento se muestra en la Figura 7. Las versiones con Fc modificada por ingeniería de A0 muestran una potencia y eficacia claramente mejoradas comparadas con el mAb A0 parental. Determinadas variantes de Fc muestran una mejora en la lisis máxima de hasta el 100% comparada con el mAb parental y una mejora en la CE_{50} de hasta 10 veces comparada con el mAb parental. En conclusión, la introducción de mutantes de Fc específicos incrementa de forma importante la actividad ADCC del mAb quimérico A0.

Ejemplo 8

Actividad ADCC de versiones con Fc modificada por ingeniería del mAb B0

La actividad ADCC de versiones con Fc modificada por ingeniería del mAb B0 (designadas B1, B2, B3, B4; véase la Tabla 2) se evalúa utilizando células Ramos como células diana. El ensayo de ADCC se realiza como se ha descrito anteriormente (Ejemplo 5). Las versiones con Fc modificada por ingeniería de B0 muestran una potencia y eficacia claramente mejoradas comparadas con el mAb B0 parental. Determinadas variantes de Fc muestran una mejora en la lisis máxima de hasta el 80% comparada con el mAb parental y una mejora en la CE_{50} de hasta 20 veces comparada con el mAb parental. En conclusión, la introducción de mutantes de Fc específicos incrementa de forma importante la actividad ADCC del mAb B0 humanizado. Los resultados de los experimentos se muestran en la Figura 8.

Ejemplo 9

Actividad pro-apoptótica de los mAb A0 y B0

La actividad pro-apoptótica de los mAb A0 y B0 en células Ramos antes y después del entrecruzamiento con mAb anti-IgG se muestra en la Figura 9. El ensayo apoptótico se realiza como se describe en el Ejemplo 6, para el entrecruzamiento del anticuerpo se añade un anticuerpo anti-IgG humana (específico de la cadena γ; Sigma) a los anticuerpos en una proporción 1:1 y se incuba durante 15 min a 37°C antes de añadirlo a las células diana. En la Figura 9 se añaden los mAb específicos de CD37 a una concentración de 1 µg/ml con y sin entrecruzamiento. El mAb quimérico A0 es un inductor potente de la apoptosis incluso sin entrecruzamiento, este efecto se incrementa significativamente después del entrecruzamiento del mAb.

Sorprendentemente, sin entrecruzamiento, el mAb B0 humanizado carece completamente de actividad pro-apoptótica, sin embargo muestra una actividad pro-apoptótica potente después del entrecruzamiento con Ab anti-IgG. En conclusión, este experimento muestra que la actividad pro-apoptótica de una versión humanizada del mAb A0 puede restaurarse después del entrecruzamiento del anticuerpo.

Ejemplo 10

Actividad pro-apoptótica de versiones con Fc modificada por ingeniería del mAb A0

La actividad pro-apoptótica de versiones con Fc modificada por ingeniería del mAb quimérico A0 en células Ramos se evalúa por tinción con AnexinaV/ PI como se describe en el Ejemplo 6. El anticuerpo A0 parental y las variantes con Fc modificada por ingeniería A2 y A4 se titulan en un intervalo de concentración de 0,1 a 10.000 ng/ml. Como puede observarse en la Figura 10, los 3 anticuerpos muestran una actividad pro-apoptótica similar. En conclusión, este experimento muestra que la modificación por ingeniería de Fc del mAb A0 no altera su actividad pro-apoptótica.

Ejemplo 11

a) Actividad supresora de células B de los anticuerpos con Fc modificada por ingeniería A2 y B2 en un ensayo con sangre completa

La eficacia y potencia de supresión de células B normales de la sangre humana se evalúa utilizando un ensayo con sangre completa. En este formato de ensayo, el anticuerpo de ensayo se añade a muestras tratadas con EDTA de sangre humana de individuos sanos y, posteriormente, después de 3 a 4 h de incubación a 37°C, se mide cuantitativamente el número de células B mediante un ensayo FACS de 4 colores. Comparando con los controles de tampón o IgG, puede calcularse el grado de supresión de las células B por el agente de ensayo. Debido a la presencia de niveles de IgG humana y de células efectoras similar a la situación en los seres humanos *in vivo*, este tipo de ensayo se considera que tiene una alta relevancia para predecir el efecto de los anticuerpos de ensayo *in vivo*.

Se utiliza un ensayo FACS cuantitativo para determinar el número de células B y/o células Ramos adicionadas en muestras de sangre obtenidas de individuos sanos. La cuantificación se realiza utilizando tubos BD Trucount que contienen un número conocido de lechos fluorescentes que sirven como estándar interno para la

cuantificación de la población celular de interés. Las células B se identifican por análisis de 4 colores utilizando 4 marcadores CD diferentes (CD3/ CD14/ CD19/ CD45) en combinación con análisis FSC/ SSC.

Se incuban 270 µl de sangre fresca por pocillo en una placa de 48 pocillos con 30µl de dilución de anticuerpo (en PBS) o PBS (control de tampón) en duplicado. Las muestras se incuban durante 4h a 37°C y, posteriormente, se ponen inmediatamente en hielo. Se añaden 33 µl de mezcla de marcador CD a tubos Trucount y se añaden 50 µl de la mezcla sangre-anticuerpo. Las muestras se agitan con vórtex y se incuban durante 15 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se añaden 450 µl de tampón de lisis, se agita con vórtex y se incuba durante 15 min adicionales a temperatura ambiente. Las muestras se ponen en hielo y se someten inmediatamente a análisis FACS utilizando un Citómetro de Flujo BD FACS Canto™. La evaluación de los datos se realiza utilizando el programa informático BD FACSDiva (Versión 5.0.2).

Los mAb con Fc modificada por ingeniería A2 y B2 quiméricos y humanizados muestran una potencia excelente en la supresión de células B normales con valores de CE_{50} que varían de 0,15 a 0,35 nM. El grado de supresión de las células B normales varía de 57% a 65%. Rituximab, un anticuerpo registrado utilizado para el tratamiento de B-NHL, se ensaya en paralelo y rinde una supresión de las células B significativamente menor en este formato de ensayo (Figura 11 A).

b) La modificación de Fc por ingeniería introduce una actividad de supresión de células B superior de A0 y B0 comparada con Rituximab

El efecto de los mAb en la supresión de células B en sangre humana obtenida de individuos sanos se evalúa como se describe en a). Los mAb con Fc sin modificar por ingeniería A0 y B0 muestran una actividad de supresión de células B en el intervalo de 13% a 26%, similar a Rituximab. La modificación de Fc por ingeniería resulta en un incremento importante de la actividad de supresión de células B para los dos mAb, con un porcentaje medio de supresión del 75%. Esto demuestra claramente la superioridad de A2 y B2 comparada con Rituximab (Figura 11 B)

c) Los anticuerpos A2 y B2 no suprimen células T y monocitos en ensayos con sangre completa

El efecto de A2 y B2 en linfocitos T (CD3-positivos) y monocitos (CD14-positivos) se evalúa en paralelo al efecto sobre linfocitos B. No se observa cambio significativo alguno en el número de células T o el número de monocitos, mientras que se ve una

reducción significativa del número de células B (Figura 11C). Esto indica que A2 y B2 suprimen específicamente células B de la sangre humana.

Ejemplo 12

La modificación de Fc por ingeniería introduce una actividad ADCC superior comparada con Rituximab

La actividad ADCC de la versión con Fc modificada por ingeniería A2 del mAb A0 se evalúa utilizando células Ramos como células diana. El ensayo de ADCC se realiza como se ha descrito anteriormente (Ejemplo 5). El anticuerpo con Fc sin modificar por ingeniería A0 muestra una lisis máxima de las células diana Ramos que es inferior a Rituximab, un anticuerpo específico para CD20 que es un tratamiento aprobado para pacientes que padecen linfomas de células B. Sorprendentemente, la modificación de Fc por ingeniería de A0 da lugar a una potencia y eficacia claramente mejoradas de A2 sobre Rituximab. Esto indica, que a unas densidades de antígeno similares de CD20 y CD37 en células Ramos, el mAb anti-CD37 con Fc modificada por ingeniería A2 muestra una actividad ADCC claramente mejorada comparada con Rituximab (Figura 12).

Ejemplo 13

Actividad supresora de células de linfoma de los anticuerpos con Fc modificada por ingeniería A2 y B2 en un ensayo con sangre completa

La eficacia y potencia de supresión de células Ramos, una línea celular obtenida del linfoma de Burkitt de sangre humana, se evalúa utilizando un ensayo con sangre completa como se describe en el Ejemplo 11. En una modificación del ensayo, las células tumorales Ramos se adicionaron en un exceso de aproximadamente diez veces comparadas con las células B endógenas en la matriz de sangre completa y también se evalúa su supresión por análisis FACS. Los mAb con Fc modificada por ingeniería A2 y B2 quiméricos y humanizados muestran una buena potencia en la supresión de células Ramos con valores de CE_{50} que varían de 0,35 a 0,54 nM. El grado de supresión de las células Ramos varía de 36% a 55%. Rituximab, un anticuerpo registrado utilizado para el tratamiento de B-NHL, se ensaya en paralelo y rinde una supresión de las células Ramos significativamente menor en este formato de ensayo (Figura 13).

Ejemplo 14

Eficacia in vivo de los anticuerpos con Fc modificada por ingeniería A2 y B2 en un modelo de enfermedad

La eficacia antitumoral *in vivo* de los mAb A2 y B2 se evalúa utilizando un modelo de linfoma Ramos Burkitt en ratones desnudos. Se inyectan subcutáneamente células Ramos CD37 positivas en el flanco de los animales y el tratamiento i.v. de los animales empieza cuando los tumores se han establecido. Se elige un programa de tratamiento de dos veces por semana (q3/4d), se ensayan en paralelo dos dosis diferentes (8 mg/kg y 25 mg/kg). Los dos mAb muestran una eficacia antitumoral significativa con valores T/C que varían de 0,2% a 26%. No se observa una diferencia significativa entre los dos niveles de dosis ni entre los dos anticuerpos. Sin embargo, existe una tendencia hacia una mejor eficacia en los animales tratados con la dosis alta de A2, con T/C de 0,2% y 5/10 regresiones completas del tumor. Todos los tratamientos se toleraron bien sin pérdida de peso aparente. En conclusión, los mAb A2 y B2 mostraron una eficacia antitumoral significativa en el modelo de linfoma de Ramos Burkitt, con una actividad máxima obtenida ya con el nivel de dosis 8 mg/kg. La actividad es comparable con la del rituximab que se ensaya en paralelo. Tiene que indicarse que la actividad *in vivo* observada con los anticuerpos con Fc modificada por ingeniería A2 y B2 puede subestimarse ya que estos mAb están optimizados para interaccionar con células efectoras humanas pero no murinas. Esta interacción optimizada, que da lugar a una actividad ADCC *in vitro* muy mejorada cuando se utilizan células efectoras humanas (Ejemplo 8), no se refleja en el modelo de ratón utilizado. Sin embargo, los datos obtenidos en este experimento (mostrados en la Figura 14) proporcionan una prueba *in vivo* del concepto de CD37 como diana y pueden utilizarse así para estimar la dosis terapéutica en los seres humanos.

Ejemplo 15

Correlación del efecto farmacocinético y farmacodinámico de A2 y B2 en ratones para estimar la dosis terapéutica en los seres humanos

Utilizando el modelo de xenoinjerto de tumor de Ramos se establece una correlación entre las concentraciones séricas de A2 y B2 respecto a su efecto farmacodinámico en ratones. Estos estudios demuestran que una dosis de 8 mg/kg de A2 y B2 (formulada en tampón citrato: 25 mM Na-Citrato, 115 mM NaCl, 0,04% Tween

80, pH 6,0) causa un retraso significativo del crecimiento tumoral en este modelo tumoral agresivo s.c. (subcutáneo) utilizando un programa de dosificación estándar del anticuerpo q3 ó 4d en ratones, lo que indica así una actividad continua a lo largo del intervalo de dosificación. Además, los datos farmacocinéticos se establecen para la misma dosis.

Utilizando esta asociación PK/PD en ratones, puede calcularse una dosis humana estimada utilizando datos publicados para el aclaramiento (CL) de anticuerpos humanizados en los seres humanos (Lobo et al., 2004).

Cálculo completo para A2:

- AUC(0-∞) media después de una dosis única de 8 mg/kg = 6.099 µg·h/mL
- AUC(0-∞) dada en ratones = AUC(ss,τ) en ratones y AUC(ss,τ)/τ = C(ave,ss)
- C(ave,ss) en ratones (para τ = 84 horas) = 73 µg/mL, que es equivalente presumiblemente a C(ave,ss) en los seres humanos (para τ = 168h).
- Como AUC(ss,τ) en los seres humanos = D/CL, y utilizando el intervalo de aclaramiento (CL) de anticuerpos humanizados en los seres humanos publicado por Lobo et al, 2004.: CL = 7 mL/h/70 kg a 15 mL/h/70 kg.
- Para 7 mL/h/70 kg: 168 hr x 7 = 1.176 mL x 73 µg = 86 mg
- Para 15 mL/h/70 kg: 168 hr x 15 = 2.520 mL x 73 µg = 184 mg

Por lo tanto, para A2, la dosis semanal estimada para un ser humano de 70 kg está en el intervalo de 86 a 184 mg. Utilizando las mismas asunciones descritas anteriormente, la dosis semanal humana estimada calculada para B2 para un ser humano de 70 kg es 189 a 404 mg.

Ejemplo 16

Los anticuerpos A2 y B2 muestran actividad ADCC en células de mieloma múltiple

La expresión de CD37 en un panel de líneas celulares de mieloma múltiple se evalúa por análisis FACS utilizando anticuerpos específicos para CD37. Las células se incuban con un anticuerpo anti-CD37 marcado directamente con fluorescencia o con un anticuerpo específico de CD37 sin marcar seguido de un segundo anticuerpo marcado con fluorescencia dirigido contra el anticuerpo primario. La actividad de fuorescencia de las células marcadas se mide con un Citómetro FACS Canto Flow (BD Biosciences) y la intensidad de la fluorescencia se registra como MFI utilizando el Programa Informático FACS Diva. 6 de los 11 mielomas múltiples ensayados

demuestran la expresión de CD37 en la superficie de las células (Figura 15). Una línea celular (RPMI 8226) se ensaya posteriormente en un ensayo ADCC como se describe en el Ejemplo 5 utilizando los anticuerpos específicos de CD37 A2 y B2. Los dos anticuerpos demuestran una actividad ADCC potente en células RPMI 8226 con valores CE_{50} en el intervalo de 25 ng/ml y una lisis celular máxima de aproximadamente 20% (Figura 16). Este ejemplo demuestra que las células de mieloma múltiple CD37 positivas son susceptibles de lisis celular mediada por ADCC utilizando los mAb específicos de CD37 A2 y B2.

La Figura 15 muestra el análisis FACS de seis líneas celulares de mieloma múltiple para la expresión de CD37. Las curvas sin rellenar indican reactividad con el anticuerpo específico de CD37, las curvas rellenas representan el anticuerpo control negativo.

Ejemplo 17

Actividad pro-apoptótica de los anticuerpos A2 y B2 en células CLL derivadas de pacientes

La actividad pro-apoptótica de A2 y B2 se evalúa en células de leucemia linfocítica crónica (CLL – siglas en inglés) derivadas de pacientes. Se preparan células mononucleares de la sangre periférica (PBMCs – siglas en inglés) a partir de un paciente al que se la diagnosticado CLL, después de haber obtenido consentimiento informado de acuerdo con la declaración de Helsinki. Las células de CLL primarias se purifican a partir de sangre recientemente recogida de acuerdo con el proceso de Ficoll-Paque® plus (StemCell Technologies, Meylan, Francia) y se almacenan a 4°C en medio de cultivo RPMI 1640 que contiene suero AB humano al 10 %, inactivado por calor (Sigma, Francia) hasta su uso. El medio de cultivo para células CLL primarias es RPMI 1640 suplementado con L-glutamina 2 mM y suero AB humano al 10 %, inactivado por calor. Para el uso experimental, se recuentan células CLL primarias en un hemocitómetro y su viabilidad se evalúa mediante la exclusión de azul de tripano al 0,25%. La viabilidad de muestras de CLL es mayor que 90%. Las células se incuban a 37°C durante 24 horas con los anticuerpos a razón de 30 µg/ml y, después de ello, se determina el porcentaje de células AnexinaV positivas según se describe en el Ejemplo 6. Tal como se muestra en la Figura 17, los anticuerpos A2 y B2 con Fc modificada por ingeniería muestran una fuerte actividad pro-apoptótica sobre las células CLL primarias, con aproximadamente 90% de células (A2) y 40% de células

(B2) AnexinaV positivas. Los dos anticuerpos son claramente superiores a rituximab, un anticuerpo específico para células B aprobado para el tratamiento de B-NHL. El mAb A2 demuestra también una actividad claramente superior, en comparación con alemtuzumab, un anticuerpo aprobado para el tratamiento de B-CLL.

Ejemplo 18

Generación de un modelo de ratón transgénico, en el que el antígeno diana endógeno CD37 se reemplaza por su homólogo humano

Se construye un vector de direccionamiento que contiene la secuencia codificadora del gen CD37 humano (BAC (cromosoma bacteriano artificial) IDs: RP11-433N13, RP11-50I11) flanqueada por secuencias que no se traducen. Este vector de direccionamiento (que contiene, además, los exones 3 – 4 flanqueantes de los sitios loxP y el marcador de la selección neo flanqueado por los sitios frt) se utiliza para recombinación homóloga utilizando células ES de ratón y tecnología estándar para reemplazar los exones 1-8 de la secuencia genómica de ratón con las secuencias homólogas humanas. Para este propósito, la línea celular C57BL/6N ES se crece en una capa alimentadora inactivada mitóticamente comprendida por fibroblastos embrionarios de ratón (MEF) en medio DMEM High Glucose que contiene 20% FBS (PAN) y 1.200u/mL del Factor Inhibidor de Leucemia (Millipore ESG 1107). Se electroporan $1x10^7$ células y 30 g de ADN linearizado del vector (Biorad Gene Pulser) a 240 V y 500 F. La selección con G418 (200 g/mL) empezó en d2. La contraselección con Ganciclovir (2 M) empieza en d5 después de la electroporación. Los clones ES se aíslan en d8 y se analizan por Transferencia Southern según los procedimientos estándar, por ejemplo, mediante la utilización de sondas de ADN marcadas radiactivamente específicas para el gen diana después de la expansión y congelación de los clones en nitrógeno líquido. Entonces se generan los animales transgénicos por procedimientos estándar conocidos en la técnica, por ejemplo, por inyección de blastocitos y la generación posterior de animales quiméricos. Los animales heterocigotos y homocigotos para CD37 humano se obtienen por la cría convencional de animales quiméricos y heterocigotos, respectivamente. La desactivación exitosa del gen CD37 murino y la activación del gen CD37 humano se evalúa a nivel de proteínas utilizando procedimientos estándar, por ejemplo, análisis FACS de los linfocitos de sangre periférica o análisis inmunohistoquímico de secciones de tejido.

Ejemplo 19

Generación de anticuerpos sustitutos

Se generan anticuerpos monoclonales específicos de CD37 de macaco por la inmunización genética de ratones y conejos utilizando la secuencia codificadora completa del antígeno CD37 de macaco. (Acc. No ENSMMUT00000020744). Los anticuerpos específicos se seleccionan utilizando células HEK293 o CHO recombinantes que expresan el antígeno CD37 de macaco, por ejemplo, por técnicas ELISA o FACS estándar. Las secuencias codificadoras de las cadenas pesadas y ligeras variables de estos anticuerpos se recuperan por clonación con PCR y se utilizan para la generación de anticuerpos quiméricos (como se describe en el Ejemplo 1) que contienen la región VH y VL obtenida del anticuerpo murino o de conejo de partida y una parte Fc idéntica a la de un anticuerpo de la invención, por ejemplo A2 o B2. Las propiedades de unión y funcionales pueden investigarse mediante la utilización de sistemas de ensayo que utilizan células que expresan CD37 de macaco como células diana, por ejemplo, para unión, FACS, análisis de Scatchard, ensayos de ADCC y apoptosis. Finalmente, el anticuerpo sustituto se selecciona gracias a su actividad supresora de células B en sangre de mono Cinomolgus *in vitro*.

