

JOSE LLOREDA CAMACHO & CO.

ABOGADOS

Calle 72 No. 5-83 Piso 5, Bogotá, D.C. Tel: 6069700 Fax 6069701

Señor

SUPERINTENDENTE DE INDUSTRIA Y (

DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

E. S.

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 06-050457-00008-0000

Fecha: 2011-02-02 16:43:01 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR

Tra. 11 PATENTEIYI

Eve: 378 FASENACIONALI

Act. 444 RESPUESTAREQUE

Folios: 123

Re: P1.-GLYCART BIOTECHNOLOGY AG.-Solicitud de Patente de Invención en Fase Nacional PCT para "MOLECULAS QUE SE ENLAZAN A ANTÍGENO CON AFINIDAD DE ENLACE AL RECEPTOR Fc AUMENTADA Y FUNCIÓN EFECTORA".-Clase C07K 16/28- Expediente número 06-050.457.-

1. Me refiero al auto dictado por ese Despacho notificado por fijación en lista de 24 de Septiembre de 2010 y a mi memorial solicitando plazo de Diciembre 16 de 2010.

2. Con el propósito de responder a las objeciones presentadas por el Señor Examinador en su Concepto Técnico **No. 2999** en relación con la Claridad del Capitulo Reivindicatorio, la presencia de materia no considerada una invención y el Nivel Inventivo de la solicitud en estudio, me permito dirigir su atención a las siguientes modificaciones y argumentos técnicos, por medio de los cuales no sólo se superan completamente dichas objeciones, sino que además se establece de manera irrefutable la patentabilidad de la presente solicitud.

3. **MODIFICACIONES VOLUNTARIAS-CAPÍTULO DESCRIPTIVO.**

Antes de responder a las mencionadas objeciones que fueron presentadas con respecto a la solicitud en estudio, me permito manifestar que es deseo del solicitante enmendar errores menores cometidos en el momento de la presentación internacional de la solicitud, los cuales le restan claridad al texto de la descripción.

De esta forma, se ha corregido la referencia incorrecta que se realizaba de la SEQ ID NO:2 o de la SEQ ID NO:3 en los párrafos [0022], [0025], [0029], [0032], [0053], [0056], y [0057], así como en el encabezado de la Figura 2.

En este sentido me permito resaltar que a partir de la lista de secuencias incluida dentro de la descripción de la solicitud en estudio es evidente que la SEQ ID NO: 2 corresponde a una secuencia de nucleótidos, mientras que la SEQ ID NO:3 corresponde a una secuencia de aminoácidos. Por lo tanto, los apartes de la descripción mencionados anteriormente claramente incurrían en un error cuando se

señalaba por ejemplo "un polinucleótido que comprende una secuencia que tiene al menos un 80% de identidad a la SEQ ID NO:3", toda vez que la secuencia 3, evidentemente es una secuencia de aminoácidos, como lo muestra la ya mencionada lista de secuencias.

Así mismo, aunque la figura 2 muestra las secuencias correspondientes a SEQ ID NO:3 y SEQ ID NO:4, como resulta evidente si se compara dichas secuencias allí contenidas con aquellas presentadas en la lista de secuencias, erróneamente se repitió en el título de esta figura la referencia a las SEQ ID NO:1 y SEQ ID NO:2. Siendo este un error material, el solicitante ha enmendado esta referencia equivocada.

En relación con estas correcciones me permito señalar que no corresponden de ninguna manera a una ampliación al alcance de la invención, tal como fue originalmente presentada, toda vez que se está haciendo aún más clara la revelación del objeto de la invención en concordancia con lo presentado en la lista de secuencias anexa a la descripción de la solicitud.

4. **CLARIDAD DEL CAPÍTULO REIVINDICATORIO.**

Ahora bien, en el ya referenciado Concepto Técnico **No. 2999** el Señor Examinador objeta la claridad y concisión del capítulo reivindicatorio presentado, señalando que este incluye un gran número de reivindicaciones, cuya redacción no permitiría establecer de forma clara la relación entre la materia reclamada por cada una de ellas.

Así mismo, el Señor Examinador indica que la materia contenida dentro del capítulo reivindicatorio no contaría con un sustento adecuado dentro de los ejemplos incluidos en la descripción de la solicitud.

Tomando en consideración estas objeciones, me permito manifestar que es deseo del solicitante presentar un **nuevo capítulo reivindicatorio** que reemplaza al anterior, el cual describe de manera concisa el objeto de la invención de acuerdo con las realizaciones preferidas enseñadas en la descripción de la solicitud.

En conexión con lo anterior me permito señalar que este nuevo capítulo reivindicatorio no constituye de ninguna manera una ampliación al alcance de la invención, tal como fue originalmente presentada, toda vez que sus **52 reivindicaciones** están enteramente sustentadas dentro de las enseñanzas de la descripción de la solicitud, tal como se resume a continuación:

JOSE LLORED A CAMACHO & CO.