Ejemplo 20

Preparación de clones para producir anticuerpos

Con el fin de preparar clones para producir anticuerpos de la invención, por ejemplo los anticuerpos A2, A4, B2 o B4, la molécula de ADN que codifica la cadena pesada completa con la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 27, 31, 35 ó 39, respectivamente, se inserta en el vector de expresión eucariota designado pBI-26, que codifica además el marcador de selección dihidrofolato reductasa de hámster.

La molécula de ADN que codifica la cadena ligera completa, mostrada en SEQ ID NO: 29, 33, 37 y 41, respectivamente, se inserta en el vector de expresión eucariota designado pBI-49, que codifica además el marcador de selección neomicina fosfotransferasa. Las secuencias de ADN de las cadenas pesada y ligera completas se secuencian completamente.

La línea celular de hámster CHO-DG44, crecida en suspensión en un medio definido químicamente, se co-transfecta con los vectores de expresión eucariotas para la cadena pesada y para la cadena ligera de los anticuerpos, como se ha descrito anteriormente. Las células transfectadas se seleccionan en medio sin hipoxantina ni timidina y en presencia del antibiótico G418. Posteriormente, las células se someten a una selección y amplificación por etapas utilizando concentraciones crecientes de

metotrexato (MTX). A partir de la etapa de amplificación 800 nM MTX, se selecciona un único clón celular tomando como base el comportamiento del crecimiento y la producción de anticuerpo en ciclos de centrifugación y se conserva congelado en un Safety Cell Bank (SCB).

5

Referencias

American Cancer Society (Cancer Facts & Figures 2005).

Baker y Jones, Curr Opinion in Drug Discovery & Development, 10, 219-227, 2007.

Barbas, et al., Proc. Nat. Acad. Sci, USA 91:3809-3813, 1994.

Barrena et al., Leukemia 19: 1376-1383, 2005.

Belov et al., Cancer Research 61: 4483-4489, 2001.

Boulianne G. L., Hozumi N. y Shulman, M .J., Production of functional chimeric mouse/human antibody. Nature 312: 643, 1984.

Brockhoff G, Hofstaedter F, Knuechel R., Cytometry 1994, 17(1):75-83.

Buchsbaum et al., Cancer Research 52: 6476-6481, 1992.

Chothia y Lesk., J. Mol. Biol. 196: 901-917, 1987.

Coiffier B, et al. Rituximab (anti-CD20 monoclonal antibody) for the treatment of patients with relapsing or refractory aggressive lymphoma: a multicenter phase II study. Blood 1998; 92: 1927-1932.

Coiffier, JCO, 23, 6387-93, 2005.

Edelman et al. Proc Natl Acad Sci USA 63: 78-85, 1969.

Feugier P, et al. Long-term results of the R-CHOP study in the treatment of elderly patients with diffuse large B-cell lymphoma: a study by the Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte. J Clin Oncol 2005; 23: 4117-4126.

Foran JM, et al. European phase II study of rituximab (chimeric anti-CD20 monoclonal antibody) for patients with newly diagnosed mantle-cell lymphoma and previously treated mantle-cell lymphoma, immunocytoma, and small B-cell lymphocytic lymphoma. J Clin Oncol 2000; 18: 317-324.

Forstpointner R, et al. The addition of rituximab to a combination of fludarabine, cyclophosphamide, mitoxantrone (FCM) significantly increases the response rate and prolongs survival as compared with FCM alone in patients with relapsed and refractory follicular and mantle cell lymphomas: results of a prospective randomized study of the German Low-Grade Lymphoma Study Group. Blood, 2004; 104: 3064-3071.

Francisco et al., Blood, 2003 Aug 15;102(4):1458-65.

Frank, et al., Methods Enzymol. 154: 221-249, 1987.

Gait, M.J., Oligonucleotide Synthesis. A Practical Approach. IRL Press, Oxford, UK (1984).

Goldenberg DM y Sharkey RM, Oncogene (2007) 26, 3734–3744. Novel radiolabeled antibody conjugates.

Hainsworth JD. Prolonging remission with rituximab maintenance therapy. Semin Oncol 2004; 31: 17-21.

Hawkins et al., J. Mol. Biol. 254:889-896, 1992.

Hayden y Mandecki. Gene synthesis by serial cloning of oligonucleotides. DNA 7(8): 571-7, 1988.

Hertz T, Yanover C: PepDist: A new framework for protein-peptide binding prediction based on learning peptide distance functions. BMC Bioinform (2006) 7 (Supl 1):S3-S17.

Hiddemann W, et al. Frontline therapy with rituximab added to the combination of cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone (CHOP) significantly improves the outcome for patients with advanced-stage follicular lymphoma compared with therapy with CHOP alone: results of a prospective randomized study of the German Low-Grade Lymphoma Study. Group. Blood 2005; 106: 3725-3732 (2005a).

Hiddemann W, et al. Treatment strategies in follicular lymphomas: current status and future perspectives. J Clin Oncol 2005b: 23; 6394-6399.

Howard OM, et al. Rituximab and CHOP induction therapy for newly diagnosed mantle-cell lymphoma: molecular complete responses are not predictive of progression-free survival. J Clin Oncol 2002; 20: 1288-1294.

Ichimura et al., J. Antibiot. (Tokio), 44, 1045-53, 1991.

Jackson et al., 1995, J. Immunol. 154(7):3310-9.

Johnson S, Bird R E. Construction of single-chain derivatives of monoclonal antibodies and their production in Escherichia coli. Methods Enzymol. 203: 88-98, 1991.

Jones TD, Hanlon M, Smith BJ, Heise CT, Nayee PD, Sanders DA, Hamilton A, Sweet C, Unitt E, Alexander G, Lo KM et al: The development of a modified human IFN-α2b linked to the Fc portion of human IgG1 as a novel potential therapeutic for the treatment of hepatitis C virus infection. J Interferon Cytokine Res (2004) 24(9):560-572.

Jones TD, Phillips WJ, Smith BJ, Bamford CA, Nayee PD, Baglin TP, Gaston JS, Baker MP: Identification and removal of a promiscuous CD4+ T cell epitope from the C1 domain of Factor VIII. J Thromb Haemost (2005) 3(5): 991-1000.

Kabat E. A., Wu T. T., Perry H. M., Gottesman K. S. y Foeller C. Sequences of Proteins of Immunological Interest (5a Ed.). Nº de publicación NIH 91-3242. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD 1991.

Kahl B, et al. Maintenance rituximab following induction chemoimmunotherapy may prolong progression-free survival in mantle cell lymphoma: a pilot study from the Wisconsin Oncology Network. Ann Oncol, 2006; 17: 1418-1423.

Kaminski et al., JCO 10: 1696-1711, 1992.

Kipriyanow y Le Gall, Molecular Biotechnology 26: 39- 60, 2004.

Knobeloch et al., MolCellBiol 20: 5363-5369, 2000.

van der Kolk LE, Baars JW, Prins MH, van Oers MH. Rituximab treatment results in impaired secondary humoral immune responsiveness. Blood, 2002, Sept 15;100(6):2257-9.

McLaughlin P, et al. Rituximab chimeric anti-CD20 monoclonal antibody therapy for relapsed indolent lymphoma: half of patients respond to a four-dose treatment program. J Clin Oncol 1998; 16: 2825-2833.

Lazar et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 2006 Mar 14;103(11):4005-10, 2006.

Ling y MacLennan, pp. 302-335 in Leucocyte Typing III. White Cell Differentiation Antigens, Oxford University Press, 1987.

Link et al., Journal Immunol 137: 3013-3018, 1986.

Lobo et al., J Pharm Sci 2004;93(11):2645-2668.

Lowman et al., Biochemistry 30(45): 10832-10837, 1991.

Marks et al., Biotechnology 10:779-783, 1992.

Moldenhauer G., et al., 1987. Biochemical characterization and epitope analysis of B lymphocyte-specific surface antigens defined by clustering workshop monoclonal antibodies. En Leukocyte Typing 111. A. McMichael. ed. Oxford University Press, Oxford. p. 378.

Moldenhauer G.: CD37. J. Biol Regul Homeost Agents 2000; 14: 281-83.

Press et al., JCO 7, 1989.

Press OW, et al. Radiolabeled-antibody therapy of B-cell lymphoma with autologous bone marrow support. N Engl J Med 1993; 329: 1219-1224.

Reche PA, Glutting JP, Zhang H, Reinherz EL: Enhancement to the RANKPEP resource for the prediction of peptide binding to MHC molecules using profiles. Immunogenetics (2004), 56(6):405-419.

Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21 edición, Hendrickson R. Ed.

Romaguera JE, et al. High rate of durable remissions after treatment of newly diagnosed aggressive mantle-cell lymphoma with rituximab plus hyper-CVAD alternating with rituximab plus high-dose methotrexate and cytarabine. J Clin Oncol, 2005; 23: 7013-7023.

Sasse et al., J. Antibiot. (Tokio), 53, 879-85, 2000.

Shier et al., 1995, Gene 169:147-155.

Schwartz-Albiez et al, Journal Immunol 140: 905-914, 1988.

Stemmer et al. Single-step assembly of a gene and entire plasmid from large numbers of oligodeoxyribonucleotides, Gene 164(1): 49-53, 1995.

van Spriel et al., Journal Immunol 172: 2953-2961, 2004.

Suzawa et al., Bioorg. Med. Chem., 8, 2175-84, 2000.

Tangri S, Mothe BR, Eisenbraun J, Sidney J, Southwood S, Briggs K, Zinckgraf J, Bilsel P, Newman M, Chesnut R, LiCalsi C, Sette A: Rationally engineered therapeutic proteins with reduced immunogenicity. J Immunol (2005) 174(6):3187-3196.

Thomas DA, et al. Chemoimmunotherapy with hyper-CVAD plus rituximab for the treatment of adult Burkitt and Burkitt-type lymphoma or acute lymphoblastic leukemia. Cancer 2006; 106: 1569-1580.

Ye et al. Gene synthesis and expression in E. coli for pump, a human matrix metalloproteinase. Biochem Biophys Res Commun 186(1):143-9, 1992.

Yelton et al., 1995, Immunol. 155:1994-2004.

Zhao et al., Blood 104: Resumen 2515, 2004.

Zhao XB, Lapalombella R, Joshi T, Cheney C, Gowda A, Hayden-Ledbetter MS, Baum PR, Lin TS, Jarjoura D, Lehman A, Kussewitt D, Lee RJ, Caligiuri MA, Tridandapani S, Muthusamy N, Byrd JC. Targeting CD37+ lymphoid malignancies with a novel engineered small modular immunopharmaceutical 2007; BLOOD, 1 OCTUBRE 2007, VOLUMEN 110, NÚMERO 7 (Epub antes de la impresión. Blood. 2007 Abr 17)

REIVINDICACIONES

1) Una molécula de anticuerpo que se une a CD37 humano y que se obtiene a partir de

a) un anticuerpo monoclonal murino que está definido por

i) una cadena pesada variable que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 2; y

ii) una cadena ligera variable que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO:4, o a partir de

b) un anticuerpo no humano que reconoce el mismo epítopo de CD37 humano que el anticuerpo definido en a) o que reconoce un epítopo que está cerca de o se superpone con dicho epítopo;

en el que dicha molécula de anticuerpo es un anticuerpo quimérico o humanizado.

2) Una molécula de anticuerpo de la reivindicación 1 que es un anticuerpo quimérico definido por

i) una cadena pesada variable que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 2;

ii) una cadena ligera variable que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO:4,

iii) cadenas pesadas y ligeras constantes que son de origen humano.

3) Un anticuerpo de la reivindicación 2, en el que

i) la cadena pesada constante es una cadena IgG1, y

ii) la cadena ligera constante es una cadena kappa.

4) Un anticuerpo de la reivindicación 3, en el que dicha cadena pesada constante i) comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO:24 y en el que dicha cadena ligera constante ii) comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO:26.

5) Un anticuerpo de la reivindicación 1 que es un anticuerpo humanizado definido por

a) CDRs contenidas en la cadena pesada variable como se muestra en SEQ ID NO:2,

b) CDRs contenidas en la cadena ligera variable como se muestra en SEQ ID NO:4,

c) marcos que soportan dichas CDRs que se obtienen a partir de un anticuerpo humano,

d) cadenas pesadas y ligeras constantes que son de un anticuerpo humano.

6) Un anticuerpo de la reivindicación 5, que comprende una cadena pesada variable con una secuencia mostrada en SEQ ID NO:6.

7) Un anticuerpo de la reivindicación 6, que comprende una cadena ligera variable con una secuencia mostrada en SEQ ID NO:12, 14, 16, 18, 20 ó 22.

8) Un anticuerpo de la reivindicación 5, que comprende una cadena pesada variable con una secuencia mostrada en SEQ ID NO:8.

9) Un anticuerpo de la reivindicación 8, que comprende una cadena ligera variable con una secuencia mostrada en SEQ ID NO:12, 14, 16, 18, 20 ó 22.

10) Un anticuerpo de la reivindicación 5, que comprende una cadena pesada variable con una secuencia mostrada en SEQ ID NO:10.

11) Un anticuerpo de la reivindicación 10, que comprende una cadena ligera variable con una secuencia mostrada en SEQ ID NO:12, 14, 16, 18, 20 ó 22.

12) Un anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que dicho anticuerpo tiene una o más mutaciones en el dominio Fc que modulan una o más funciones efectoras.

13) Un anticuerpo de la reivindicación 12, en el que dicha modulación de la función efectora es un incremento en la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos.

14) Un anticuerpo de las reivindicaciones 12 y 13, en el que dicha una o más

mutaciones en el dominio Fc es una única sustitución en la posición 332, numerada según el índice de numeración Kabat de EU.

15) Un anticuerpo de las reivindicaciones 12 y 13, en el que dicha una o más mutaciones en el dominio Fc es una combinación de sustituciones en las posiciones 239 y 332, numeradas según el índice de numeración Kabat de EU.

16) Un anticuerpo de las reivindicaciones 12 y 13, en el que dicha una o más mutaciones en el dominio Fc es una combinación de sustituciones en las posiciones 236 y 332, numeradas según el índice de numeración Kabat de EU.

17) Un anticuerpo de las reivindicaciones 12 y 13, en el que dicha una o más mutaciones en el dominio Fc es una combinación de sustituciones en las posiciones 236, 239 y 332, numeradas según el índice de numeración Kabat de EU.

18) Un anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 14 a 17, en el que dichas sustituciones son I332E, S239D y G236A.

19) Un anticuerpo que se une a CD37 humano y que tiene una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:28.

20) El anticuerpo de la reivindicación 19, que tiene una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:30.

21) Un anticuerpo que se une a CD37 y que tiene una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:36.

22) El anticuerpo de la reivindicación 21, que tiene una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:38.

23) Un anticuerpo que se une a CD37 y que tiene una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:32.

24) El anticuerpo de la reivindicación 23, que tiene una cadena ligera que comprende

la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:34.

25) Un anticuerpo que se une a CD37 y que tiene una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:40.

26) El anticuerpo de la reivindicación 25, que tiene una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:42.

27) Una molécula de ADN que comprende una región que codifica la cadena pesada variable de un anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 26.

28) La molécula de ADN de la reivindicación 27, en la que dicha región codificadora de la cadena pesada variable está fusionada con una región que codifica una cadena pesada constante de origen humano.

29) La molécula de ADN de la reivindicación 28, en la que dicha cadena pesada constante humana es IgG1.

30) La molécula de ADN de la reivindicación 29, en la que dicha IgG1 está codificada por una secuencia mostrada en SEQ ID NO:23.

31) La molécula de ADN de una cualquiera de las reivindicaciones 28 a 30, en la que dicha cadena pesada constante humana tiene una o más sustituciones en la región Fc como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 14 a 18.

32) Una molécula de ADN que comprende una región que codifica la cadena ligera variable de un anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 26.

33) La molécula de ADN de la reivindicación 32, en la que dicha región codificadora de la cadena ligera variable está fusionada con una región que codifica una cadena ligera constante de origen humano.

34) La molécula de ADN de la reivindicación 33, en la que dicha cadena ligera constante es una cadena kappa.

35) La molécula de ADN de la reivindicación 34, en la que dicha cadena ligera kappa está codificada por una secuencia mostrada en SEQ ID NO:25.

36) Un vector de expresión que contiene una molécula de ADN de una cualquiera de las reivindicaciones 27 a 31 y/o una molécula de ADN de una cualquiera de las reivindicaciones 32 a 35.

37) Una célula anfitriona que porta uno o más vectores de la reivindicación 36.

38) Una célula anfitriona de la reivindicación 37, que porta un vector de expresión que comprende una molécula de ADN de una cualquiera de las reivindicaciones 27 a 31 y/o un segundo vector de expresión que comprende una molécula de ADN de una cualquiera de las reivindicaciones 32 a 35.

39) La célula anfitriona de la reivindicación 37, que es una célula de mamífero.

40) Un método para producir un anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 26, que comprende transfectar una célula anfitriona de mamífero con uno o más vectores de la reivindicación 36, cultivar la célula anfitriona y recuperar y purificar la molécula de anticuerpo.

41) Una composición farmacéutica que comprende, como ingrediente activo, una o más moléculas de anticuerpos anti-CD37 de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 26 y un vehículo aceptable farmacéuticamente.

42) La composición farmacéutica de la reivindicación 41, que comprende, además, uno o más agentes terapéuticos adicionales.

43) La composición farmacéutica de la reivindicación 42, en la que dichos uno o más agentes terapéuticos adicionales se seleccionan de agentes dirigidos a un antígeno de las células B distinto de CD37.

44) La composición farmacéutica de la reivindicación 43, en la que dicho antígeno de las células B es CD20.

45) La composición farmacéutica de la reivindicación 42, en la que dichos uno o más agentes terapéuticos adicionales se seleccionan de agentes que inducen apoptosis.

46) La composición farmacéutica de la reivindicación 45, en la que dicho agente es un modulador de un receptor TRAIL.

47) La composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 41 a 46 para suprimir células B que expresan CD37 en su superficie.

48) La composición farmacéutica de la reivindicación 47 para el tratamiento de malignidades de las células B.

49) La composición farmacéutica de la reivindicación 48, en la que dicha malignidad de las células B se selecciona de linfoma de células B no-Hodgkin, leucemia linfocítica crónica de las células B y mieloma múltiple.

50) La composición farmacéutica de la reivindicación 47 para el tratamiento de enfermedades autoinmunes e inflamatorias que implican células B en su patología.

51) El método para suprimir células B que expresan CD37 en una población de células, que comprende administrar a dicha población de células una molécula de anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 26 o una composición farmacéutica que contiene dicha molécula de anticuerpo.

52) El método de la reivindicación 51, que se lleva a cabo *in vitro*.

53) Un método para tratar un paciente que padece una malignidad de células B, seleccionada de linfoma de las células B no-Hodgkin, leucemia linfocítica crónica de las células B y mieloma múltiple, que comprende administrar a dicho paciente una cantidad eficaz de una composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 41 a 46.