Calle 72 No. 5-83 Piso 5, Bogotá, D.C. Tel: 6069700 Fax 6069701

Reivindicación	Soporte en la descripción
1	Párrafos 116, 241; Figura 7, Ejemplo 2
2	Párrafos 116, 241; Figura 7, Ejemplo 2
3	Párrafos 116, 241; Figura 7, Ejemplo 2
4	Párrafos 116, 241; Ejemplo 2
5	Párrafos 116, 241; Ejemplo 2
6	Párrafos 127, 241; Tabla 3, Ejemplo 2
7	Párrafos 127, 241; Tabla 3, Ejemplo 2
8	Párrafos 127, 241; Tabla 3, Ejemplo 2
9	Párrafos 127, 241; Tabla 3, Ejemplo 2
10	Párrafos 127, 241; Tabla 3, Ejemplo 2
11	Párrafos 120, 121, 222, 239, y 240, Figura 7, Ejemplo 2
12	Párrafos 116, 241; Ejemplo 2
13	Párrafos 141, 241; Ejemplo 2
14	Párrafos 141, 241; Ejemplo 2
15	Párrafos 145-150, 241; Ejemplo 2
16	Párrafos 145-150, 241; Ejemplo 2
17	Párrafos 145-150, 241; Ejemplo 2
18	Párrafos 145-150, 241; Ejemplo 2
19	Párrafos 145-150, 241; Ejemplo 2
20	Párrafos 145-150, 241; Ejemplo 2
21	Párrafos 127, 241; Tabla 2, Ejemplo 2
22	Párrafos 127, 241; Tabla 2, Ejemplo 2
23	Párrafos 127, 241; Tabla 2, Ejemplo 2
24	Párrafos 127, 241; Tabla 2, Ejemplo 2
25	Párrafos 127, 241; Tabla 2, Ejemplo 2
26	Párrafos 127, 241; Tabla 2, Ejemplo 2
27	Párrafos 116, 176, 221-240; Figura 7, Ejemplo 2
28	Párrafo 62, 221-240; Figura 7, Ejemplo 2

JOSE LLORED A CAMACHO & CO.

Calle 72 No. 5-83 Piso 5, Bogotá, D.C. Tel: 6069700 Fax 6069701

Reivindicación	Soporte en la descripción
29	Párrafo 62, 221-240; Figura 7, Ejemplo 2
30	Párrafo 127, 221-240; Tabla 3, Ejemplo 2
31	Párrafo 127, 221-240; Tabla 3, Ejemplo 2
32	Párrafo 127, 221-240; Tabla 3, Ejemplo 2
33	Párrafos 127, 221-240, Tabla 3, Ejemplo 2
34	Párrafos 120, 121, 222, 239, y 240, Figura 7, Ejemplo 2
35	Párrafos 127, 221-240; Tablas 2, 3, Ejemplo 2
36	Párrafos 127, 221-240; Tablas 2, 3, Ejemplo 2
37	Párrafos 127, 221-240; Tablas 2, 3, Ejemplo 2
38	Párrafos 127, 221-240; Tablas 2, 3, Ejemplo 2
39	Párrafos 127, 221-240; Tablas 2, 3, Ejemplo 2
40	Párrafos 127, 221-240; Tablas 2, 3, Ejemplo 2
41	Párrafos 241, 221-240, Ejemplo 2
42	Párrafos 116, 221-240, Ejemplo 2
43	Párrafos 116, 221-240, Ejemplo 2
44	Párrafos 116, 221-240, Ejemplo 2
45	Párrafos 116, 221-240, Ejemplo 2
46	Párrafos 127, 221-240; Tablas 2, 3, Ejemplo 2
47	Párrafos 145-150, 221-240; Ejemplo 2
48	Párrafos 179, 221-240; Ejemplo 2
49	Párrafos 116, 145-150, 221-240; Tabla 3, Ejemplo 2
50	Párrafos 116, 145-150, 221-240; Tabla 3, Ejemplo 2
51	Párrafos 116, 145-150, 221-240; Tabla 3, Ejemplo 2
52	Párrafos 116, 145-150, 221-240; Tabla 3, Ejemplo 2

De esta forma, el nuevo capítulo reivindicatorio es totalmente claro y conciso al reclamar la molécula que se enlaza a antígeno glicodiseñada que es objeto de la presente solicitud y por lo tanto cumple a cabalidad con lo preceptuado en el Artículo 30 de la Decisión Andina 486 de 2000.

5. **NO ES UNA INVENCION.**

De otra parte, el Señor Examinador indica que las reivindicaciones 1 a 21 actualmente presentadas harían referencia a polinucleótidos aislados, y por lo tanto se referirían a materia no considerada como una invención de acuerdo con la legislación vigente.

Sobre este particular me permito señalar que, tal como se discutió en el numeral anterior de este mismo memorial, se ha presentado un nuevo capítulo reivindicatorio el cual hace referencia a **una molécula que se une a antígeno la cual ha sido diseñada genéticamente para tener unas ciertas propiedades de glicosilación.**

Consecuentemente, dicho nuevo capítulo reivindicatorio no se refiere a moléculas biológicas tal como se encuentran en la naturaleza, sino a moléculas modificadas y glicodiseñadas, enmarcándose así completamente en lo estipulado por la Decisión Andina 486 de 2000.

6. **NIVEL INVENTIVO.**

Finalmente, el Señor Examinador señala que las reivindicaciones 1 y 2 actualmente presentadas carecerían de altura inventiva a la luz de las enseñanzas del documento ***Polyack, M.; Deans J. Blood, 99, 9, 3256-3262, 2002 (D1).***

En relación con este documento el Señor Examinador asegura que las mencionadas reivindicaciones 1 y 2 harían referencia a una caracterización de un anticuerpo al presentar su secuencia, pero que no podrían de ninguna manera ser inventivas toda vez que el documento D1 en su tabla 1 muestra que este anticuerpo ya es conocido.

A este respecto me permito señalar que en virtud del nuevo capítulo presentado tal como se discute en el numeral 3 del este mismo memorial, la materia contenida en las mencionadas reivindicaciones 1 y 2 ya no se encuentra incluida dentro de la reclamación, superando así completamente esta objeción.