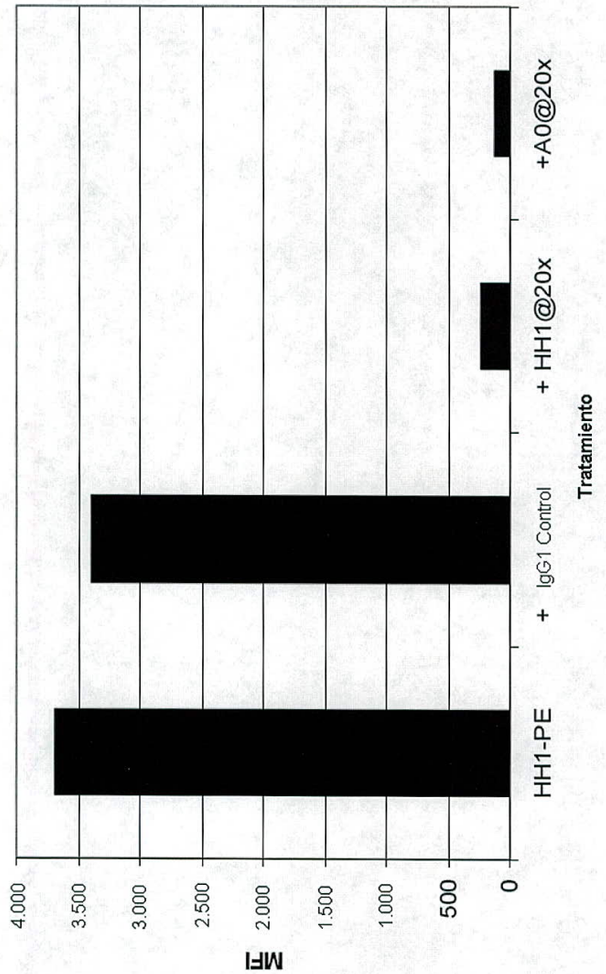
RESUMEN

ANTICUERPOS ANTI-CD37

Anticuerpos anti-CD37 quiméricos y humanizados y composiciones farmacéuticas que los contienen son útiles para el tratamiento de malignidades de las células B y enfermedades autoinmunes e inflamatorias que implican células B en su patología.

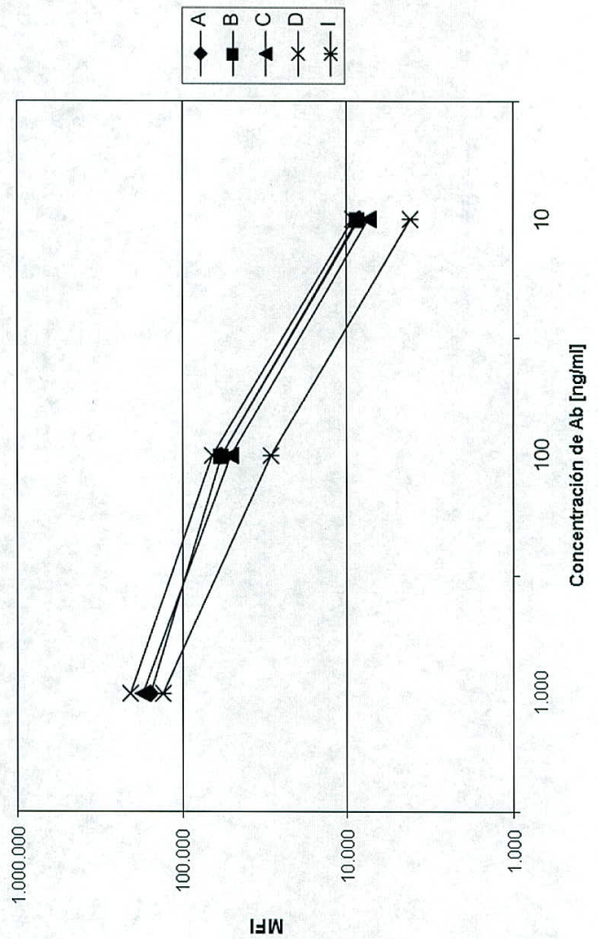
165

Fig. 1


MFI
4.000
3.500
3.000
2.500
2.000
1.500
1.000
500
0
HH1-PE
+ IgG1 Control
+ HH1@20x
+A0@20x
Tratamiento

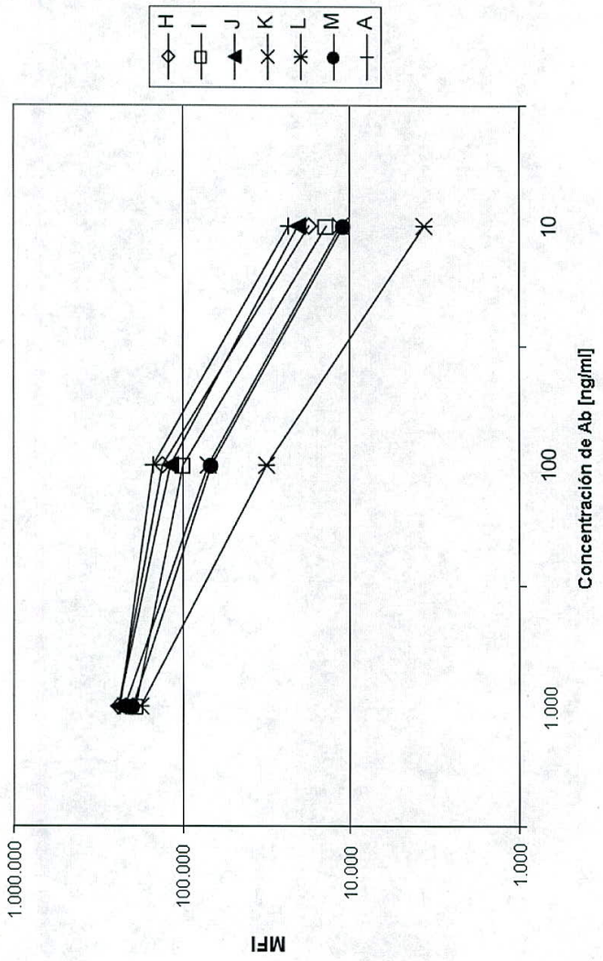
166

Fig. 2


A
B
C
D
I
1.000.000
100.000
10.000
1.000
MFI
10
100
1.000
Concentración de Ab [ng/ml]

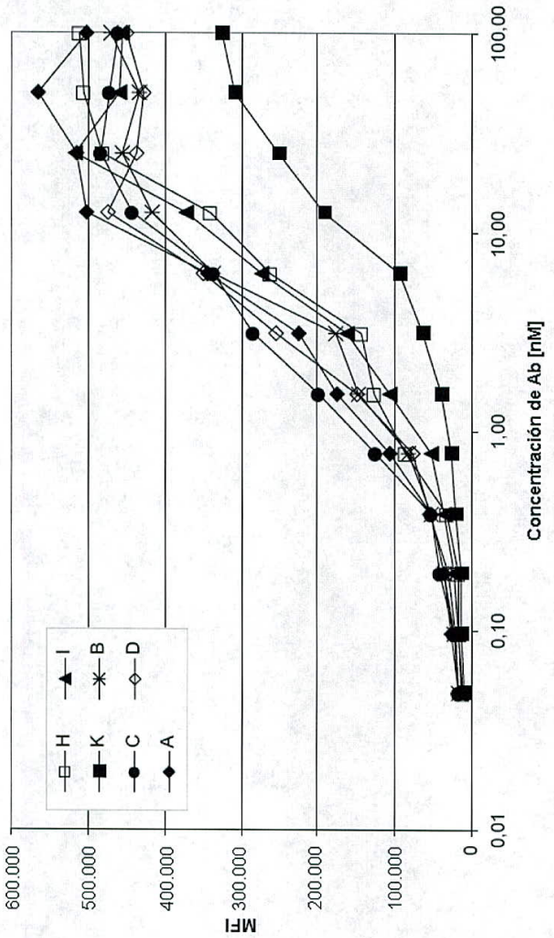
167

Fig. 3


H
I
J
K
L
M
A
1.000.000
100.000
10.000
1.000
MFI
10
100
1.000
Concentración de Ab [ng/ml]

160

Fig. 4


MFI
600.000
500.000
400.000
300.000
200.000
100.000
0
0,01
0,10
1,00
10,00
100,00
Concentración de Ab [nM]
H
K
C
A
I
B
D

169'

Fig. 5

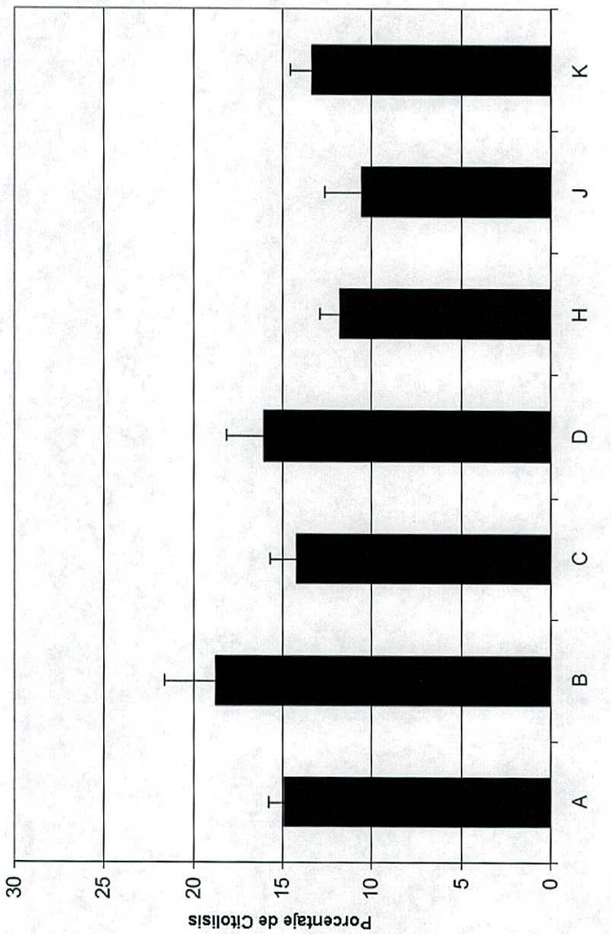
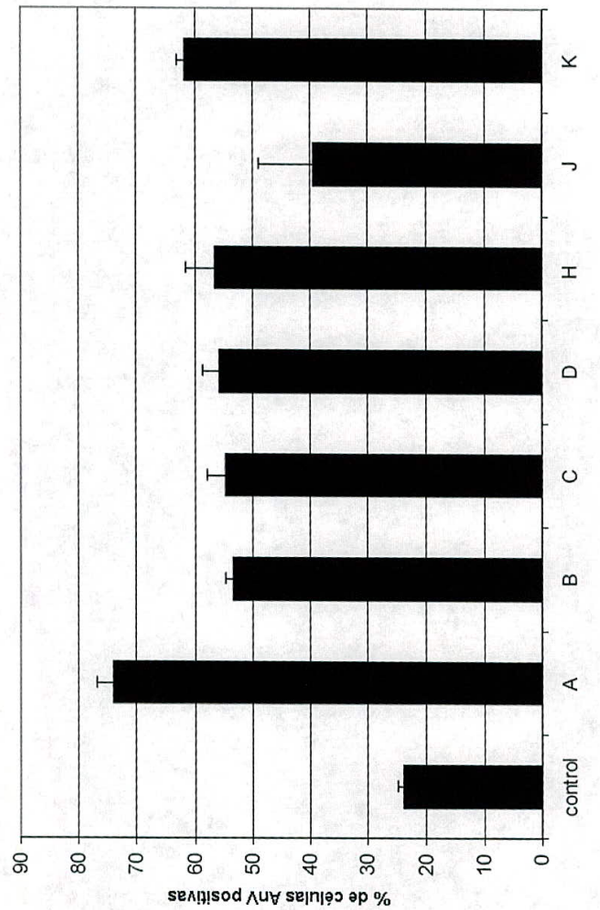
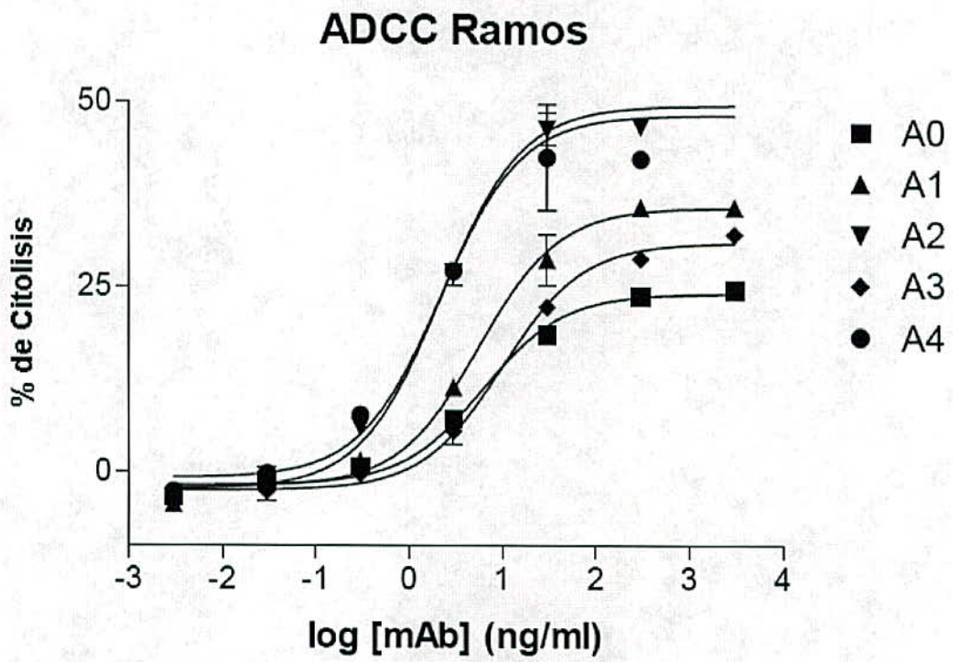


Fig. 6


% de cellules AnV positivas
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
control
A
B
C
D
H
J
K

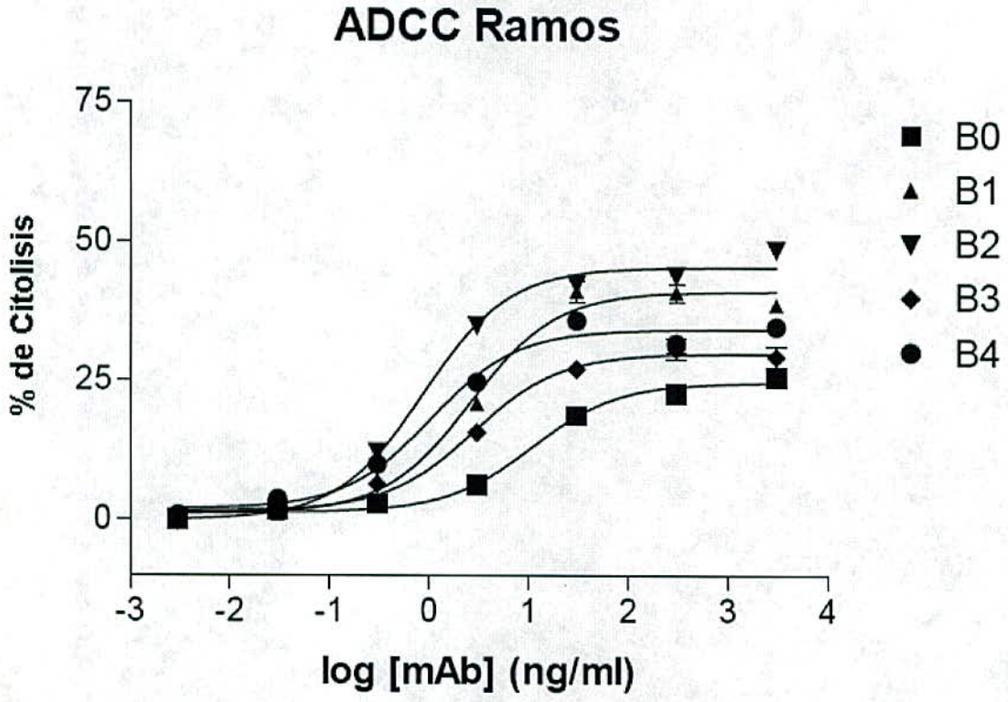
171

Fig. 7


ADCC Ramos
% de Citolisis
50
25
0
-3
-2
-1
0
1
2
3
4
log [mAb] (ng/ml)
A0
A1
A2
A3
A4

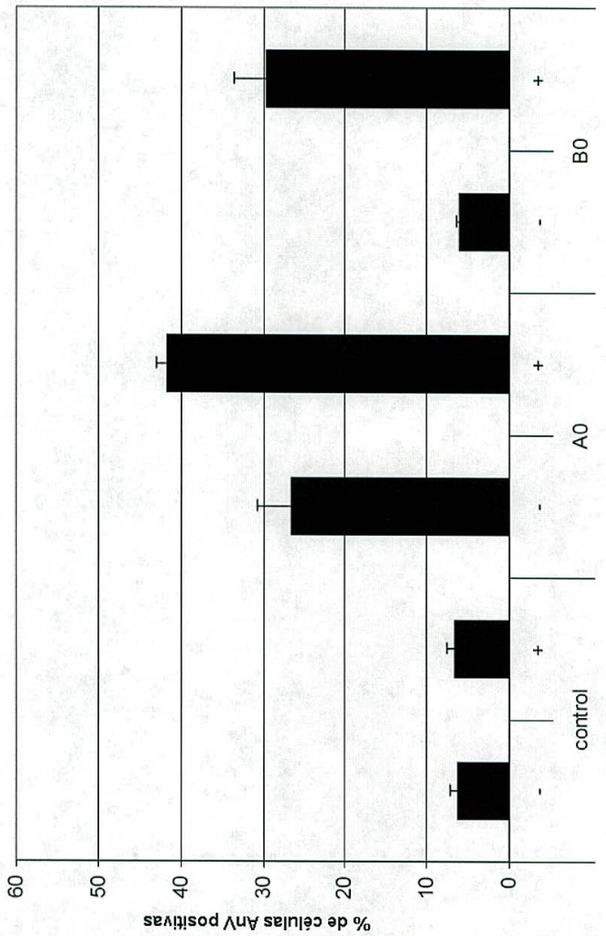
A2

Fig. 8


ADCC Ramos
% de Citolisis
75
50
25
0
-3
-2
-1
0
1
2
3
4
log [mAb] (ng/ml)
B0
B1
B2
B3
B4

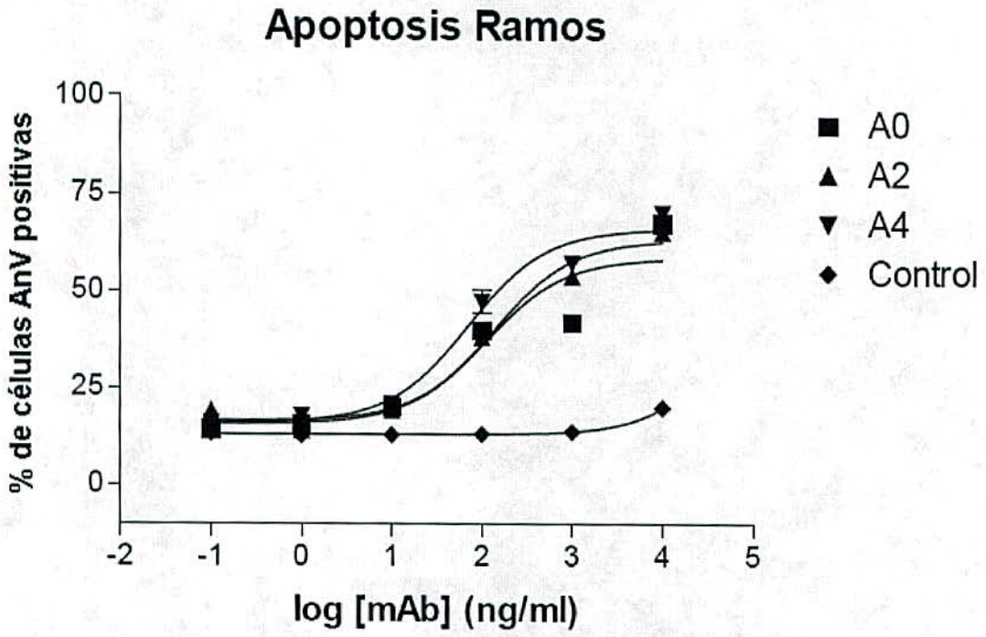
173

Fig. 9



174

Fig. 10


Apoptosis Ramos
% de células AnV positivas
100
75
50
25
0
-2
-1
0
1
2
3
4
5
log [mAb] (ng/ml)
A0
A2
A4
Control