Por otro lado, me permito señalar que la molécula que se une a antígeno que es objeto de la presente invención, tal como se reclama en el ya mencionado nuevo capítulo reivindicatorio, no puede ser de ninguna manera evidente a partir de las enseñanzas de D1.

En primer lugar, el documento D1 usa únicamente un anticuerpo B-Ly1 **totalmente murino** como parte de un panel de 16 anticuerpos anti-CD20 en experimentos para evaluar la reactividad con una región particular en el loop extracelular CD20 y para evaluar su habilidad para inducir agregación homotípica de células y translocar al CD20 en la membrana celular. Por su parte, la solicitud en

estudio se relaciona con moléculas que se unen a antígeno anti-CD20 las cuales son **humanizadas**, comprenden CDRs de B-Ly1 que pueden inducir un incremento en el nivel de apoptosis en una célula objetivo y pueden ser glicodiseñadas para incrementar la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC) mientras que se mantiene una potente habilidad de apoptosis.

Por otro lado, es importante resaltar que, como sería evidente para la persona versada en la materia, los anticuerpos anti-CD20 pueden dividirse según su mecanismo de ataque y muerte de las células objetivo. Así, los anticuerpos anti-CD20 "Tipo I" (como el rituximab), matan a las células del linfoma principalmente por la activación del sistema complemento. Por su parte, como se discute en el párrafo [0240] de la descripción de la solicitud, las anti-CD20 humanizadas con CDRs B-Ly1 de la invención son moléculas que se unen a antígeno "Tipo II" que matan a las células objetivo por la inducción de apoptosis y no por una lisis mediada por el sistema complemento.

De esta forma, la presente invención se constituye en el primer ejemplo conocido en el cual un anticuerpo anti-CD20 "Tipo II" se ha glicodiseñado para incrementar las funciones efectoras como ADCC, manteniendo al mismo tiempo una potente habilidad de apoptosis de un anticuerpo "Tipo II", propiedades que son de gran importancia para el incremento de la potencia y eficacia del anticuerpo.

Sumado a lo anterior, D1 no revela ni sugiere moléculas que se unen a antígeno, anti-CD20 capaces de inducir mayores niveles de apoptosis en células objetivo comparadas con un control de moléculas que se unen a antígeno. Para ilustrar este hecho me permito señalar que los ejemplos específicos revelados en la descripción de la solicitud muestran comparaciones directas de variantes de anticuerpos humanizados que comprenden CDRs B-Ly1, con el rituximab (C2B8), cuyos resultados evidencian inesperadamente que tanto las variantes humanizadas B-Ly1 glicodiseñadas como no glicodiseñadas fueron más potentes que el rituximab en la reducción de las células B (ver párrafo [0241] de la descripción y figura 16).

Es pertinente resaltar que los anticuerpos que tengan una actividad potente de inducir apoptosis son ventajosos porque pueden dirigirse a células CD-20 positivas en áreas donde el acceso a receptores Fc (lo cual es necesario para una función efectora como es ADCC) es más difícil, por ejemplo nódulos linfáticos, tal como lo señala el párrafo [0241] de la descripción:

"No se conoce el mecanismo exacto para la agregación homotípica mejorada y la inducción de apoptosis mediada por anticuerpos anti-CD20 tipo II y el enlace concomitante a otras moléculas sobre la superficie de células CD20-positivas, tales como los receptores Fc gamma, puede influir en esta importante propiedad. Por lo tanto, fue importante demostrar que los anticuerpos anti-CD20 de tipo II que han sido diseñados en su región Fc para afinidad de enlace aumentada a receptores Fc gamma, que incluyen FcgammaRIII y con un incremento asociado en la actividad

3

ADCC, seguirán siendo capaces de inducir apoptosis fuerte, incluso mayor que los no Fc-diseñados, y agregación homotípica."

Consecuentemente, no habría sido de ninguna manera evidente para una persona versada en la materia, partiendo de las enseñanzas de D1 que un anticuerpo murino B-Ly1 humanizado y/o glicodiseñado podría impartir estas propiedades ventajosas, así como dicha persona versada en la materia no encontraría en este documento ninguna motivación para escoger específicamente los CDRs de B-Ly1 para obtener anticuerpos anti-CD20 como los reclamados por la presente solicitud.

En este sentido, es evidente que la persona versada en la materia, partiendo de D1, no encontraría ninguna razón para suponer que las moléculas que se unen a antígeno que son objeto de la presente invención resultarían en una actividad de apoptosis y ADCC aumentadas, por lo que dicho documento D1 no podría afectar el Nivel Inventivo de la solicitud en estudio.

Dentro de este contexto me permito referirme al señalamiento que hace el Tribunal de Justicia de la Comunidad Andina con respecto a las definiciones de "obvio" y "evidente" en la evaluación del Nivel Inventivo de una solicitud de patente*:

"Resulta pertinente, a los efectos del artículo 4 de la Decisión 344, definir qué se entiende por "obvio" y por "evidente" a fin de determinar qué se debe entender por nivel inventivo.

Lo obvio es aquello que salta a la vista de manera clara y directa; lo "que se encuentra o pone delante de los ojos, muy claro o que no tiene dificultad". Mientras que lo evidente consiste en la "certeza clara y manifiesta de la que no se puede dudar; cierto, claro, patente y sin la menor duda". De forma que algo que resulte obvio no es necesariamente evidente; empero lo que es evidente, es también obvio.

En este orden de ideas, se puede concluir que una invención goza de nivel inventivo cuando a los ojos de un experto medio en el asunto de que se trate, se necesita algo más que la simple aplicación de los conocimientos técnicos en la materia para llegar a ella, es decir, que de conformidad con el estado de la técnica el invento no sea consecuencia clara y directa de dicho estado."