175

Fig. 11A

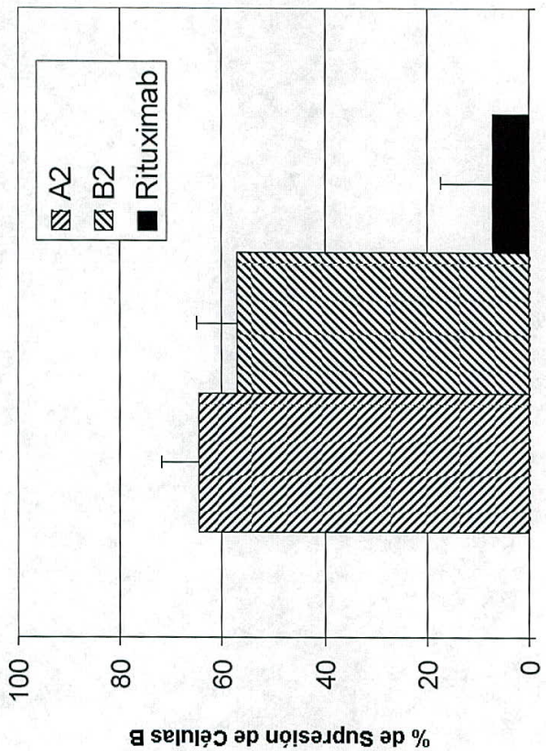


Fig. 11B

176

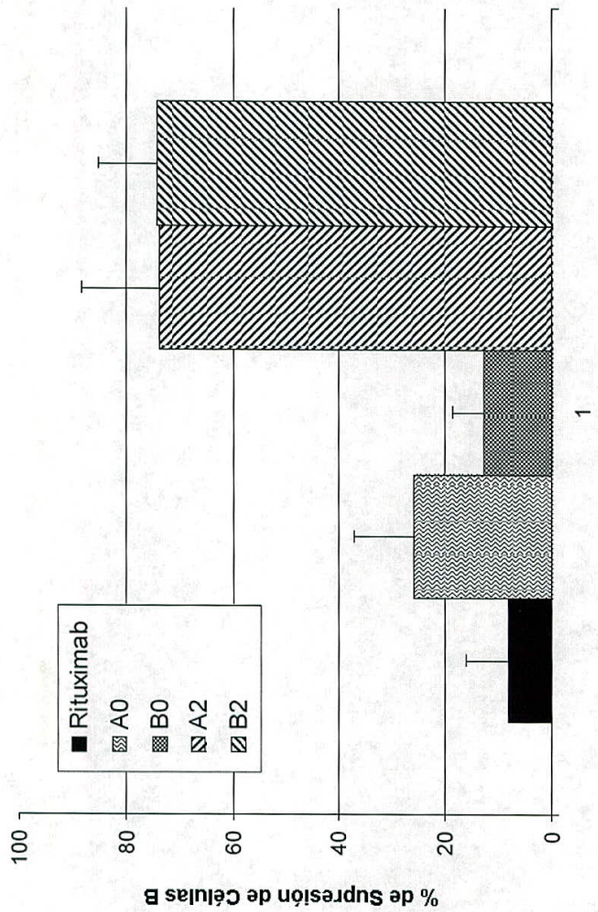
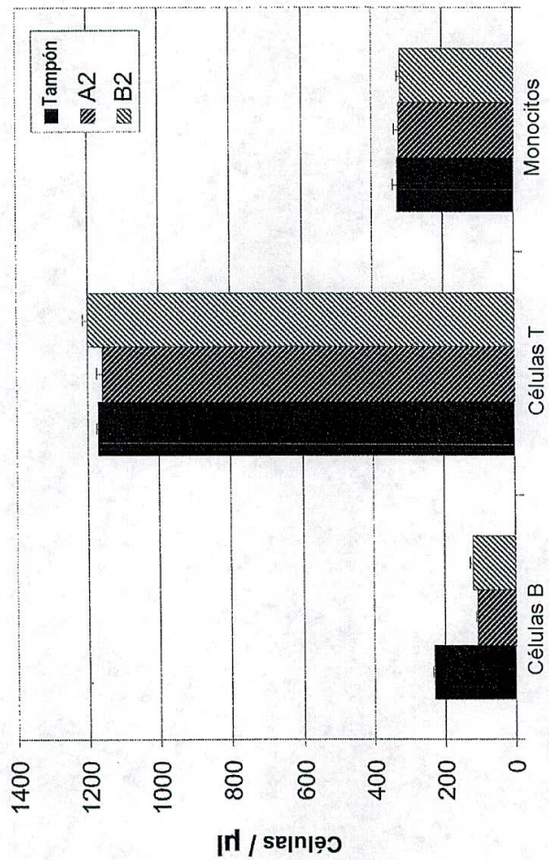

% de Supresión de Células B
100
80
60
40
20
0
1
Rituximab
A0
B0
A2
B2

Fig. 11C


Tampón
A2
B2
Monocitos
Células T
Células B
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
Células / µl

178

Fig. 12

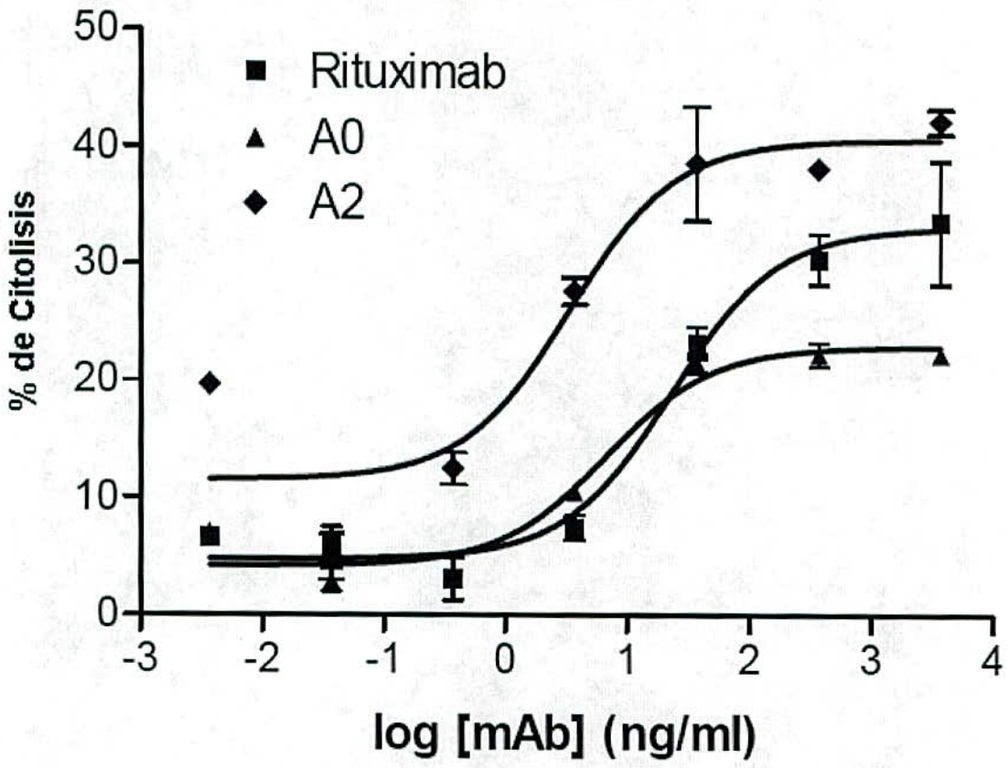
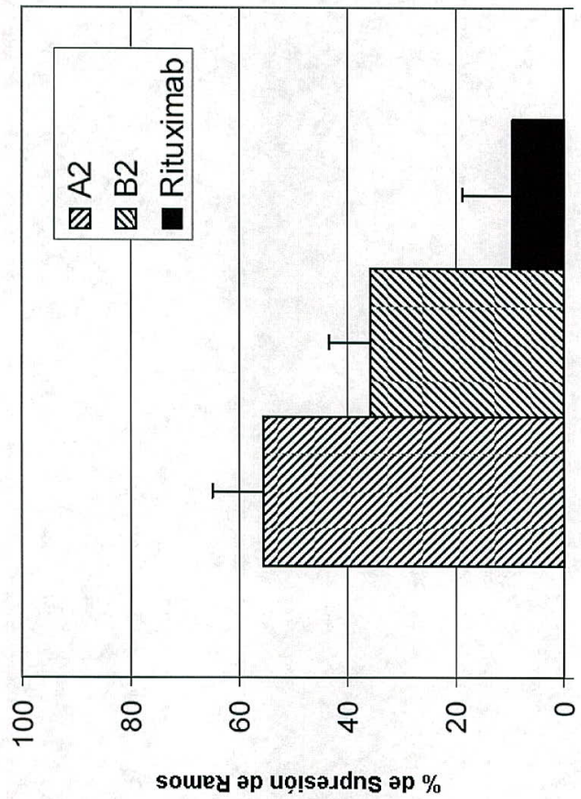
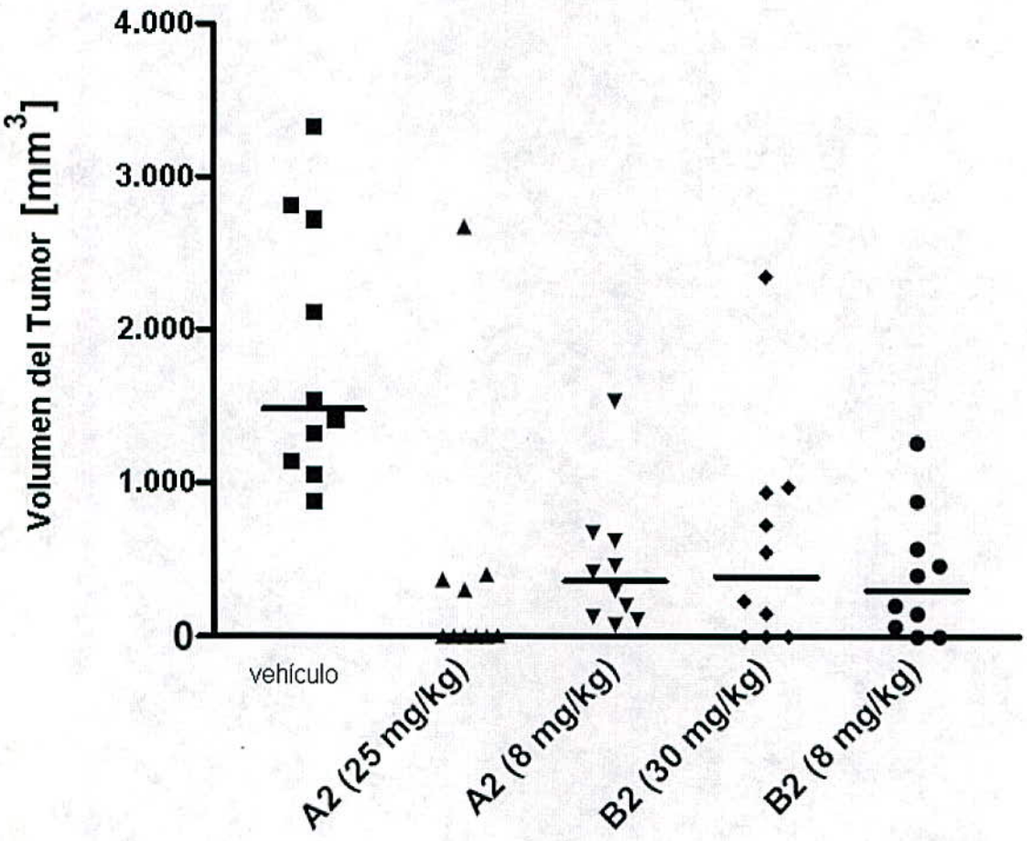

Rituximab
A0
A2
% de Citolisis
log [mAb] (ng/ml)
50
40
30
20
10
0
-3
-2
-1
0
1
2
3
4

Fig. 13



180

Fig. 14


Volumen del Tumor [mm3]
4.000
3.000
2.000
1.000
0
vehículo
A2 (25 mg/kg)
A2 (8 mg/kg)
B2 (30 mg/kg)
B2 (8 mg/kg)

EJM
MOLP-2
RPMI8226
U266
KMS-12-BM
NCI H929
Eventos
Fluorescencia
0
100
10^0 10^1 10^2 10^3 10^4

Fig. 15

Fig. 16

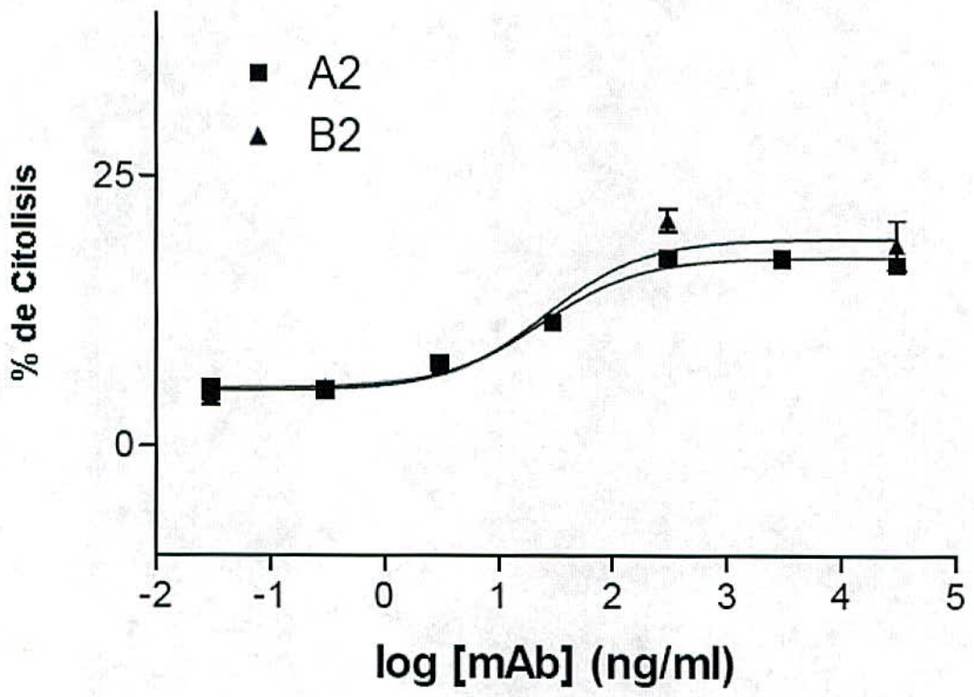
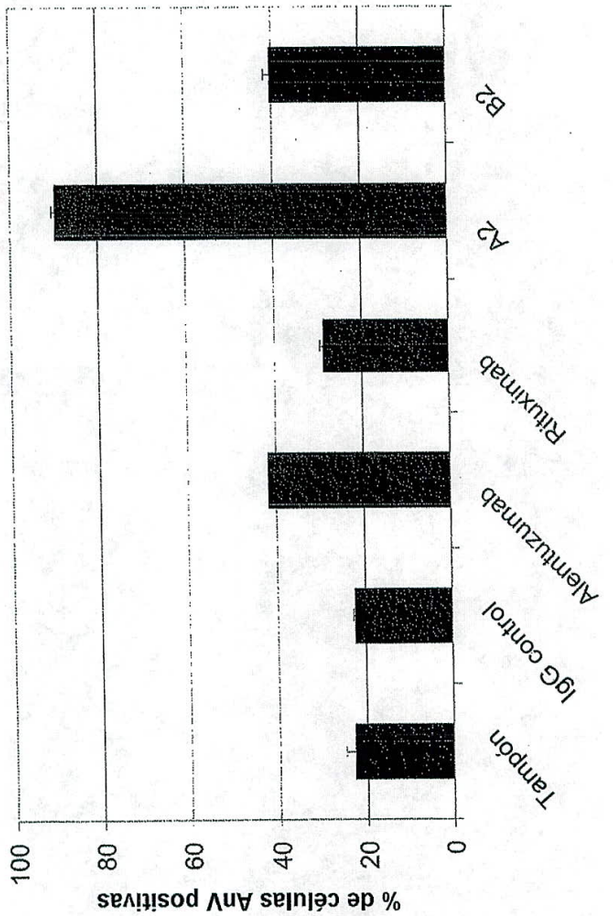


Fig. 17

183


% de células ANV positivas
100
80
60
40
20
0
Tampón
IgG control
Alemtuzumab
Rituximab
A2
B2

PATENT COOPERATION TREATY

1844

From the INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

PCT

To:
BOEHRINGER INGELHEIM GMBH
Attn. Hammann, Heinz
CD Patents
Binger Straße 173
D-55216 Ingelheim am Rhein
ALLEMAGNE

Eingang CD Patents
25. Feb. 2009
SdT | No: | Yes:
SB | gesehen | erledigt
TG

NOTIFICATION OF TRANSMITTAL OF THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT AND THE WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY, OR THE DECLARATION

CD Patents
Frist: 26.4.09
Eingang: 26.2.09

(PCT Rule 44.1)

Applicant's or agent's file reference 12-0278 PCT	Date of mailing *(day/month/year)* 26/02/2009
International application No. PCT/EP2008/060464	**FOR FURTHER ACTION** See paragraphs 1 and 4 below
Applicant BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL GMBH	International filing date *(day/month/year)* 08/08/2008

GESCANNT
OA bp

1. [x] The applicant is hereby notified that the international search report and the written opinion of the International Searching Authority have been established and are transmitted herewith.

   Filing of amendments and statement under Article 19:
   The applicant is entitled, if he so wishes, to amend the claims of the International Application (see Rule 46):

   When? The time limit for filing such amendments is normally two months from the date of transmittal of the International Search Report.

   Where? Directly to the International Bureau of WIPO, 34 chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland, Fascimile No.: (41-22) 338.82.70

   For more detailed instructions, see the notes on the accompanying sheet.

2. [ ] The applicant is hereby notified that no international search report will be established and that the declaration under Article 17(2)(a) to that effect and the written opinion of the International Searching Authority are transmitted herewith.

3. [ ] **With regard to the protest** against payment of (an) additional fee(s) under Rule 40.2, the applicant is notified that:

   [ ] the protest together with the decision thereon has been transmitted to the International Bureau together with the applicant's request to forward the texts of both the protest and the decision thereon to the designated Offices.

   [ ] no decision has been made yet on the protest; the applicant will be notified as soon as a decision is made.

4. **Reminders**

   Shortly after the expiration of **18 months** from the priority date, the international application will be published by the International Bureau. If the applicant wishes to avoid or postpone publication, a notice of withdrawal of the international application, or of the priority claim, must reach the International Bureau as provided in Rules 90*bis*.1 and 90*bis*.3, respectively, before the completion of the technical preparations for international publication.

   The applicant may submit comments on an informal basis on the written opinion of the International Searching Authority to the International Bureau. The International Bureau will send a copy of such comments to all designated Offices unless an international preliminary examination report has been or is to be established. These comments would also be made available to the public but not before the expiration of 30 months from the priority date.

   Within **19 months** from the priority date, but only in respect of some designated Offices, a demand for international preliminary examination must be filed if the applicant wishes to postpone the entry into the national phase **until 30 months** from the priority date (in some Offices even later); otherwise, the applicant must, **within 20 months** from the priority date, perform the prescribed acts for entry into the national phase before those designated Offices.

   In respect of other designated Offices, the time limit of **30 months** (or later) will apply even if no demand is filed within 19 months.

   See the Annex to Form PCT/IB/301 and, for details about the applicable time limits, Office by Office, see the *PCT Applicant's Guide*, Volume II, National Chapters and the WIPO Internet site.

Name and mailing address of the International Searching Authority European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL-2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Beatrix Tietze-Epoupa

Form PCT/ISA/220 (October 2005)

(See notes on accompanying sheet)

NOTES TO FORM PCT/ISA/220

These Notes are intended to give the basic instructions concerning the filing of amendments under article 19. The Notes are based on the requirements of the Patent Cooperation Treaty, the Regulations and the Administrative Instructions under that Treaty. In case of discrepancy between these Notes and those requirements, the latter are applicable. For more detailed information, see also the *PCT Applicant's Guide*, a publication of WIPO.

In these Notes, "Article", "Rule", and "Section" refer to the provisions of the PCT, the PCT Regulations and the PCT Administrative Instructions, respectively.

INSTRUCTIONS CONCERNING AMENDMENTS UNDER ARTICLE 19

The applicant has, after having received the international search report and the written opinion of the International Searching Authority, one opportunity to amend the claims of the international application. It should however be emphasized that, since all parts of the international application (claims,description and drawings) may be amended during the international preliminary examination procedure, there is usually no need to file amendments of the claims under Article 19 except where, e.g. the applicant wants the latter to be published for the purposes of provisional protection or has another reason for amending the claims before international publication. Furthermore, it should be emphasized that provisional protection is available in some States only (see *PCT Applicant's Guide*, Volume I/A, Annexes B1 and B2).

The attention of the applicant is drawn to the fact that amendments to the claims under Article 19 are not allowed where the International Searching Authority has declared, under Article 17(2), that no international search report would be established (see *PCT Applicant's Guide*, Volume I/A, paragraph 296).

What parts of the international application may be amended?

Under Article 19, only the claims may be amended.

During the international phase, the claims may also be amended (or further amended) under Article 34 before the International Preliminary Examining Authority. The description and drawings may only be amended under Article 34 before the International Examining Authority.

Upon entry into the national phase, all parts of the international application may be amended under Article 28 or, where applicable, Article 41.

When? Within 2 months from the date of transmittal of the international search report or 16 months from the priority date, whichever time limit expires later. It should be noted, however, that the amendments will be considered as having been received on time if they are received by the International Bureau after the expiration of the applicable time limit but before the completion of the technical preparations for international publication (Rule 46.1).

Where not to file the amendments?

The amendments may only be filed with the International Bureau and not with the receiving Office or the International Searching Authority (Rule 46.2).

Where a demand for international preliminary examination has been/is filed, see below.

How? Either by cancelling one or more entire claims, by adding one or more new claims or by amending the text of one or more of the claims as filed.

A replacement sheet must be submitted for each sheet of the claims which, on account of an amendment or amendments, differs from the sheet originally filed.

All the claims appearing on a replacement sheet must be numbered in Arabic numerals. Where a claim is cancelled, no renumbering of the other claims is required. In all cases where claims are renumbered, they must be renumbered consecutively (Section 205(b)).

The amendments must be made in the language in which the international application is to be published.

What documents must/may accompany the amendments?

Letter (Section 205(b)):

The amendments must be submitted with a letter.

The letter will not be published with the international application and the amended claims. It should not be confused with the "Statement under Article 19(1)" (see below, under "Statement under Article 19(1)").

The letter must be in English or French, at the choice of the applicant. However, if the language of the international application is English, the letter must be in English; if the language of the international application is French, the letter must be in French.

NOTES TO FORM PCT/ISA/220 (continued)

The letter must indicate the differences between the claims as filed and the claims as amended. It must, in particular, indicate, in connection with each claim appearing in the international application (it being understood that identical indications concerning several claims may be grouped),whether

(i) the claim is unchanged;

(ii) the claim is cancelled;

(iii) the claim is new;

(iv) the claim replaces one or more claims as filed;

(v) the claim is the result of the division of a claim as filed.

The following examples illustrate the manner in which amendments must be explained in the accompanying letter:

1. [Where originally there were 48 claims and after amendment of some claims there are 51]:
"Claims 1 to 29, 31, 32, 34, 35, 37 to 48 replaced by amended claims bearing the same numbers; claims 30, 33 and 36 unchanged; new claims 49 to 51 added."
2. [Where originally there were 15 claims and after amendment of all claims there are 11]:
"Claims 1 to 15 replaced by amended claims 1 to 11."
3. [Where originally there were 14 claims and the amendments consist in cancelling some claims and in adding new claims]:
"Claims 1 to 6 and 14 unchanged; claims 7 to 13 cancelled; new claims 15, 16 and 17 added." or
"Claims 7 to 13 cancelled; new claims 15, 16 and 17 added; all other claims unchanged."
4. [Where various kinds of amendments are made]:
"Claims 1–10 unchanged; claims 11 to 13, 18 and 19 cancelled; claims 14, 15 and 16 replaced by amended claim 14; claim 17 subdivided into amended claims 15, 16 and 17; new claims 20 and 21 added."

"Statement under article 19(1)" (Rule 46.4)

The amendments may be accompanied by a statement explaining the amendments and indicating any impact that such amendments might have on the description and the drawings (which cannot be amended under Article 19(1)).

The statement will be published with the international application and the amended claims.

It must be in the language in which the international application is to be published.

It must be brief, not exceeding 500 words if in English or if translated into English.

It should not be confused with and does not replace the letter indicating the differences between the claims as filed and as amended. It must be filed on a separate sheet and must be identified as such by a heading, preferably by using the words "Statement under Article 19(1)."

It may not contain any disparaging comments on the international search report or the relevance of citations contained in that report. Reference to citations, relevant to a given claim, contained in the international search report may be made only in connection with an amendment of that claim.

Consequence if a demand for international preliminary examination has already been filed

If, at the time of filing any amendments and any accompanying statement, under Article 19, a demand for international preliminary examination has already been submitted, the applicant must preferably, at the time of filing the amendments (and any statement) with the International Bureau, also file with the International Preliminary Examining Authority a copy of such amendments (and of any statement) and, where required, a translation of such amendments for the procedure before that Authority (see Rules 55.3(a) and 62.2, first sentence). For further information, see the Notes to the demand form (PCT/IPEA/401).

If a demand for international preliminary examination is made, the written opinion of the International Searching Authority will, except in certain cases where the International Preliminary Examining Authority did not act as International Searching Authority and where it has notified the International Bureau under Rule 66.1*bis*(b), be considered to be a written opinion of the International Preliminary Examining Authority. If a demand is made, the applicant may submit to the International Preliminary Examining Authority a reply to the written opinion together, where appropriate, with amendments before the expiration of 3 months from the date of mailing of Form PCT/ISA/220 or before the expiration of 22 months from the priority date, whichever expires later (Rule 43*bis*.1(c)).

Consequence with regard to translation of the international application for entry into the national phase

The applicant's attention is drawn to the fact that, upon entry into the national phase, a translation of the claims as amended under Article 19 may have to be furnished to the designated/elected Offices, instead of, or in addition to, the translation of the claims as filed.

For further details on the requirements of each designated/elected Office, see the *PCT Applicant's Guide*, Volume II.

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference	FOR FURTHER ACTION	see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below.
12-0278 PCT		
International application No.	International filing date *(day/month/year)*	(Earliest) Priority Date *(day/month/year)*
PCT/EP2008/060464	08/08/2008	09/08/2007

Applicant

BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL GMBH

This international search report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This international search report consists of a total of 5 sheets.

[X] It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1. **Basis of the report**

   a. With regard to the **language**, the international search was carried out on the basis of:

   [X] the international application in the language in which it was filed

   [ ] a translation of the international application into _____, which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1(b))

   b. [ ] This international search report has been established taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43.6*bis*(a)).

   c. [X] With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, see Box No. I.

2. [ ] **Certain claims were found unsearchable** (See Box No. II)

3. [ ] **Unity of invention is lacking** (see Box No III)

4. With regard to the **title**,

   [X] the text is approved as submitted by the applicant

   [ ] the text has been established by this Authority to read as follows:

5. With regard to the **abstract**,

   [X] the text is approved as submitted by the applicant

   [ ] the text has been established, according to Rule 38.2(b), by this Authority as it appears in Box No. IV. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority

6. With regard to the **drawings**,

   a. the figure of the **drawings** to be published with the abstract is Figure No. _____

      [ ] as suggested by the applicant

      [ ] as selected by this Authority, because the applicant failed to suggest a figure

      [ ] as selected by this Authority, because this figure better characterizes the invention

   b. [X] none of the figures is to be published with the abstract

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP2008/060464

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.b of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:

   a. type of material

   [X] a sequence listing

   [ ] table(s) related to the sequence listing

   b. format of material

   [X] on paper

   [X] in electronic form

   c. time of filing/furnishing

   [X] contained in the international application as filed

   [ ] filed together with the international application in electronic form

   [X] furnished subsequently to this Authority for the purpose of search

2. [X] In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2008/060464

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C07K16/28 A61P35/02 A61K39/395 C12N5/00

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 A61K C12N A61P

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, BIOSIS, EMBASE, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2005/017148 A (TRUBION PHARMACEUTICALS INC [US]; LEDBETTER JEFFREY A [US]; HAYDEN-LED) 24 February 2005 (2005-02-24) page 79; example 35	1-53
Y	DATABASE BIOSIS [Online] BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US; 1984, BOULIANNE G L ET AL: "PRODUCTION OF FUNCTIONAL CHIMERIC MOUSE-HUMAN ANTIBODY" XP001084103 Database accession no. PREV198528056203 the whole document & NATURE (LONDON), vol. 312, no. 5995, 1984, pages 643-646, ISSN: 0028-0836	1-53

-/--

[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
16 January 2009	26/02/2009

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	Perez, Franck

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2008/060464

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 6 548 640 B1 (WINTER GREGORY PAUL [GB]) 15 April 2003 (2003-04-15) the whole document	1-53
Y	WO 2007/041635 A (XENCOR INC [US]; DESJARLAIS JOHN R [US]; KARKI SHER BAHADUR [US]; LAZA) 12 April 2007 (2007-04-12) paragraph [0196]	1-53
Y	WO 2007/014278 A (TRUBION PHARMACEUTICALS [US]; GROSMAIRE LAURA SUE [US]; HAYDEN-LEDBETT) 1 February 2007 (2007-02-01) paragraphs [0057] - [0137]; claim 1	1-53

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/EP2008/060464

191

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2005017148 A	24-02-2005	AU 2003300092 A1	07-03-2005
		BR PI0318417 A	25-07-2006
		CA 2533921 A1	24-02-2005
		CN 1852976 A	25-10-2006
		EP 1654358 A1	10-05-2006
		HR 20060074 A2	31-08-2006
		IS 8305 A	16-02-2006
		JP 2007528194 T	11-10-2007
		KR 20060070530 A	23-06-2006
		US 2007237779 A1	11-10-2007
US 6548640 B1	15-04-2003	NONE	
WO 2007041635 A	12-04-2007	AU 2006299429 A1	12-04-2007
		CA 2624189 A1	12-04-2007
		EP 1931709 A2	18-06-2008
		US 2007148170 A1	28-06-2007
		US 2008206867 A1	28-08-2008
WO 2007014278 A	01-02-2007	AU 2006272555 A1	01-02-2007
		CA 2616395 A1	01-02-2007
		EP 1912675 A2	23-04-2008
		KR 20080032192 A	14-04-2008

PATENT COOPERATION TREATY

192

From the
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

To:

see form PCT/ISA/220

PCT

WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY
(PCT Rule 43*bis*.1)

Date of mailing
(day/month/year) see form PCT/ISA/210 (second sheet)

Applicant's or agent's file reference
see form PCT/ISA/220

FOR FURTHER ACTION
See paragraph 2 below

International application No.	International filing date *(day/month/year)*	Priority date *(day/month/year)*
PCT/EP2008/060464	08.08.2008	09.08.2007

International Patent Classification (IPC) or both national classification and IPC
INV. C07K16/28 A61P35/02 A61K39/395 C12N5/00

Applicant
BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL GMBH

1. This opinion contains indications relating to the following items:

- ☒ Box No. I Basis of the opinion
- ☒ Box No. II Priority
- ☐ Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- ☐ Box No. IV Lack of unity of invention
- ☒ Box No. V Reasoned statement under Rule 43*bis*.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- ☐ Box No. VI Certain documents cited
- ☐ Box No. VII Certain defects in the international application
- ☒ Box No. VIII Certain observations on the international application

2. **FURTHER ACTION**

If a demand for international preliminary examination is made, this opinion will usually be considered to be a written opinion of the International Preliminary Examining Authority ("IPEA") except that this does not apply where the applicant chooses an Authority other than this one to be the IPEA and the chosen IPEA has notifed the International Bureau under Rule 66.1*bis*(b) that written opinions of this International Searching Authority will not be so considered.

If this opinion is, as provided above, considered to be a written opinion of the IPEA, the applicant is invited to submit to the IPEA a written reply together, where appropriate, with amendments, before the expiration of 3 months from the date of mailing of Form PCT/ISA/220 or before the expiration of 22 months from the priority date, whichever expires later.

For further options, see Form PCT/ISA/220.

3. For further details, see notes to Form PCT/ISA/220.

Name and mailing address of the ISA:	Date of completion of this opinion	Authorized Officer
European Patent Office D-80298 Munich Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	see form PCT/ISA/210	Perez, Franck Telephone No. +49 89 2399-7338

Form PCT/ISA/237 (Cover Sheet) (April 2005)

WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

International application No.
PCT/EP2008/060464

Box No. I Basis of the opinion

1. With regard to the **language**, this opinion has been established on the basis of:

   ☒ the international application in the language in which it was filed

   ☐ a translation of the international application into , which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1 (b)).

2. ☐ This opinion has been established taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43bis.1(a))

3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, this opinion has been established on the basis of:

   a. type of material:

      ☒ a sequence listing

      ☐ table(s) related to the sequence listing

   b. format of material:

      ☒ on paper

      ☒ in electronic form

   c. time of filing/furnishing:

      ☒ contained in the international application as filed.

      ☐ filed together with the international application in electronic form.

      ☒ furnished subsequently to this Authority for the purposes of search.

4. ☒ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

5. Additional comments:

Box No. II Priority

1. ☐ The validity of the priority claim has not been considered because the International Searching Authority does not have in its possession a copy of the earlier application whose priority has been claimed or, where required, a translation of that earlier application. This opinion has nevertheless been established on the assumption that the relevant date (Rules 43*bis*.1 and 64.1) is the claimed priority date.

2. ☐ This opinion has been established as if no priority had been claimed due to the fact that the priority claim has been found invalid (Rules 43*bis*.1 and 64.1). Thus for the purposes of this opinion, the international filing date indicated above is considered to be the relevant date.

3. Additional observations, if necessary:

see separate sheet

Box No. V Reasoned statement under Rule 43*bis*.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Yes:	Claims	2-53
	No:	Claims	1
Inventive step (IS)	Yes:	Claims	
	No:	Claims	1-53
Industrial applicability (IA)	Yes:	Claims	1-53 (see separate sheet)
	No:	Claims	

2. Citations and explanations

see separate sheet

Box No. VIII Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

see separate sheet

The written opinion is being carried out on the **following application documents**:

Description, Pages
Pages 1-64 as originally filed

Sequence listings, Pages
Pages 1-43 as originally filed

Claims, Numbers
Claims 1-53 as originally filed

Drawings, Sheets
Figures 1-19 as originally filed

Re Item II
Priority

3.1 Priority

The PCT application EP2008060464 claims priority on EP07114128. The priority was found to be valid.

Re Item V
Reasoned statement with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

5.1 Reference is made to the following documents; the numbering will be adhered to in the rest of the procedure:

D1: WO 2005/017148 A (TRUBION PHARMACEUTICALS INC [US]; LEDBETTER JEFFREY A [US]; HAYDEN-LED) 24 February 2005.

D2: DATABASE BIOSIS [Online] BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US; 1984, BOULIANNE G L ET AL: "PRODUCTION OF FUNCTIONAL CHIMERIC MOUSE-HUMAN ANTIBODY"

D3: US-B1-6 548 640 (WINTER GREGORY PAUL [GB]) 15 April 2003

D4: WO 2007/041635 A (XENCOR INC [US]; DESJARLAIS JOHN R [US]; KARKI SHER BAHADUR [US]; LAZA) 12 April 2007

D5: WO 2007/014278 A (TRUBION PHARMACEUTICALS [US]; GROSMAIRE LAURA SUE [US]; HAYDEN-LEDBETT) 1 February 2007

5.2 Novelty - Article 33(1) PCT

5.2.1 The present application does not meet the criteria of Article 33(1) PCT, because the subject-matter of claim 1 is not new in the sense of Article 33(2) PCT.

5.2.2 Claim 1 covers anti CD37 chimeric or humanized antibodies derived from the murine antibody G28.1 or from non human antibodies recognising the same epitope as G28.1. The term "derived from an antibody" is defined in the description (page 5) as "generated by modification of the starting antibody (as described below)". Further descriptions of the possible modification encompass antibodies having a sequence identity of 60% in the CDR regions.

5.2.3 In view of the very broad possible interpretation of claim 1 (see point 5.2.2 above) the anti CD37 humanised antibody TRU-016 disclosed in D5 is considered to fall within the scope of "an anti CD37 humanised antibody derived from G28.1 or from a non human antibodies recognising the same epitope as G28.1".

5.3 Inventive step - Articles 33(1) and 33(3) PCT

5.3.1 The present application does not meet the criteria of Article 33(1) PCT, because the subject-matter of claims 1-53 does not involve an inventive step in the sense of Article 33(3) PCT.

5.3.2 Document 1 is considered to be the closest prior art and discloses the murine monoclonal anti-CD37 antibody defined in claim 1 a).

The claimed subject-matter therefore differs from this known antibody in that the

claimed antibodies (i) have been humanised or (ii) are chimeric and optionally (iii) contain mutations of the Fc domain that modulate effector function.

The problem to be solved by the present invention may therefore be regarded as providing better anti CD-37 antibodies.

Nevertheless, the solution proposed in the present application cannot be considered to involve an inventive step, for the following reasons:

5.3.3 The advantages of using chimeric or humanised antibodies over non human antibodies are common knowledge of the art and techniques for producing them are routinely available to the skilled person. Examples of documents disclosing those techniques are D2 and D3. Therefore it would be obvious to the person skilled in the art, in order to provide better anti CD-37 antibodies, to prepare chimeric or humanized antibodies derived from the murine antibody disclosed in D1, thereby arriving at the subject-matter of claim 1-11 and 19-26.

5.3.4 Techniques for obtaining Fc variants antibodies are routinely available to the skilled person. Antibodies with modified Fc region with amino acids substitutions at positions 332 and/or 239 and/or 236 are known. Their modified properties with regard to the modulation of effector function is well known in the art (see for instance D4). It would be obvious to the person skilled in the art, in order to provide better anti CD-37 antibodies, to apply these techniques to the antibody disclosed in D1, thereby arriving at the subject-matter of claims 12-18.

5.3.5 The combination of the above techniques discussed in paragraphs 3.2 and 3.3, (eg humanised or chimeric antibodies with substituted Fc) for the purpose of providing better anti CD-37 antibodies, is also considered to be obvious to the person skilled in the art.