De este señalamiento es claro que dentro de la legislación Andina, para que exista afectación del requisito de nivel inventivo de una solicitud de patente es necesario que la invención allí revelada sea derivable de forma clara y directa del arte previo, y que las enseñanzas de este arte previo sin lugar a dudas conduzcan a dicha invención.

* Tribunal de Justicia de la Comunidad Andina, PROCESO 192-IP-2005

De esta forma, dado que a partir de las enseñanzas de D1, no "salta a la vista de manera clara y directa" una molécula que se une a antígeno anti-CD-20 humanizada y glicodiseñada; así como a partir de este documento tampoco se tiene "certeza clara y manifiesta" de que esta molécula brindaría una apoptosis aumentada simultáneamente con una alta actividad ADCC, es claro que la solicitud en estudio conlleva Nivel Inventivo frente al estado del arte más próximo.

7. **CONCLUSIÓN.**

Para finalizar me permito resaltar que el nuevo capítulo reivindicatorio presentado es totalmente claro y conciso al reclamar la molécula que se une a antígeno objeto de la presente invención, en concordancia con las enseñanzas de la descripción de la solicitud.

Así mismo, este nuevo capítulo reivindicatorio no hace referencia alguna a material biológico tal como se encuentra en la naturaleza, sino a moléculas glicodiseñadas.

Finalmente, en virtud de la presentación de este nuevo capítulo reivindicatorio se supera completamente la objeción de nivel inventivo presentada por ese Despacho con respecto a las reivindicaciones 1 y 2 anteriormente presentadas.

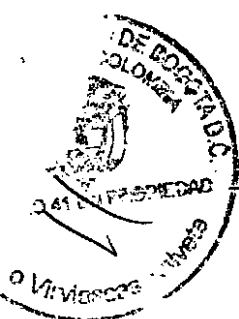
Por otro lado, los argumentos discutidos establecieron que la materia contenida en el nuevo capítulo reivindicatorio no podría de ninguna manera ser obtenida a partir de las revelaciones de D1 y por lo tanto, la solicitud en estudio conlleva nivel inventivo frente al estado del arte más próximo.

8. Anexo me permito presentar:

i) Recibo número 11-001926, expedido por la Superintendencia de Industria y Comercio, que acredita el pago de las modificaciones mencionadas;

ii) Copia del capítulo descriptivo y de la Figura 2 corregidas como se describió anteriormente;

iii) Copia de las páginas **107 a 116** que corresponden al nuevo capítulo reivindicatorio, constituido por **52** reivindicaciones.



JOSE LLORED A CAMACHO & CO.

Calle 72 No. 5-83 Piso 5, Bogotá, D.C. Tel: 6069700 Fax 6069701

9. En vista de lo anterior, ruego a usted proceder a estudiar nuevamente la solicitud a la luz de las modificaciones y los argumentos presentados y conceder el privilegio de patente solicitado.

Señor Superintendente,

ALICIA LLORED A RICAURTE

T.P. 53.215

NOTARIA 41 DEL CÍRCULO DE BOGOTÁ D.C.
DEPARTAMENTO DE CUNDINAMARCA
REPÚBLICA DE COLOMBIA

El Notario 41 del círculo de Bogotá, da fe de que compareció personalmente Alicia Lloreda Ricaurte identificada (o) con: 39690713 y tarjeta profesional de abogado No. 53715 del Consejo Superior de la Judicatura, quien autentica la firma puesta por ella (el) mismo en este escrito.

(Art. 84 C. P. C. Decreto. 2282/89 mod. 38) **05 ENE. 2011**

Bogotá D.C.
ALICIA LLORED A RICAURTE
C.C. No. 39.690.713 de Usaguén

FIRMA DE LA (EL) COMPARECIENTE

Jenny Nery
Morales Betrán
C.C. 1.915.393.013
Vice



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -



RECIBO DE CAJA

No. 11 - 001926

Bogotá D.C., 12 de 2011 - 07:38:42

RECIBIDO DE : LLOREDA & CIA. S.A. NI 830.022.145

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	142967230	11/01/2011	31.003.700.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. LINDITARIO	Vr. CONCEPTO
1	50005-01-03	CAMBIO DE MODALIDAD Y MODIFICACIONES EN CREACION CORRECCION A SOLICITUD EN TRAMITE / MODIFICA	118.000.00	118.000.00
				\$118.000.00
			=====	

SON: **CIENTO DIECIOCHO MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable:

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Enero 12 de 2011 - 07:39:03

**MOLECULAS QUE SE ENLAZAN A ANTÍGENO CON AFINIDAD DE
ENLACE AL RECEPTOR Fc AUMENTADA Y FUNCION EFECTORA**

R E S U M E N-OBJETO Y FINALIDAD DE LA INVENCION

La presente invención está relacionada con moléculas que se enlazan a antígeno (ABMs). En realizaciones particulares, la presente invención se relaciona con anticuerpos monoclonales recombinantes, que incluyen anticuerpos quiméricos, primatizados o humanizados específicos para CD20 humano. Adicionalmente, la presente invención se relaciona con moléculas de ácido nucleico que codifican tales ABMs, y con los vectores y células huésped que comprenden tales moléculas de ácido nucleico. La invención se relaciona además con métodos para producir las ABMs de la invención, y a los métodos para usar estas ABMs en el tratamiento de enfermedad. Adicionalmente, la presente invención se relaciona con ABMs con glicosilación modificada que tienen propiedades terapéuticas mejoradas, incluyendo anticuerpos con enlace al receptor Fc aumentado y función efectora aumentada.

MOLECULAS QUE SE ENLAZAN A ANTÍGENO CON AFINIDAD DE ENLACE AL RECEPTOR Fc AUMENTADA Y FUNCION EFECTORA

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Campo de la Invención

[0001] La presente invención se relaciona con moléculas que se enlazan antígeno (ABMs). En realizaciones particulares, la presente invención se relaciona con anticuerpos monoclonales recombinantes, que incluyen anticuerpos quiméricos, primatizados o humanizados específicos para CD20 humano. Adicionalmente, la presente invención se relaciona con moléculas de ácido nucleico que codifican tales ABMs, y vectores y células huésped que comprenden tales moléculas de ácido nucleico. La invención se relaciona además con métodos para producir las ABMs de la invención, y a los métodos para usar estas ABMs en el tratamiento de enfermedad. En adición, la presente invención se relaciona con ABMs con glicosilación modificada que tienen propiedades terapéuticas modificadas, incluyendo anticuerpos con enlace al receptor Fc aumentado y función efectora aumentada.

Técnica Previa

El Sistema Inmune y los Anticuerpos Anti-CD20

[0002] El sistema inmune de los vertebrados, incluyendo humanos, consiste de un número de órganos y tipos de células, que han evolucionado para reconocer precisamente y específicamente, enlazar y destruir microorganismos extraños invasores ("antígenos"). Los linfocitos son críticos para la función propia del sistema inmune. Estas células se producen en el timo, el bazo y la médula espinal (adultos) y representan aproximadamente el 30% de los glóbulos blancos totales presentes en el sistema circulatorio de humanos adultos. Hay dos sub-poblaciones importantes de linfocitos: las células T y las células B. Las células T son responsables de la inmunidad mediada por la célula, mientras que las células B son responsables de la producción de anticuerpo (inmunidad humoral). Sin embargo, en una

respuesta inmune, las células T y las células B funcionan interdependientemente: las células T se activan cuando el receptor de célula T se enlaza a fragmentos de un antígeno que está enlazado a glicoproteínas del complejo de histocompatibilidad importantes ("MHC") sobre la superficie de una célula que presenta antígeno; tal activación produce la liberación de mediadores biológicos ("interleucinas"), que estimulan las células B para diferenciar y producir anticuerpos ("inmunoglobulinas") contra el antígeno.

[0003] Cada célula B dentro del huésped expresa un anticuerpo de un tipo y especificidad particular, y diferentes células B expresan anticuerpos específicos para diferentes antígenos. La proiferación de células B y la producción de anticuerpo se disparan como una reacción a un antígeno extraño, y ambas típicamente cesan (o disminuyen sustancialmente) una vez el antígeno extraño ha sido neutralizado. Ocasionalmente, sin embargo, la proliferación de una célula B particular continuará incólume; tal proliferación puede producir un cáncer referido como "linfoma de célula B".

[0004] Las células T y las células B comprenden ambas proteínas de superficie celular que se pueden utilizar como "marcadores" para la diferenciación e identificación. Un marcador de célula B humana es el antígeno Bp35 de diferenciación restringido por linfocito B humano, referido como "CD20". El CD20 se expresa durante el pre-desarrollo temprano de célula B y permanece hasta la diferenciación celular de plasma. Específicamente, la molécula de CD20 puede regular un paso en el proceso de activación que se requiere para la iniciación y diferenciación del ciclo celular y usualmente se expresa en niveles muy altos en las células B neoplásicas ("tumor"). Como CD20 está presente en niveles muy altos de células B "malignas", i.e., aquellas células B cells cuya proliferación incólume puede conducir al linfoma de célula B, el antígeno de superficie CD20 tiene el potencial de servir como un candidato para "marcar" linformas de célula B.

[0005] En esencia, tal marcado se puede generalizar de la siguiente forma: los anticuerpos específicos al antígeno de superficie de CD20 de las células B se introducen en un paciente, mediante inyección, por ejemplo. Estos anticuerpos anti-CD20 se enlazan específicamente al antígeno de superficie celular de CD20 de (ostensiblemente) células B normales y malignas; el anticuerpo anti-CD20 enlazado al antígeno de superficie de

CD20 puede conducir a la destrucción y depleción de células B neoplásicas. Adicionalmente, se pueden conjugar agentes químicos o etiquetas radiactivas que tienen el potencial de destruir el tumor, con el anticuerpo anti-CD20 de forma que el agente es "entregado" específicamente a e.g., las células B neoplásicas. Sin importar el criterio, un objetivo primario es destruir el tumor: el criterio específico puede ser determinado por el anticuerpo anti-CD20 particular que es utilizado y, así, los criterios disponibles para marcar el antígeno CD20 pueden variar considerablemente.