5.3.6 The use of anti CD-37 antibodies alone or in combination with anti CD-20 antibodies for depleting B cells is known from the prior art. This depletion is useful for the treatment of various B-cells malignancies (see D5). The use of the modified anti CD-37 antibodies claimed in the present application does not bring any unexpected effect with regard to B-cell depletion and or B-cell malignancies treatment that could involve an inventive step.

5.3.7 The pharmaceutical compositions comprising the non inventive antibodies of the application cannot be considered to bring an inventive step.

5.3.8 The subject-matter of claim 1-53 does not therefore involve an inventive step (Articles 33(1) and 33(3) PCT).

5.4 Industrial applicability - Articles 33(1) and 33(4) PCT

5.4.1 Claims 51 and 53 relate to subject-matter considered by this Authority to be covered by the provisions of Rule 39.1(iv) / 67.1(iv) PCT

The patentability can be dependent upon the formulation of the claims. The EPO, for example, does not recognise as patentable claims to the use of a compound in medical treatment, but may allow claims to a product, in particular substances or compositions for use in a first or further medical treatment.

Re Item VIII

Certain observations on the international application

8.1 Clarity - Article 6 PCT

8.1.1 The application does not meet the requirements of Article 6 PCT, because claims 1, 12-18, 27-50, are not clear.

8.1.2 The terms "an non-human antibody (...) recognising an epitope that is close to or overlaps with the same epitope recognized by the antibody defined in a) (eg G28.1)" used in claim 1 is unclear. Whereas the epitope recognized by the antibody G28.1 is clear as it can be experimentally characterized using the antibody G28.1, epitopes that overlaps or are close to it are not clearly characterized. The functional definition of an antibody recognizing this uncharacterized epitope is therefore not allowable as it brings unclarity into the claimed subject matter. This unclarity leaves the reader in doubt as to the meaning of the technical features of the antibodies to which it refers, thereby rendering the definition of the subject-matter of claim 1 unclear (Article 6 PCT). Dependant claims 12-18 lack clarity for the same reason.

8.1.3 Furthermore, claims 12-13 further lack clarity as they attempt to define the invention by a result to be achieved. In the present case this only amount to claiming for the underlying technical problem. The claims do not enable the reader to determine the required features to achieve the claimed effect.

8.1.4 Claim 27 and 32 lack clarity as far as they refer to the unclear antibody of claim 1 (see point 8.1.2 above). Dependant claims 26-31 and 33-35 also lack clarity for the same reason.

8.1.5 Claim 36 lack clarity as far as it refers to the unclear DNA molecules of claims 27-31 and 32-35 (see point 8.1.4 above).

8.1.6 Claim 37 and 40 lack clarity as far as they refer to the unclear vector of claim 36 (see point 8.1.5 above). Dependant claims 38-39 also lack clarity for the same reason.

8.1.7 Claims 41 and 51 lack clarity as far as they refer to the unclear antibody of claim 1 (see point 8.1.2 above). Dependant claims 42-50 and 52 also lack clarity for the same reason.

8.1.8 Claim 53 lacks clarity as far as it refers to the unclear pharmaceutical composition of claims 41-46 (see point 8.1.7 above).

8.1.9 Furthermore, notwithstanding the lack of clarity mentioned in the above paragraphs, claims 42-46 further lack clarity because they contain functional definition of compounds, namely "therapeutic agents", "agent that target a B cell antigen other than CD37", "agents that target CD20", "agents that induce apoptosis", "modulators of the TRAIL-1 receptor". Such claims provide in no way information as to the structural or technical features of said compounds. Said functional definition hence put an undue burden on the skilled person seeking to establish the scope of the claims and willing to carry out the invention over the whole of the broad field claimed.

8.2 Unity of invention

8.2.1 An objection for lack of unity could be raised with the entry into the regional

phase. The four different inventions covered by the claims would correspond to the four different preferred embodiments of the application identified as:

- A2 : antibody with heavy chain with SEQ ID NO 2 or 28, light chain with SEQ ID NO 4 or 30 and Fc region with S239D/I332E substitutions,
- A4 : antibody with heavy chain with SEQ ID NO 2 or 32, light chain with SEQ ID NO 4 or 34 and Fc region with S239D/I332E/G236A substitutions
- B2 : antibody with heavy chain with SEQ ID NO 6 or 36, light chain with SEQ ID NO 12 or 38 and Fc region with S239D/I332E substitutions.
- B4 : antibody with heavy chain with SEQ ID NO 6 or 40, light chain with SEQ ID NO 12 or 42 and Fc region with S239D/I332E/G236A substitutions.

8.3 Miscellaneous

The subject matter of claim 40 appears to covers the use of human body in a method for producing antibodies. An objection could be raised against this claim during the regional phase.

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

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau

(43) International Publication Date
12 February 2009 (12.02.2009)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2009/019312 A3

(51) International Patent Classification:
C07K 16/28 (2006.01) *A61K 39/395* (2006.01)
A61P 35/02 (2006.01) *C12N 5/00* (2006.01)

(21) International Application Number:
PCT/EP2008/060464

(22) International Filing Date: 8 August 2008 (08.08.2008)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
07114128.7 9 August 2007 (09.08.2007) EP

(71) Applicant *(for all designated States except US)*: **BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL GMBH** [DE/DE]; Binger Strasse 173, 55216 Ingelheim Am Rhein (DE).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants *(for US only)*: **HEIDER, Karl-Heinz** [DE/DE]; Boehringer Ingelheim Gmbh, CD Patents, Binger Strasse 173, 55216 Ingelheim Am Rhein (DE). **BORGES, Eric** [DE/DE]; Boehringer Ingelheim Gmbh, CD Patents, Binger Strasse 173, 55216 Ingelheim Am Rhein (DE). **OSTERMANN, Elinborg** [AT/DE]; Boehringer Ingelheim Gmbh, CD Patents, Binger Strasse 173, 55216 Ingelheim Am Rhein (DE).

(74) Agent: **HAMMANN, Heinz et al.**; Boehringer Ingelheim Gmbh, Cd Patents, Binger Strasse 173, 55216 Ingelheim Am Rhein, (DE).

(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, ST, 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*
— *before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments*
— *with sequence listing part of description published separately in electronic form and available upon request from the International Bureau*

(88) Date of publication of the international search report:
30 April 2009

(54) Title: ANTI CD37 ANTIBODIES

(57) Abstract: Chimeric and humanized anti-CD37 antibodies and pharmaceutical compositions containing them are useful for the treatment of B cell malignancies and autoimmune and inflammatory diseases that involve B cells in their pathology.

WO 2009/019312 A3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2008/060464

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C07K16/28 A61P35/02 A61K39/395 C12N5/00

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 A61K C12N A61P

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, BIOSIS, EMBASE, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2005/017148 A (TRUBION PHARMACEUTICALS INC [US]; LEDBETTER JEFFREY A [US]; HAYDEN-LED) 24 February 2005 (2005-02-24) page 79; example 35	1-53
Y	DATABASE BIOSIS [Online] BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US; 1984, BOULIANNE G L ET AL: "PRODUCTION OF FUNCTIONAL CHIMERIC MOUSE-HUMAN ANTIBODY" XP001084103 Database accession no. PREV198528056203 the whole document & NATURE (LONDON), vol. 312, no. 5995, 1984, pages 643-646, ISSN: 0028-0836	1-53

-/--

[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
16 January 2009	26/02/2009

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	Perez, Franck

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

203

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2008/060464

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 6 548 640 B1 (WINTER GREGORY PAUL [GB]) 15 April 2003 (2003-04-15) the whole document	1-53
Y	WO 2007/041635 A (XENCOR INC [US]; DESJARLAIS JOHN R [US]; KARKI SHER BAHADUR [US]; LAZA) 12 April 2007 (2007-04-12) paragraph [0196]	1-53
Y	WO 2007/014278 A (TRUBION PHARMACEUTICALS [US]; GROSMAIRE LAURA SUE [US]; HAYDEN-LEDBETT) 1 February 2007 (2007-02-01) paragraphs [0057] - [0137]; claim 1	1-53

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/EP2008/060464

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2005017148 A	24-02-2005	AU 2003300092 A1	07-03-2005
		BR PI0318417 A	25-07-2006
		CA 2533921 A1	24-02-2005
		CN 1852976 A	25-10-2006
		EP 1654358 A1	10-05-2006
		HR 20060074 A2	31-08-2006
		IS 8305 A	16-02-2006
		JP 2007528194 T	11-10-2007
		KR 20060070530 A	23-06-2006
		US 2007237779 A1	11-10-2007
US 6548640 B1	15-04-2003	NONE	
WO 2007041635 A	12-04-2007	AU 2006299429 A1	12-04-2007
		CA 2624189 A1	12-04-2007
		EP 1931709 A2	18-06-2008
		US 2007148170 A1	28-06-2007
		US 2008206867 A1	28-08-2008
WO 2007014278 A	01-02-2007	AU 2006272555 A1	01-02-2007
		CA 2616395 A1	01-02-2007
		EP 1912675 A2	23-04-2008
		KR 20080032192 A	14-04-2008

SEQUENCE LISTING

<110> Boehringer Ingelheim International GmbH

<120> Anti-CD37 Antibodies

<130> 12_0278_PCT

<160> 42

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1
<211> 348
<212> DNA
<213> Mus musculus

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(348)

<400> 1

```
gcg gtc cag ctg cag cag tct gga cct gag ctg gaa aag cct ggc gct       48
Ala Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Glu Lys Pro Gly Ala
1               5                   10                  15

tca gtg aag att tcc tgc aag gct tct ggt tac tca ttc act ggc tac       96
Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr
            20                  25                  30

aat atg aac tgg gtg aag cag aat aat gga aag agc ctt gag tgg att      144
Asn Met Asn Trp Val Lys Gln Asn Asn Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile
        35                  40                  45

gga aat att gat cct tat tat ggt ggt act acc tac aac cgg aag ttc      192
Gly Asn Ile Asp Pro Tyr Tyr Gly Gly Thr Thr Tyr Asn Arg Lys Phe
    50                  55                  60

aag ggc aag gcc aca ttg act gta gac aaa tcc tcc agc aca gcc tac      240
Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65                  70                  75                  80

atg cag ctc aag agt ctg aca tct gag gac tct gca gtc tat tac tgt      288
Met Gln Leu Lys Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

gca aga tcg gtc ggc cct atg gac tac tgg ggt caa gga acc tca gtc      336
Ala Arg Ser Val Gly Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val
            100                 105                 110

acc gtc tct tct                                                     348
Thr Val Ser Ser
        115
```

<210> 2
<211> 116
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 2

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

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

Asn Met Asn Trp Val Lys Gln Asn Asn Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile
        35                  40                  45

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

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

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

Ala Arg Ser Val Gly Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val
            100                 105                 110

Thr Val Ser Ser
        115
```

<210> 3
<211> 324
<212> DNA
<213> Mus musculus

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(324)

<400> 3

```
gac atc cag atg act cag tct cca gcc tcc cta tct gca tct gtg gga       48
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1               5                   10                  15

gag act gtc acc atc aca tgt cga aca agt gaa aat gtt tac agt tat       96
Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Thr Ser Glu Asn Val Tyr Ser Tyr
            20                  25                  30

ttg gct tgg tat cag cag aaa cag gga aaa tct cct cag ctc ctg gtc      144
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Gln Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Val
        35                  40                  45

tct ttt gca aaa acc tta gca gaa ggt gtg cca tca agg ttc agt ggc      192
Ser Phe Ala Lys Thr Leu Ala Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60

agt gga tca ggc aca cag ttt tct ctg aag atc agc agc ctg cag cct      240
Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Ser Leu Lys Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65                  70                  75                  80

gaa gat tct gga agt tat ttc tgt caa cat cat tcc gat aat ccg tgg      288
Glu Asp Ser Gly Ser Tyr Phe Cys Gln His His Ser Asp Asn Pro Trp
                85                  90                  95
```

```
acg ttc ggt gga ggc acc gaa ctg gag atc aaa cga                    324
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Glu Leu Glu Ile Lys Arg
            100                 105


<210>  4
<211>  108
<212>  PRT
<213>  Mus musculus

<400>  4

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


Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Thr Ser Glu Asn Val Tyr Ser Tyr
            20                  25                  30


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


Ser Phe Ala Lys Thr Leu Ala Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60


Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Ser Leu Lys Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65                  70                  75                  80


Glu Asp Ser Gly Ser Tyr Phe Cys Gln His His Ser Asp Asn Pro Trp
                85                  90                  95


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


<210>  5
<211>  348
<212>  DNA
<213>  Artificial

<220>
<223>  Humanized murine immunoglobulin sequence


<220>
<221>  CDS
<222>  (1)..(348)

<400>  5
gcc gtg cag ctg gtg cag agc gga gcc gag gtg aag aag ccc ggc agc      48
Ala Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
1               5                   10                  15

agc gtc aag gtg tcc tgc aag gcc agc ggc tac agc ttc acc ggc tac      96
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr
            20                  25                  30

aac atg aac tgg gtg cgg cag gcc cca ggc cag gga ctg gaa tgg atg     144
Asn Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
        35                  40                  45
```

```
ggc aac atc gac ccc tac tac ggc ggc acc acc tac aac cgg aag ttc      192
Gly Asn Ile Asp Pro Tyr Tyr Gly Gly Thr Thr Tyr Asn Arg Lys Phe
    50                  55                  60

aag ggc cgg gtg acc ctg acc gtg gac aag agc agc agc acc gcc tac      240
Lys Gly Arg Val Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65                  70                  75                  80

atg gaa ctg agc agc ctg cgg agc gag gac acc gcc gtg tac tac tgc      288
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

gcc aga tcc gtg ggc ccc atg gac tac tgg ggc cag ggc acc ctg gtc      336
Ala Arg Ser Val Gly Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
            100                 105                 110

acc gtc tct tca                                                     348
Thr Val Ser Ser
        115
```

<210> 6
<211> 116
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Synthetic Construct

<400> 6

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Ser Val Gly Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
            100                 105                 110

Thr Val Ser Ser
        115
```

<210> 7
<211> 348
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Humanized murine immunoglobulin sequence

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(348)

<400> 7

```
gcc gtg cag ctg gtc gag tct ggc ggc gga ctg gtg cag cct ggc ggc        48
Ala Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1               5                   10                  15

agc ctg aga ctg agc tgc aag gcc agc ggc tac agc ttc acc ggc tac        96
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr
            20                  25                  30

aac atg aac tgg gtg cgg cag gcc cct ggc aag ggc ctg gaa tgg gtg       144
Asn Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
        35                  40                  45

ggc aac atc gac ccc tac tac ggc ggc acc acc tac aac cgg aag ttc       192
Gly Asn Ile Asp Pro Tyr Tyr Gly Gly Thr Thr Tyr Asn Arg Lys Phe
    50                  55                  60

aag ggc agg gcc acc ctg agc gtg gac aag agc agc agc acc gcc tac       240
Lys Gly Arg Ala Thr Leu Ser Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65                  70                  75                  80

ctg cag atg aac agc ctg cgg gcc gag gac acc gcc gtg tac tac tgc       288
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

gcc aga tcc gtg ggc ccc atg gac tac tgg ggc cag ggc acc ctg gtc       336
Ala Arg Ser Val Gly Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
            100                 105                 110

acc gtc tct tca                                                      348
Thr Val Ser Ser
        115
```

<210> 8
<211> 116
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Synthetic Construct

<400> 8

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Ser Val Gly Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
            100                 105                 110

Thr Val Ser Ser
        115
```

<210> 9
<211> 348
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Humanized murine immunoglobulin sequence

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(348)

<400> 9

```
gcc gtg cag ctg gtc gag tct ggc ggc gga ctg gtg cag cct ggc ggc       48
Ala Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1               5                   10                  15

agc ctg aga ctg agc tgc aag gcc agc ggc tac agc ttc acc ggc tac       96
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr
            20                  25                  30

aac atg aac tgg gtg cgg cag gcc cct ggc aag ggc ctg gaa tgg gtg      144
Asn Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
        35                  40                  45

gcc aac atc gac ccc tac tac ggc ggc acc acc tac aac cgg aag gtc      192
Ala Asn Ile Asp Pro Tyr Tyr Gly Gly Thr Thr Tyr Asn Arg Lys Val
    50                  55                  60

aag ggc agg ttc acc atc agc gtg gac aag agc agc agc acc gcc tac      240
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65                  70                  75                  80

ctg cag atg aac agc ctg cgg gcc gag gac acc gcc gtg tac tac tgc      288
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

gcc aga tcc gtg ggc ccc atg gac tac tgg ggc cag ggc acc ctg gtc      336
Ala Arg Ser Val Gly Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
            100                 105                 110
```

```
acc gtc tct tca                                                    348
Thr Val Ser Ser
        115


<210>  10
<211>  116
<212>  PRT
<213>  Artificial

<220>
<223>  Synthetic Construct

<400>  10

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


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


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


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


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


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


Ala Arg Ser Val Gly Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
            100                 105                 110


Thr Val Ser Ser
        115


<210>  11
<211>  324
<212>  DNA
<213>  Artificial

<220>
<223>  Humanized murine immunoglobulin sequence


<220>
<221>  CDS
<222>  (1)..(324)

<400>  11
gac atc cag atg acc cag agc ccc agc agc ctg agc gcc agc gtg ggc      48
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1               5                   10                  15
```

```
gac cgg gtg acc atc acc tgc cgg acc agc gag aac gtg tac agc tac        96
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Thr Ser Glu Asn Val Tyr Ser Tyr
            20                  25                  30

ctg gcc tgg tat cag cag aag ccc ggc aag gcc ccc aag ctg ctg gtg       144
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Val
        35                  40                  45

tcc ttc gcc aag acc ctg gcc gag ggc gtg ccc agc cgg ttt agc ggc       192
Ser Phe Ala Lys Thr Leu Ala Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60

agc ggc tcc ggc acc gac ttc acc ctg acc atc agc agc ctg cag ccc       240
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65                  70                  75                  80

gag gac ttc gcc acc tac ttt tgc cag cac cac agc gac aac ccc tgg       288
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys Gln His His Ser Asp Asn Pro Trp
                85                  90                  95

acc ttc ggc cag ggc acc aag gtg gag atc aaa cgt                       324
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
            100                 105
```

<210> 12
<211> 108
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Synthetic Construct

<400> 12

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Thr Ser Glu Asn Val Tyr Ser Tyr
            20                  25                  30

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

Ser Phe Ala Lys Thr Leu Ala Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys Gln His His Ser Asp Asn Pro Trp
                85                  90                  95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
            100                 105
```

<210> 13

<211> 324
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Humanized murine immunoglobulin sequence

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(324)

<400> 13

```
gac atc gtg atg acc cag agc ccc agc agc ctg agc gcc agc gtg ggc        48
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1               5                   10                  15

gac cgg gtg acc atc acc tgc cgg gtc agc gag aac gtg tac agc tac        96
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Val Ser Glu Asn Val Tyr Ser Tyr
            20                  25                  30

ctg gcc tgg tat cag cag aag ccc ggc aag gcc ccc aag ctg ctg atc       144
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
        35                  40                  45

tcc ttc gcc aag acc ctg gcc gag ggc gtg ccc agc cgg ttt agc ggc       192
Ser Phe Ala Lys Thr Leu Ala Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60

agc ggc tcc ggc acc gac ttc acc ctg acc atc agc agc ctg cag ccc       240
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65                  70                  75                  80

gag gac ttc gcc acc tac ttt tgc cag cac cac agc gac aac ccc tgg       288
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys Gln His His Ser Asp Asn Pro Trp
                85                  90                  95

acc ttc ggc cag ggc acc aag gtg gag atc aaa cgt                       324
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
            100                 105
```