[0006] Los anticuerpos monoclonales no conjugados (mAbs) pueden ser medicinas útiles para el tratamiento del cancer, como lo demostró la aprobación de la Administración de Alimentos y Medicamentos Americana, de Rituximab (RituxanTM; IDEC Pharmaceuticals, San Diego, CA, y Genentech Inc., San Francisco, CA), para el tratamiento de célula B positiva de CD20, linfoma de No Hodgkin de grado bajo o folicular, Trastuzumab (HerceptinTM; Genentech Inc.) para el tratamiento de cáncer de seno avanzado (Grillo-Lopez, A.-J., et al., *Semin. Oncol.* 26: 66-73 (1999); Goldenberg, M. M., *Clin. Ther.* 21: 309-18 (1999)), Gemtuzumab (MylotargTM, Celltech/Wyeth-Ayerst) para el tratamiento de leucemia mieloide aguda recurrente, y Alemtuzumab (CAMPATHTM, Millenium pharmaceuticals/Schering AG) para el tratamiento de leucemia linfocítica crónica de célula B. El éxito de estos productos se basa no solamente en su eficacia sino en sus perfiles de seguridad descritos (Grillo-Lopez, A.-J., et al., *Semin. Oncol.* 26: 66-73 (1999); Goldenberg, M.M., *Clin. Ther.* 21: 309-18 (1999)). A pesar de los logros de estos fármacos, actualmente hay un gran interés en obtener mayor actividad de anticuerpo específica que la producida típicamente por la terapia de mAb no conjugada. El anticuerpo monoclonal murino, B-Ly1, es otro anticuerpo conocido por ser específico al CD20 humano. (Poppema, S. y Visser, L., *Biotest Bulletin* 3: 131-139 (1987)).

[0007] Los resultados de un número de estudios sugieren que los mecanismos dependientes del receptor Fc contribuyen sustancialmente a la acción de anticuerpos citotóxicos contra tumores e indican que un anticuerpo óptimo contra tumores se enlazaría preferencialmente a los receptores Fc de activación y mínimamente al compañero inhibidor FcγRIIB. (Clynes, R. A., et

al., *Nature Medicine* 6 (4): 443-446 (2000); Kalergis, A. M., y Ravetch, J. V., *J. Exp. Med.* 195 (12): 1653-1659 (Junio 2002). Por ejemplo, los resultados de al menos un estudio sugieren que el receptor FcγRIIIa en particular está fuertemente asociado con la eficacia de la terapia de anticuerpo. (Cartron, G., et al., *Blood* 99 (3): 754-757 (Febrero 2002)). Ese estudio mostró que los pacientes homocigóticos para FcγRIIIa tienen una mejor respuesta al Rituximab que los pacientes heterocigóticos. Los autores concluyeron que la respuesta superior se debía al mejor enlace in vivo del anticuerpo a FcγRIIIa, lo que produjo una mejor actividad ADCC contra las células de linfoma (Cartron, G., et al., *Blood* 99(3): 754-757 (Febrero 2002)).

[0008] Se han reportado varios intentos para marcar el antígeno de superficie de CD20. Se dice que el anticuerpo IF5 monoclonal murino (ratón) (un anticuerpo anti-CD20) fue administrado por infusión intravenosa continua a pacientes con linfoma de células B. Se dice que requirieron niveles extremadamente altos (> 2 gramoss) de 1F5 para depletar células de tumos circulantes, y los resultados fueron descritos como "transitorios". Press et al., "Monoclonal Antibody 1F5 (Anti-CD20) Serotherapy of Human B-Cell Lymphomas". *Blood* 69/2: 584-591 (1987). Un problema potencial con este criterio es que los anticuerpos monoclonales no humanos (e.g., anticuerpos monoclonales murino) típicamente carecen de funcionalidad effectora humana, i.e., no son capaces de, *inter alia*, mediar la lisis dependiente de complemento o lisar células marcadas humanas mediante la toxicidad celular dependiente de anticuerpo o la fagocitosis mediada por el receptor Fc. Adicionalmente, los anticuerpos monoclonales no humanos pueden ser reconocidos por el huésped humano como una proteína extraña; por lo tanto, repetidas inyecciones de tales anticuerpos extraños puede conducir a la inducción de respuestas inmunes que conducen a reacciones de hipersensibilidad nocivas. Para los anticuerpos monoclonales basados en murina, estó se refiere usualmene como una respuesta de anticuerpo Anti-Ratón humana, o respuesta "HAMA". Adicionalmente, estos anticuerpor "extraños" pueden ser atacados por el sistema immune del huésped de forma que son, en efecto, neutralizados antes que alcanced su sitio objetivo.

[0009] Otro criterio reportado para mejorar la habilidad de los anticuerpos monoclonales murino para ser efectivos en el tratamiento de los

trastornos de célula B ha sido conjugar una etiqueta radioactiva o toxina al anticuerpo de forma que la etiqueta o toxina es localizada en el sitio del tumor. Por ejemplo, el anticuerpo 1F5 referenciado anteriormente ha sido "etiquetado" con yodo-131 (^{131}I) y se dice que se evaluó por biodistribución en dos pacientes. Ver Eary, J.F. et al., "Imaging and Treatment of B-Cell Lymphoma" *J. Nuc. Med.* 31/8: 1257-1268 (1990); ver también, Press, O. W. et al., "Treatment of Refractory Non-Hodgkin's Lymphoma with Radiolabeled MB-1 (Anti-CD37) Antibody" *J. Clin. Onc.* 7/8: 1027-1038 (1989) (indicación que un paciente tratado con IF-5 marcado con ^{131}I logró una "respuesta parcial"); Goldenberg, D. M. et al., "Targeting, Dosimetry and Radioimmunotherapy of B- Cell Lymphomas with Iodine-131-Labeled LL2 Monoclonal Antibody" *Clin. Onc.* 9/4: 548-564 (1991) (tres de los ocho pacientes que recibieron inyecciones múltiples reportaron haber desarrollado una respuesta HAMA); Appelbaum, F. R. "Radiolabeled Monoclonal Anticuerpos in the Treatment of Non-Hodgkin's Lymphoma" *Hem./Onc. Clinics of N.A.* 5/5: 1013-1025 (1991) (artículo de revisión); Press, O. W. et al "Radiolabeled-Antibody Therapy of B-Cell Lymphoma with Autologous Bone Marrow Support". *New England J. Med.* 329/17: 1219-12223 (1993) (anticuerpo anti-CD20 IF5 y B1 marcado con yodo-131); y Kaminski, M. G. et al "Radioimmunotherapy of B-Cell Lymphoma with ^{131}I Anti-B1 (Anti-CD20) Antibody". *New England J. Med.* 329/7 (1993) (anticuerpo anti-CD20 B1 marcado con yodo-131; de aquí en adelante "Kaminski"). Las toxinas (i.e., agentes quimioterapéuticos tales como doxorubicina o mitomicina C) también han sido conjugadas a los anticuerpos. Ver, por ejemplo, la solicitud PCT publicada WO 92/07466 (publicada en Mayo 14 de 1992).