<210> 14
<211> 108
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Synthetic Construct

<400> 14

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Val Ser Glu Asn Val Tyr Ser Tyr
            20                  25                  30

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

Ser Phe Ala Lys Thr Leu Ala Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
```

```
    50                  55                  60

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys Gln His His Ser Asp Asn Pro Trp
                85                  90                  95

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

<210>  15
<211>  324
<212>  DNA
<213>  Artificial

<220>
<223>  Humanized murine immunoglobulin sequence

<220>
<221>  CDS
<222>  (1)..(324)

<400>  15
gac atc cag atg acc cag agc ccc agc agc ctg agc gcc agc gtg ggc       48
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1               5                   10                  15

gac cgg gtg acc atc acc tgc cgg acc agc gag aac gtg tac agc tac       96
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Thr Ser Glu Asn Val Tyr Ser Tyr
            20                  25                  30

ctg gcc tgg tat cag cag aag ccc ggc aag gcc ccc aag ctg ctg gtg      144
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Val
        35                  40                  45

tcc ttc gcc aag acc ctg gcc gag ggc gtg ccc agc cgg ttt agc ggc      192
Ser Phe Ala Lys Thr Leu Ala Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60

agc ggc tcc ggc acc cag ttc acc ctg acc atc agc agc ctg cag ccc      240
Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65                  70                  75                  80

gag gac ttc gcc acc tac ttt tgc cag cac cac agc gac aac ccc tgg      288
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys Gln His His Ser Asp Asn Pro Trp
                85                  90                  95

acc ttc ggc gga ggc acc gag ctg gag atc aaa cgt                      324
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Glu Leu Glu Ile Lys Arg
            100                 105

<210>  16
<211>  108
<212>  PRT
<213>  Artificial

<220>
<223>  Synthetic Construct
```

<400> 16

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Thr Ser Glu Asn Val Tyr Ser Tyr
20 25 30

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

Ser Phe Ala Lys Thr Leu Ala Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys Gln His His Ser Asp Asn Pro Trp
85 90 95

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

<210> 17
<211> 324
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Humanized murine immunoglobulin sequence

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(324)

<400> 17
gac atc gtg atg acc cag agc ccc gcc acc ctg agc ctg agc cct ggc 48
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

gag cgg gcc acc ctg tcc tgc cgg acc agc gag aac gtg tac agc tac 96
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Thr Ser Glu Asn Val Tyr Ser Tyr
20 25 30

ctg gcc tgg tat cag cag aag ccc ggc cag gcc ccc aga ctg ctg gtg 144
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Val
35 40 45

tcc ttc gcc aag acc ctg gcc gag ggc gtg ccc gcc agg ttt agc ggc 192
Ser Phe Ala Lys Thr Leu Ala Glu Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

agc ggc tcc ggc acc gac ttc acc ctg acc atc agc agc ctg gaa ccc 240
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80

```
gag gac ttc gcc gtg tac ttc tgc cag cac cac agc gac aac ccc tgg      288
Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys Gln His His Ser Asp Asn Pro Trp
                85                  90                  95

acc ttc ggc cag ggc acc aag gtg gag atc aaa cgt                      324
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
            100                 105


<210>  18
<211>  108
<212>  PRT
<213>  Artificial

<220>
<223>  Synthetic Construct

<400>  18

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


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


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


Ser Phe Ala Lys Thr Leu Ala Glu Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly

    50                  55                  60


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


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


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


<210>  19
<211>  324
<212>  DNA
<213>  Artificial

<220>
<223>  Humanized murine immunoglobulin sequence


<220>
<221>  CDS
<222>  (1)..(324)

<400>  19
gac atc gtg atg acc cag agc ccc gcc acc ctg agc ctg agc cct ggc       48
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1               5                   10                  15
```

```
gag cgg gcc acc ctg tcc tgc cgg gtc agc gag aac gtg tac agc tac        96
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Val Ser Glu Asn Val Tyr Ser Tyr
            20                  25                  30

ctg gcc tgg tat cag cag aag ccc ggc cag gcc ccc aga ctg ctg atc       144
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
        35                  40                  45

tcc ttc gcc aag acc ctg gcc gag ggc gtg ccc gcc agg ttt agc ggc       192
Ser Phe Ala Lys Thr Leu Ala Glu Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60

agc ggc tcc ggc acc gac ttc acc ctg acc atc agc agc ctg gaa ccc       240
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65                  70                  75                  80

gag gac ttc gcc gtg tac ttc tgc cag cac cac agc gac aac ccc tgg       288
Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys Gln His His Ser Asp Asn Pro Trp
                85                  90                  95

acc ttc ggc cag ggc acc aag gtg gag atc aaa cgt                       324
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
            100                 105
```

<210> 20
<211> 108
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Synthetic Construct

<400> 20

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

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

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

Ser Phe Ala Lys Thr Leu Ala Glu Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60

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

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

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
            100                 105
```

<210> 21

<211> 324
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Humanized murine immunoglobulin sequence

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(324)

<400> 21

```
gac atc gtg atg acc cag agc ccc gcc acc ctg agc ctg agc cct ggc       48
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1               5                   10                  15

gag cgg gcc acc ctg tcc tgc cgg acc agc gag aac gtg tac agc tac       96
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Thr Ser Glu Asn Val Tyr Ser Tyr
            20                  25                  30

ctg gcc tgg tat cag cag aag ccc ggc cag gcc ccc aga ctg ctg gtg      144
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Val
        35                  40                  45

tcc ttc gcc aag acc ctg gcc gag ggc gtg ccc gcc agg ttt agc ggc      192
Ser Phe Ala Lys Thr Leu Ala Glu Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60

agc ggc tcc ggc acc cag ttc acc ctg acc atc agc agc ctg gaa ccc      240
Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65                  70                  75                  80

gag gac ttc gcc gtg tac ttc tgc cag cac cac agc gac aac ccc tgg      288
Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys Gln His His Ser Asp Asn Pro Trp
                85                  90                  95

acc ttc ggc gga ggc acc gag ctg gag atc aaa cgt                      324
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Glu Leu Glu Ile Lys Arg
            100                 105
```

<210> 22
<211> 108
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Synthetic Construct

<400> 22

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

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

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

Ser Phe Ala Lys Thr Leu Ala Glu Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly
```

```
    50                  55                  60

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

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

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

<210> 23
<211> 990
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(990)

<400> 23

```
gcc tcc acc aag ggc cca tcg gtc ttc ccc ctg gca ccc tcc tcc aag       48
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1               5                   10                  15

agc acc tct ggg ggc aca gcg gcc ctg ggc tgc ctg gtc aag gac tac       96
Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
            20                  25                  30

ttc ccc gaa ccg gtg acg gtg tcg tgg aac tca ggc gcc ctg acc agc      144
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
        35                  40                  45

ggc gtg cac acc ttc ccg gct gtc cta cag tcc tca gga ctc tac tcc      192
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
    50                  55                  60

ctc agc agc gtg gtg acc gtg ccc tcc agc agc ttg ggc acc cag acc      240
Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65                  70                  75                  80

tac atc tgc aac gtg aat cac aag ccc agc aac acc aag gtg gac aag      288
Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
                85                  90                  95

aga gtt gag ccc aaa tct tgt gac aaa act cac aca tgc cca ccg tgc      336
Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
            100                 105                 110

cca gca cct gaa ctc ctg ggg gga ccg tca gtc ttc ctc ttc ccc cca      384
Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
        115                 120                 125

aaa ccc aag gac acc ctc atg atc tcc cgg acc cct gag gtc aca tgc      432
Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
    130                 135                 140

gtg gtg gtg gac gtg agc cac gaa gac cct gag gtc aag ttc aac tgg      480
Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145                 150                 155                 160
```

```
tac gtg gac ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag aca aag ccg cgg gag      528
Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
                165                 170                 175

gag cag tac aac agc acg tac cgt gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg      576
Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
            180                 185                 190

cac cag gac tgg ctg aat ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac      624
His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
        195                 200                 205

aaa gcc ctc cca gcc ccc atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggg      672
Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
    210                 215                 220

cag ccc cga gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgg gag gag      720
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
225                 230                 235                 240

atg acc aag aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat      768
Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
                245                 250                 255

ccc agc gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggg cag ccg gag aac      816
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
            260                 265                 270

aac tac aag acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc      864
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
        275                 280                 285

ctc tat agc aag ctc acc gtg gac aag agc agg tgg cag cag ggg aac      912
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
    290                 295                 300

gtc ttc tca tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac aac cac tac acg      960
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305                 310                 315                 320

cag aag agc ctc tcc ctg tcc ccg ggt aaa                              990
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
                325                 330
```

<210> 24
<211> 330
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 24

```
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1               5                   10                  15

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

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
        35                  40                  45
```

```
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
    50                  55                  60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65                  70                  75                  80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
                85                  90                  95

Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
            100                 105                 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
        115                 120                 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
    130                 135                 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145                 150                 155                 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
                165                 170                 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
            180                 185                 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
        195                 200                 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
    210                 215                 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
225                 230                 235                 240

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
                245                 250                 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
            260                 265                 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
        275                 280                 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
    290                 295                 300
```

```
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305                 310                 315                 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
                325                 330
```

<210> 25
<211> 318
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(318)

<400> 25

```
act gtg gct gca cca tct gtc ttc atc ttc ccg cca tct gat gag cag        48
Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
1               5                   10                  15

ttg aaa tct gga act gcc tct gtt gtg tgc ctg ctg aat aac ttc tat        96
Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
            20                  25                  30

ccc aga gag gcc aaa gta cag tgg aag gtg gat aac gcc ctc caa tcg       144
Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
        35                  40                  45

ggt aac tcc cag gag agt gtc aca gag cag gac agc aag gac agc acc       192
Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
    50                  55                  60

tac agc ctc agc agc acc ctg acg ctg agc aaa gca gac tac gag aaa       240
Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
65                  70                  75                  80

cac aaa gtc tac gcc tgc gaa gtc acc cat cag ggc ctg agc tcg ccc       288
His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
                85                  90                  95

gtc aca aag agc ttc aac agg gga gag tgt                               318
Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
            100                 105
```

<210> 26

<211> 106
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 26

```
Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
1               5                   10                  15

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

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
```

```
        35                  40                  45

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
    50                  55                  60

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
65                  70                  75                  80

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
                85                  90                  95

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
            100                 105
```

<210> 27
<211> 1338
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Fc-engineered chimeric immunoglobulin sequence

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1338)

<400> 27

```
gcg gtc cag ctg cag cag tct gga cct gag ctg gaa aag cct ggc gct       48
Ala Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Glu Lys Pro Gly Ala
1               5                   10                  15

tca gtg aag att tcc tgc aag gct tct ggt tac tca ttc act ggc tac       96
Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr
            20                  25                  30

aat atg aac tgg gtg aag cag aat aat gga aag agc ctt gag tgg att      144
Asn Met Asn Trp Val Lys Gln Asn Asn Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile
        35                  40                  45

gga aat att gat cct tat tat ggt ggt act acc tac aac cgg aag ttc      192
Gly Asn Ile Asp Pro Tyr Tyr Gly Gly Thr Thr Tyr Asn Arg Lys Phe
    50                  55                  60

aag ggc aag gcc aca ttg act gta gac aaa tcc tcc agc aca gcc tac      240
Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65                  70                  75                  80

atg cag ctc aag agt ctg aca tct gag gac tct gca gtc tat tac tgt      288
Met Gln Leu Lys Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

gca aga tcg gtc ggc cct atg gac tac tgg ggt caa gga acc tca gtc      336
Ala Arg Ser Val Gly Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val
            100                 105                 110

acc gtc tct tca gcc tcc acc aag ggc cca tcg gtc ttc ccc ctg gca      384
Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
        115                 120                 125
```

```
ccc tcc tcc aag agc acc tct ggg ggc aca gcg gcc ctg ggc tgc ctg      432
Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
    130                 135                 140

gtc aag gac tac ttc ccc gaa ccg gtg acg gtg tcg tgg aac tca ggc      480
Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
145                 150                 155                 160

gcc ctg acc agc ggc gtg cac acc ttc ccg gct gtc cta cag tcc tca      528
Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
                165                 170                 175

gga ctc tac tcc ctc agc agc gtg gtg acc gtg ccc tcc agc agc ttg      576
Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu
            180                 185                 190

ggc acc cag acc tac atc tgc aac gtg aat cac aag ccc agc aac acc      624
Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr
        195                 200                 205

aag gtg gac aag aga gtt gag ccc aaa tct tgt gac aaa act cac aca      672
Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr
    210                 215                 220

tgc cca ccg tgc cca gca cct gaa ctc ctg ggg gga ccg gac gtc ttc      720
Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Asp Val Phe
225                 230                 235                 240

ctc ttc ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc atg atc tcc cgg acc cct      768
Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
                245                 250                 255

gag gtc aca tgc gtg gtg gtg gac gtg agc cac gaa gac cct gag gtc      816
Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
            260                 265                 270

aag ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag aca      864
Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
        275                 280                 285

aag ccg cgg gag gag cag tac aac agc acg tac cgt gtg gtc agc gtc      912
Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
    290                 295                 300

ctc acc gtc ctg cac cag gac tgg ctg aat ggc aag gag tac aag tgc      960
Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
305                 310                 315                 320

aag gtc tcc aac aaa gcc ctc cca gcc ccc gaa gag aaa acc atc tcc     1008
Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Glu Glu Lys Thr Ile Ser
                325                 330                 335

aaa gcc aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc cca     1056
Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
            340                 345                 350

tcc cgg gag gag atg acc aag aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc     1104
Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
        355                 360                 365

aaa ggc ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggg     1152
Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
    370                 375                 380

cag ccg gag aac aac tac aag acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc gac     1200
```

```
Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
385                 390                 395                 400

ggc tcc ttc ttc ctc tat agc aag ctc acc gtg gac aag agc agg tgg     1248
Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
                405                 410                 415

cag cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac     1296
Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
            420                 425                 430

aac cac tac acg cag aag agc ctc tcc ctg tcc ccg ggt aaa             1338
Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
        435                 440                 445


<210>  28

<211>  446
<212>  PRT
<213>  Artificial

<220>
<223>  Synthetic Construct

<400>  28

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


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


Asn Met Asn Trp Val Lys Gln Asn Asn Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile
        35                  40                  45


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


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


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


Ala Arg Ser Val Gly Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val
            100                 105                 110


Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
        115                 120                 125


Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
    130                 135                 140


Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
145                 150                 155                 160
```

```
Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
                165                 170                 175

Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu
            180                 185                 190

Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr
        195                 200                 205

Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr
    210                 215                 220

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Asp Val Phe
225                 230                 235                 240

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
                245                 250                 255

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
            260                 265                 270

Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
        275                 280                 285

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
    290                 295                 300

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
305                 310                 315                 320

Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Glu Glu Lys Thr Ile Ser
                325                 330                 335

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
            340                 345                 350

Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
        355                 360                 365

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
    370                 375                 380

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
385                 390                 395                 400

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
                405                 410                 415
```

```
Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
            420                 425                 430

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
        435                 440                 445
```

<210> 29
<211> 642
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Chimeric immunoglobulin sequence

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(642)

<400> 29

```
gac atc cag atg act cag tct cca gcc tcc cta tct gca tct gtg gga       48
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1               5                   10                  15

gag act gtc acc atc aca tgt cga aca agt gaa aat gtt tac agt tat       96
Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Thr Ser Glu Asn Val Tyr Ser Tyr
            20                  25                  30

ttg gct tgg tat cag cag aaa cag gga aaa tct cct cag ctc ctg gtc      144
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Gln Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Val
        35                  40                  45

tct ttt gca aaa acc tta gca gaa ggt gtg cca tca agg ttc agt ggc      192
Ser Phe Ala Lys Thr Leu Ala Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60

agt gga tca ggc aca cag ttt tct ctg aag atc agc agc ctg cag cct      240
Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Ser Leu Lys Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65                  70                  75                  80

gaa gat tct gga agt tat ttc tgt caa cat cat tcc gat aat ccg tgg      288
Glu Asp Ser Gly Ser Tyr Phe Cys Gln His His Ser Asp Asn Pro Trp
                85                  90                  95

acg ttc ggt gga ggc acc gaa ctg gag atc aaa cga act gtg gct gca      336
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Glu Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
            100                 105                 110

cca tct gtc ttc atc ttc ccg cca tct gat gag cag ttg aaa tct gga      384
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
        115                 120                 125

act gcc tct gtt gtg tgc ctg ctg aat aac ttc tat ccc aga gag gcc      432
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
    130                 135                 140

aaa gta cag tgg aag gtg gat aac gcc ctc caa tcg ggt aac tcc cag      480
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145                 150                 155                 160

gag agt gtc aca gag cag gac agc aag gac agc acc tac agc ctc agc      528
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
```

```
                165                 170                 175

agc acc ctg acg ctg agc aaa gca gac tac gag aaa cac aaa gtc tac      576
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
            180                 185                 190

gcc tgc gaa gtc acc cat cag ggc ctg agc tcg ccc gtc aca aag agc      624
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
        195                 200                 205

ttc aac agg gga gag tgt                                              642
Phe Asn Arg Gly Glu Cys
    210
```

<210> 30
<211> 214
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Synthetic Construct

<400> 30

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


Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Thr Ser Glu Asn Val Tyr Ser Tyr
            20                  25                  30


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


Ser Phe Ala Lys Thr Leu Ala Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60


Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Ser Leu Lys Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65                  70                  75                  80


Glu Asp Ser Gly Ser Tyr Phe Cys Gln His His Ser Asp Asn Pro Trp
                85                  90                  95


Thr Phe Gly Gly Gly Thr Glu Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
            100                 105                 110


Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
        115                 120                 125


Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
    130                 135                 140


Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145                 150                 155                 160
```

```
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
                165                 170                 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
            180                 185                 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
        195                 200                 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
    210
```

<210> 31
<211> 1338
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Fc-engineered chimeric immunoglobulin sequence

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1338)

<400> 31

```
gcg gtc cag ctg cag cag tct gga cct gag ctg gaa aag cct ggc gct       48
Ala Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Glu Lys Pro Gly Ala
1               5                   10                  15

tca gtg aag att tcc tgc aag gct tct ggt tac tca ttc act ggc tac       96
Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr
            20                  25                  30

aat atg aac tgg gtg aag cag aat aat gga aag agc ctt gag tgg att      144
Asn Met Asn Trp Val Lys Gln Asn Asn Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile
        35                  40                  45

gga aat att gat cct tat tat ggt ggt act acc tac aac cgg aag ttc      192
Gly Asn Ile Asp Pro Tyr Tyr Gly Gly Thr Thr Tyr Asn Arg Lys Phe
    50                  55                  60

aag ggc aag gcc aca ttg act gta gac aaa tcc tcc agc aca gcc tac      240
Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65                  70                  75                  80

atg cag ctc aag agt ctg aca tct gag gac tct gca gtc tat tac tgt      288
Met Gln Leu Lys Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

gca aga tcg gtc ggc cct atg gac tac tgg ggt caa gga acc tca gtc      336
Ala Arg Ser Val Gly Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val
            100                 105                 110

acc gtc tct tca gcc tcc acc aag ggc cca tcg gtc ttc ccc ctg gca      384
Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
        115                 120                 125

ccc tcc tcc aag agc acc tct ggg ggc aca gcg gcc ctg ggc tgc ctg      432
Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
```

```
    130                 135                 140

gtc aag gac tac ttc ccc gaa ccg gtg acg gtg tcg tgg aac tca ggc      480
Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
145                 150                 155                 160

gcc ctg acc agc ggc gtg cac acc ttc ccg gct gtc cta cag tcc tca      528
Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
                165                 170                 175

gga ctc tac tcc ctc agc agc gtg gtg acc gtg ccc tcc agc agc ttg      576
Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu
            180                 185                 190

ggc acc cag acc tac atc tgc aac gtg aat cac aag ccc agc aac acc      624
Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr
        195                 200                 205

aag gtg gac aag aga gtt gag ccc aaa tct tgt gac aaa act cac aca      672
Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr
    210                 215                 220

tgc cca ccg tgc cca gca cct gaa ctc ctg gcg gga ccg gat gtc ttc      720
Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Ala Gly Pro Asp Val Phe
225                 230                 235                 240

ctc ttc ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc atg atc tcc cgg acc cct      768
Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
                245                 250                 255

gag gtc aca tgc gtg gtg gtg gac gtg agc cac gaa gac cct gag gtc      816
Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
            260                 265                 270

aag ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag aca      864
Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
        275                 280                 285

aag ccg cgg gag gag cag tac aac agc acg tac cgt gtg gtc agc gtc      912
Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
    290                 295                 300

ctc acc gtc ctg cac cag gac tgg ctg aat ggc aag gag tac aag tgc      960
Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
305                 310                 315                 320

aag gtc tcc aac aaa gcc ctc cca gcc ccc gaa gag aaa acc atc tcc     1008
Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Glu Glu Lys Thr Ile Ser
                325                 330                 335

aaa gcc aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc cca     1056
Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
            340                 345                 350

tcc cgg gag gag atg acc aag aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc     1104
Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
        355                 360                 365

aaa ggc ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggg     1152
Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
    370                 375                 380

cag ccg gag aac aac tac aag acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc gac     1200
Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
385                 390                 395                 400
```

```
ggc tcc ttc ttc ctc tat agc aag ctc acc gtg gac aag agc agg tgg     1248
Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
                405                 410                 415

cag cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac     1296
Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
            420                 425                 430

aac cac tac acg cag aag agc ctc tcc ctg tcc ccg ggt aaa             1338
Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
        435                 440                 445
```

<210> 32
<211> 446
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Synthetic Construct

<400> 32

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

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

Asn Met Asn Trp Val Lys Gln Asn Asn Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile
        35                  40                  45

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

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

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

Ala Arg Ser Val Gly Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val
            100                 105                 110

Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
        115                 120                 125

Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
    130                 135                 140

Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
145                 150                 155                 160

Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
```

```
                165                 170                 175

Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu
            180                 185                 190

Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr
        195                 200                 205

Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr
    210                 215                 220

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Ala Gly Pro Asp Val Phe
225                 230                 235                 240

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
                245                 250                 255

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
            260                 265                 270

Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
        275                 280                 285

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
    290                 295                 300

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
305                 310                 315                 320

Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Glu Glu Lys Thr Ile Ser
                325                 330                 335

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
            340                 345                 350

Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
        355                 360                 365

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
    370                 375                 380

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
385                 390                 395                 400

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
                405                 410                 415

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
            420                 425                 430
```

```
Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
        435                 440                 445


<210>  33
<211>  642
<212>  DNA
<213>  Artificial

<220>
<223>  Chimeric immunoglobulin sequence


<220>
<221>  CDS
<222>  (1)..(642)

<400>  33
gac atc cag atg act cag tct cca gcc tcc cta tct gca tct gtg gga       48
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1               5                   10                  15

gag act gtc acc atc aca tgt cga aca agt gaa aat gtt tac agt tat       96
Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Thr Ser Glu Asn Val Tyr Ser Tyr
            20                  25                  30

ttg gct tgg tat cag cag aaa cag gga aaa tct cct cag ctc ctg gtc      144
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Gln Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Val
        35                  40                  45

tct ttt gca aaa acc tta gca gaa ggt gtg cca tca agg ttc agt ggc      192
Ser Phe Ala Lys Thr Leu Ala Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60

agt gga tca ggc aca cag ttt tct ctg aag atc agc agc ctg cag cct      240
Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Ser Leu Lys Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65                  70                  75                  80

gaa gat tct gga agt tat ttc tgt caa cat cat tcc gat aat ccg tgg      288
Glu Asp Ser Gly Ser Tyr Phe Cys Gln His His Ser Asp Asn Pro Trp
                85                  90                  95

acg ttc ggt gga ggc acc gaa ctg gag atc aaa cga act gtg gct gca      336
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Glu Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
            100                 105                 110

cca tct gtc ttc atc ttc ccg cca tct gat gag cag ttg aaa tct gga      384
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
        115                 120                 125

act gcc tct gtt gtg tgc ctg ctg aat aac ttc tat ccc aga gag gcc      432
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
    130                 135                 140

aaa gta cag tgg aag gtg gat aac gcc ctc caa tcg ggt aac tcc cag      480
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145                 150                 155                 160

gag agt gtc aca gag cag gac agc aag gac agc acc tac agc ctc agc      528
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
                165                 170                 175

agc acc ctg acg ctg agc aaa gca gac tac gag aaa cac aaa gtc tac      576
```

```
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
            180                 185                 190

gcc tgc gaa gtc acc cat cag ggc ctg agc tcg ccc gtc aca aag agc      624
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
        195                 200                 205

ttc aac agg gga gag tgt                                              642
Phe Asn Arg Gly Glu Cys
    210
```

<210> 34
<211> 214
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Synthetic Construct

<400> 34

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

Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Thr Ser Glu Asn Val Tyr Ser Tyr
            20                  25                  30

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

Ser Phe Ala Lys Thr Leu Ala Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60

Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Ser Leu Lys Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65                  70                  75                  80

Glu Asp Ser Gly Ser Tyr Phe Cys Gln His His Ser Asp Asn Pro Trp
                85                  90                  95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Glu Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
            100                 105                 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
        115                 120                 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
    130                 135                 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145                 150                 155                 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
                165                 170                 175
```

```
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
            180                 185                 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
        195                 200                 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
    210
```

<210> 35
<211> 1338
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Fc-engineered humanized immunoglobulin sequence

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1338)

<400> 35

```
gcg gtc cag ctg gtg cag agc gga gcc gag gtg aag aag ccc ggc agc       48
Ala Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
1               5                   10                  15

agc gtc aag gtg tcc tgc aag gcc agc ggc tac agc ttc acc ggc tac       96
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr
            20                  25                  30

aac atg aac tgg gtg cgg cag gcc cca ggc cag gga ctg gaa tgg atg      144
Asn Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
        35                  40                  45

ggc aac atc gac ccc tac tac ggc ggc acc acc tac aac cgg aag ttc      192
Gly Asn Ile Asp Pro Tyr Tyr Gly Gly Thr Thr Tyr Asn Arg Lys Phe
    50                  55                  60

aag ggc cgg gtg acc ctg acc gtg gac aag agc agc agc acc gcc tac      240
Lys Gly Arg Val Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65                  70                  75                  80

atg gaa ctg agc agc ctg cgg agc gag gac acc gcc gtg tac tac tgc      288
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

gcc aga tcc gtg ggc ccc atg gac tac tgg ggc cag ggc acc ctg gtc      336
Ala Arg Ser Val Gly Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
            100                 105                 110

acc gtc tct tca gcc tcc acc aag ggc cca tcg gtc ttc ccc ctg gca      384
Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
        115                 120                 125

ccc tcc tcc aag agc acc tct ggg ggc aca gcg gcc ctg ggc tgc ctg      432
Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
    130                 135                 140
```

```
gtc aag gac tac ttc ccc gaa ccg gtg acg gtg tcg tgg aac tca ggc      480
Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
145                 150                 155                 160

gcc ctg acc agc ggc gtg cac acc ttc ccg gct gtc cta cag tcc tca      528
Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
                165                 170                 175

gga ctc tac tcc ctc agc agc gtg gtg acc gtg ccc tcc agc agc ttg      576
Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu
            180                 185                 190

ggc acc cag acc tac atc tgc aac gtg aat cac aag ccc agc aac acc      624
Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr
        195                 200                 205

aag gtg gac aag aga gtt gag ccc aaa tct tgt gac aaa act cac aca      672
Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr
    210                 215                 220

tgc cca ccg tgc cca gca cct gaa ctc ctg ggg gga ccg gac gtc ttc      720
Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Asp Val Phe
225                 230                 235                 240

ctc ttc ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc atg atc tcc cgg acc cct      768
Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
                245                 250                 255

gag gtc aca tgc gtg gtg gtg gac gtg agc cac gaa gac cct gag gtc      816
Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
            260                 265                 270


aag ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag aca      864
Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
        275                 280                 285

aag ccg cgg gag gag cag tac aac agc acg tac cgt gtg gtc agc gtc      912
Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
    290                 295                 300

ctc acc gtc ctg cac cag gac tgg ctg aat ggc aag gag tac aag tgc      960
Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
305                 310                 315                 320

aag gtc tcc aac aaa gcc ctc cca gcc ccc gaa gag aaa acc atc tcc     1008
Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Glu Glu Lys Thr Ile Ser
                325                 330                 335

aaa gcc aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc cca     1056
Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
            340                 345                 350

tcc cgg gag gag atg acc aag aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc     1104
Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
        355                 360                 365

aaa ggc ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggg     1152
Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
    370                 375                 380

cag ccg gag aac aac tac aag acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc gac     1200
Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
385                 390                 395                 400
```

```
ggc tcc ttc ttc ctc tat agc aag ctc acc gtg gac aag agc agg tgg     1248
Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
                405                 410                 415

cag cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac     1296
Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
            420                 425                 430

aac cac tac acg cag aag agc ctc tcc ctg tcc ccg ggt aaa             1338
Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
        435                 440                 445
```

<210> 36
<211> 446
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Synthetic Construct

<400> 36

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Ser Val Gly Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
            100                 105                 110

Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
        115                 120                 125

Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
    130                 135                 140

Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
145                 150                 155                 160
```

```
Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
                165                 170                 175

Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu
            180                 185                 190

Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr
        195                 200                 205

Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr
    210                 215                 220

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Asp Val Phe
225                 230                 235                 240

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
                245                 250                 255

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
            260                 265                 270

Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
        275                 280                 285

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
    290                 295                 300

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
305                 310                 315                 320

Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Glu Glu Lys Thr Ile Ser
                325                 330                 335

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
            340                 345                 350

Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
        355                 360                 365

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
    370                 375                 380

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
385                 390                 395                 400

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
                405                 410                 415
```

```
Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
            420                 425                 430

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
        435                 440                 445
```

<210> 37
<211> 642
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Humanized immunoglobulin sequence

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(642)

<400> 37

```
gac atc cag atg acc cag agc ccc agc agc ctg agc gcc agc gtg ggc       48
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1               5                   10                  15

gac cgg gtg acc atc acc tgc cgg acc agc gag aac gtg tac agc tac       96
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Thr Ser Glu Asn Val Tyr Ser Tyr
            20                  25                  30

ctg gcc tgg tat cag cag aag ccc ggc aag gcc ccc aag ctg ctg gtg      144
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Val
        35                  40                  45

tcc ttc gcc aag acc ctg gcc gag ggc gtg ccc agc cgg ttt agc ggc      192
Ser Phe Ala Lys Thr Leu Ala Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60

agc ggc tcc ggc acc gac ttc acc ctg acc atc agc agc ctg cag ccc      240
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65                  70                  75                  80

gag gac ttc gcc acc tac ttt tgc cag cac cac agc gac aac ccc tgg      288
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys Gln His His Ser Asp Asn Pro Trp
                85                  90                  95

acc ttc ggc cag ggc acc aag gtg gag atc aaa cga act gtg gct gca      336
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
            100                 105                 110

cca tct gtc ttc atc ttc ccg cca tct gat gag cag ttg aaa tct gga      384
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
        115                 120                 125

act gcc tct gtt gtg tgc ctg ctg aat aac ttc tat ccc aga gag gcc      432
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
    130                 135                 140

aaa gta cag tgg aag gtg gat aac gcc ctc caa tcg ggt aac tcc cag      480
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145                 150                 155                 160

gag agt gtc aca gag cag gac agc aag gac agc acc tac agc ctc agc      528
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
                165                 170                 175
```

```
agc acc ctg acg ctg agc aaa gca gac tac gag aaa cac aaa gtc tac      576
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
            180                 185                 190

gcc tgc gaa gtc acc cat cag ggc ctg agc tcg ccc gtc aca aag agc      624
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
        195                 200                 205

ttc aac agg gga gag tgt                                              642
Phe Asn Arg Gly Glu Cys
    210
```

<210> 38
<211> 214
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Synthetic Construct

<400> 38

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Thr Ser Glu Asn Val Tyr Ser Tyr
            20                  25                  30

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

Ser Phe Ala Lys Thr Leu Ala Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys Gln His His Ser Asp Asn Pro Trp
                85                  90                  95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
            100                 105                 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
        115                 120                 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
    130                 135                 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145                 150                 155                 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
```

```
                165                 170                 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
            180                 185                 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
        195                 200                 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
    210
```

<210> 39
<211> 1338
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Fc-engineered humanized immunoglobulin sequence

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1338)

<400> 39

```
gcg gtc cag ctg gtg cag agc gga gcc gag gtg aag aag ccc ggc agc       48
Ala Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
1               5                   10                  15

agc gtc aag gtg tcc tgc aag gcc agc ggc tac agc ttc acc ggc tac       96
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr
            20                  25                  30

aac atg aac tgg gtg cgg cag gcc cca ggc cag gga ctg gaa tgg atg      144
Asn Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
        35                  40                  45

ggc aac atc gac ccc tac tac ggc ggc acc acc tac aac cgg aag ttc      192
Gly Asn Ile Asp Pro Tyr Tyr Gly Gly Thr Thr Tyr Asn Arg Lys Phe
    50                  55                  60

aag ggc cgg gtg acc ctg acc gtg gac aag agc agc agc acc gcc tac      240
Lys Gly Arg Val Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65                  70                  75                  80

atg gaa ctg agc agc ctg cgg agc gag gac acc gcc gtg tac tac tgc      288
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

gcc aga tcc gtg ggc ccc atg gac tac tgg ggc cag ggc acc ctg gtc      336
Ala Arg Ser Val Gly Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
            100                 105                 110

acc gtc tct tca gcc tcc acc aag ggc cca tcg gtc ttc ccc ctg gca      384
Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
        115                 120                 125

ccc tcc tcc aag agc acc tct ggg ggc aca gcg gcc ctg ggc tgc ctg      432
Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
    130                 135                 140
```

```
gtc aag gac tac ttc ccc gaa ccg gtg acg gtg tcg tgg aac tca ggc      480
Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
145                 150                 155                 160

gcc ctg acc agc ggc gtg cac acc ttc ccg gct gtc cta cag tcc tca      528
Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
                165                 170                 175

gga ctc tac tcc ctc agc agc gtg gtg acc gtg ccc tcc agc agc ttg      576
Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu
            180                 185                 190

ggc acc cag acc tac atc tgc aac gtg aat cac aag ccc agc aac acc      624
Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr
        195                 200                 205

aag gtg gac aag aga gtt gag ccc aaa tct tgt gac aaa act cac aca      672
Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr
    210                 215                 220

tgc cca ccg tgc cca gca cct gaa ctc ctg gcg gga ccg gat gtc ttc      720
Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Ala Gly Pro Asp Val Phe
225                 230                 235                 240

ctc ttc ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc atg atc tcc cgg acc cct      768
Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
                245                 250                 255

gag gtc aca tgc gtg gtg gtg gac gtg agc cac gaa gac cct gag gtc      816
Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
            260                 265                 270

aag ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag aca      864
Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
        275                 280                 285

aag ccg cgg gag gag cag tac aac agc acg tac cgt gtg gtc agc gtc      912
Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
    290                 295                 300

ctc acc gtc ctg cac cag gac tgg ctg aat ggc aag gag tac aag tgc      960
Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
305                 310                 315                 320

aag gtc tcc aac aaa gcc ctc cca gcc ccc gaa gag aaa acc atc tcc     1008
Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Glu Glu Lys Thr Ile Ser
                325                 330                 335

aaa gcc aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc cca     1056
Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
            340                 345                 350

tcc cgg gag gag atg acc aag aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc     1104
Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
        355                 360                 365

aaa ggc ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggg     1152
Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
    370                 375                 380

cag ccg gag aac aac tac aag acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc gac     1200
Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
385                 390                 395                 400
```

```
ggc tcc ttc ttc ctc tat agc aag ctc acc gtg gac aag agc agg tgg     1248
Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
                405                 410                 415

cag cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac     1296
Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
            420                 425                 430

aac cac tac acg cag aag agc ctc tcc ctg tcc ccg ggt aaa             1338
Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
        435                 440                 445
```

<210> 40
<211> 446
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Synthetic Construct

<400> 40

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Ser Val Gly Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
            100                 105                 110

Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
        115                 120                 125

Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
    130                 135                 140

Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
145                 150                 155                 160

Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
```

```
                165                 170                 175

Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu
            180                 185                 190

Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr
        195                 200                 205

Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr
    210                 215                 220

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Ala Gly Pro Asp Val Phe
225                 230                 235                 240

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
                245                 250                 255

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
            260                 265                 270

Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
        275                 280                 285

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
    290                 295                 300

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
305                 310                 315                 320

Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Glu Glu Lys Thr Ile Ser
                325                 330                 335

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
            340                 345                 350

Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
        355                 360                 365

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
    370                 375                 380

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
385                 390                 395                 400

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
                405                 410                 415

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
            420                 425                 430
```

```
Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
        435                 440                 445


<210>  41
<211>  642
<212>  DNA
<213>  Artificial

<220>
<223>  Humanized immunoglobulin sequence


<220>
<221>  CDS
<222>  (1)..(642)

<400>  41
gac atc cag atg acc cag agc ccc agc agc ctg agc gcc agc gtg ggc       48
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1               5                  10                  15

gac cgg gtg acc atc acc tgc cgg acc agc gag aac gtg tac agc tac       96
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Thr Ser Glu Asn Val Tyr Ser Tyr
            20                  25                  30

ctg gcc tgg tat cag cag aag ccc ggc aag gcc ccc aag ctg ctg gtg      144
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Val
        35                  40                  45

tcc ttc gcc aag acc ctg gcc gag ggc gtg ccc agc cgg ttt agc ggc      192
Ser Phe Ala Lys Thr Leu Ala Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60

agc ggc tcc ggc acc gac ttc acc ctg acc atc agc agc ctg cag ccc      240
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65                  70                  75                  80

gag gac ttc gcc acc tac ttt tgc cag cac cac agc gac aac ccc tgg      288
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys Gln His His Ser Asp Asn Pro Trp
                85                  90                  95

acc ttc ggc cag ggc acc aag gtg gag atc aaa cga act gtg gct gca      336
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
            100                 105                 110

cca tct gtc ttc atc ttc ccg cca tct gat gag cag ttg aaa tct gga      384
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
        115                 120                 125

act gcc tct gtt gtg tgc ctg ctg aat aac ttc tat ccc aga gag gcc      432
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
    130                 135                 140

aaa gta cag tgg aag gtg gat aac gcc ctc caa tcg ggt aac tcc cag      480
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145                 150                 155                 160

gag agt gtc aca gag cag gac agc aag gac agc acc tac agc ctc agc      528
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
                165                 170                 175

agc acc ctg acg ctg agc aaa gca gac tac gag aaa cac aaa gtc tac      576
```

```
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
            180                 185                 190

gcc tgc gaa gtc acc cat cag ggc ctg agc tcg ccc gtc aca aag agc      624
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
        195                 200                 205

ttc aac agg gga gag tgt                                              642
Phe Asn Arg Gly Glu Cys
    210
```

<210> 42
<211> 214
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Synthetic Construct

<400> 42

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Thr Ser Glu Asn Val Tyr Ser Tyr
            20                  25                  30

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

Ser Phe Ala Lys Thr Leu Ala Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys Gln His His Ser Asp Asn Pro Trp
                85                  90                  95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
            100                 105                 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
        115                 120                 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
    130                 135                 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145                 150                 155                 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
                165                 170                 175
```

```
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
            180                 185                 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
        195                 200                 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
    210
```

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 10-014090- -00000-0000
Fecha: 2010-02-09 16:59:25 Dep: 2020 DIR.NUEVASCR
Tra: 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act: 411 PRESENTACION Folios: 247

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 presenta la 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 ☐