[0010] Los anticuerpos quiméricos que comprenden porciones de anticuerpos de dos o más especies diferentes (e.g., de ratón y humana) han sido desarrollados como una alternativa a anticuerpos "conjugados". Por ejemplo, Liu, A.Y. et al., "Production of a Mouse-Human Chimeric Monoclonal Antibody to CD20 with potent Fc-Dependent Biologic Activity" *J. Immun.* 139/10:3521-3526 (1987), describe un anticuerpo quimérico de ratón/humano dirigido contra el antígeno de CD20. Ver también, la publicación PCT No. WO 88/04936. Por ejemplo, el rituximab (RITUXAN®), un anticuerpo anti-CD20 quimérico ha sido aprobado para el tratamiento de linfoma de no Hodking.

[0011] Dada la expresión de CD 20 por los linfomas de célula B, este antígeno puede servir como un candidato para "marcar" tales linfomas. En esencia, tal marcado puede generalizarse de la siguiente forma: los anticuerpos específicos para el antígeno de superficie de CD20 sobre células B es administrado a un paciente. Estos anticuerpos anti-CD20 se enlazan específicamente al antígeno de CD 20 de (ostensiblemente) células B normales y malignas, y el anticuerpo enlazado al CD20 sobre la superficie celular produce la destrucción y depleción de células B tumorigénica. Adicionalmente, los agentes químicos, citotoxinas o agentes radiactivos pueden ser unidos directamente o indirectamente al anticuerpo anti-CD20 de forma que el agente es "entregado" selectivamente al antígeno de CD 20 que expresa células B. Con ambos criterios, el objetivo primario es destruir el tumor. El criterio específico dependerá del anticuerpo anti-CD20 particular que se utiliza. Así, es obvio que los diferentes criterios para el marcado del antígeno de CD20 pueden variar considerablemente,

[0012] El anticuerpo rituximab (RITUXAN®) es un dominio constante murino quimérica humana gama 1 diseñado genéticamente que contiene anticuerpo monoclonal dirigido contra el antígeno de CD20 humano. Este anticuerpo quimérico contiene dominios constantes humanos gama 1 y es identificado con el nombre de "C2B8" en la Pat. U.S. No. 5,736,137 (Andersen et. al.) emitida el 17 de Abril de 1998, asignada a IDEC Pharmaceuticals Corporation. El RITUXAN® está aprobado para el tratamiento de pacientes con linfoma de no Hodgkin de célula B recurrente o refractiva de grado bajo o folicular, positivo a CD20. Los estudios de mecanismo de acción in vitro han mostrado que el RITUXAN® exhibe citotoxicidad humana dependiente del complemento (CDC)(Reff et. al, *Blood* 83 (2): 435-445 (1994)). Adicionalmente, exhibe actividad significativa en los ensayos que miden la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC). El RITUXAN® ha mostrado poseer actividad anti-proliferativa en ensayos de incorporación de timidina y una habilidad limitada para inducir apoptosis directamente, mientras que los anticuerpos de CD20 no (Maloney et al., *Blood* 88 (10): 637a (1996)).

Glicosilación de anticuerpo

[0013] El componente oligosacárido puede afectar significativamente las propiedades relevantes a la eficacia de una glicoproteína terapéutica, incluyendo la estabilidad física, resistencia al ataque de proteasa, interacciones con el sistema inmune, farmacocinética, y actividad biológica específica. Tales propiedades pueden depender no solamente de la presencia o ausencia, sino de las estructuras específicas de oligosacáridos. Se pueden hacer algunas generalizaciones entre la estructura de oligosacárido y función de glicoproteína. Por ejemplo, ciertas estructuras de oligosacárido median la depuración rápida de la glicoproteína desde la corriente sanguínea a través de las interacciones con proteínas de enlace a carbohidrato específico, mientras que otras pueden enlazarse mediante anticuerpos y disparar reacciones inmunes no deseadas. (Jenkins *et al.*, *Nature Biotechnol.* 14: 975-81 (1996)).

[0014] Las células mamíferas son los huéspedes preferidos para la producción de glicoproteínas terapéuticas, debido a su capacidad de glicosilar proteínas en la forma más compatible para aplicación humana. (Cumming *et al.*, *Glycobiology* 1: 115-30 (1991); Jenkins *et al.*, *Nature Biotechnol.* 14: 975-81 (1996)). Las bacterias muy rara vez glicosilan proteínas, y como otros tipos de huéspedes comunes, tales como levaduras, hongos filamentosos, células de insecto y planta, producen patrones de glicosilación asociados con depuración rápida desde la corriente sanguínea, interacciones inmunes indeseadas, y en algunos casos específicos, actividad biológica reducida. Entre las células mamíferas, las células de ovario de hamster Chino (CHO) han sido las más comúnmente usadas durante las dos últimas décadas. Además de dar patrones de glicosilación adecuados, estas células permiten la generación consistente de líneas de células clonales altamente productivas y genéticamente estables. Pueden ser cultivadas a altas densidades en biorreactores sencillos usando medio libre de suero, y permiten el desarrollo de bioprocesos seguros y reproducibles. Otras células animales comúnmente usadas incluyen células de riñón de hámster (BHK), células de mieloma de ratón NSO y SP2/0. Más recientemente, la producción de animales transgénicos también ha sido ensayada. (Jenkins *et al.*, *Nature Biotechnol.* 14: 975-81 (1996)).

[0015] Todos los anticuerpos contienen estructuras de carbohidrato en posiciones conservadas en regions constants de cadena pesada, teniendo cada isotipo una distribución distinta de estructuras de carbohidrato enlazadas a N, que afectan variablemente en ensamble de proteína, la secreción o la actividad funcional. (Wright, A. y Morrison, S. L., *Trends Biotech.* 15: 26-32 (1997)). La estructura del carbohidrato enlazado a N varia considerablemente, dependiendo del grado de procesamiento, y puede incluir oligosacáridos altos en manosa, ramificados múltiplemente así como de complejo de biantena. (Wright, A., y Morrison, S. L., *Trends Biotech.* 15: 26-32 (1997)). Típicamente, hay procesamiento heterogéneo de las estructuras de oligosacárido de núcleo unidas en un sitio de glicosilación particular de forma que incluso los anticuerpos monoclonales existen como glicoformas múltiples. Asimismo, se ha mostrado que las diferencias importantes en la glicosilación del anticuerpo ocurren entre las líneas de célula, e incluso se ven diferencias menores para una línea de célula dada cultivada bajo condiciones de cultivo diferentes. (Lifely, M. R. et al., *Glycobiology* 5 (8): 813-22 (1995)).

[0016] Una forma de obtener grandes aumentos en la potencia, mientras se mantiene un proceso de producción sencillo y evitando potencialmente efectos secundarios significativos undeseados, es mejorar ñas funciones efectoras naturales mediadas por célula efectora de los anticuerpos monoclonales diseñando su componente oligosacárido como se describe en Umaña, P. et al., *Nature Biotechnol.* 17: 176-180 (1999) y la Pat. U.S. No. 6,602,684, cuyos contenidos completos están incorporados aquí para referencia. Los anticuerpos del tipo IgG1, los anticuerpos más comunmente usados en la inmunoterapia dle cáncer, son glicoproteínas que tienen un sitio de glicosilación enlazado a N conservado en Asn297 en cada dominio CH2. Los dos oligosacáridos de biantena complejos unidos a Asn297 están enterrados entre los dominios CH2, que forman contactos extensos con la estructura del polipéptido, y su presencia es esencial para que el anticuerpo medie las funciones efectoras tales como citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC) (Lifely, M. R., et al., *Glycobiology* 5: 813-822 (1995); Jefferis, R., et al., *Immunol Rev.* 163: 59-76 (1998); Wright, A. y Morrison, S. L., *Trends Biotechnol.* 15: 26-32 (1997)).

[0017] Los inventores presentes mostraron anteriormente que la sobreexpresión en células (CHO) de ovario de hámster Chino de $\beta(1,4)$ -N-acetilglucosaminiltransferasa III ("GnTIII"), una glycosiltransferasa que cataliza la formación de oligosacáridos bisecados, aumenta significativamente la actividad ADCC in vitro de un anticuerpo monoclonal quimérico anti-neuroblastoma (chCE7) producida por las células CHO diseñadas. (Ver Umaña, P. *et al.*, *Nature Biotechnol.* 17: 176-180 (1999); y Publicación Internacional No. WO 99/54342, cuyos contenidos totales están incorporados aquí para referencia). El anticuerpo chCE7 pertenece a una gran clase de mAbs no conjugadas que tienen alta afinidad y especificidad de tumor, pero muy poca potencia para ser clínicamente útiles cuando se producen en líneas de células industriales estándar que carecen de la enzima GnTIII (Umana, P., *et al.*, *Nature Biotechnol.* 17: 176-180 (1999)). Ese estudio fue el primero en mostrar que se podrían obtener grandes aumentos de la actividad de ADCC diseñando células que producen anticuerpo para expresar to GnTIII, que también conduce a un aumento en la proporción de oligosacáridos bisecados, asociados con (Fc) de región constante, incluyendo oligosacáridos bisecados, no fucosilados, por encima de los niveles encontrados en los anticuerpos que se encuentran naturalmente.

[0018] Permanece una necesidad de criterios terapéuticos mejorados que marcan el antígeno de CD20 para el tratamiento de linfomas de célula B en primates, incluyendo, pero sin limitarse a humanos.

BREVE RESUMEN DE LA INVENCION

[0019] Reconociendo el tremendo potencial terapéutico de las moléculas que se enlazan a antígeno (ABMs) que tienen la especificidad de enlace del anticuerpo B-Ly1 murino y que han sido glicodiseñados para mejorar la afinidad de enlace al receptor Fc y función efectora, los presentes inventores desarrollaron un método para producir tales ABMs. *Inter alia*, este método involucra producir anticuerpos recombinantes, quiméricos o

fragmentos quiméricos de los mismos. La eficacia de estas ABMs se mejora además diseñando el perfil de glicosilación de la región Fc del anticuerpo.

[0020] En consecuencia, en un aspecto, la invención está dirigida a un polinucleótido aislado que comprende: (a) una secuencia seleccionada de un grupo que consiste de: SEQ ID NO.: 5, SEQ ID NO.: 6 y SEQ ID NO.: 7. (CDRsVH-1); (b) una secuencia seleccionada de un grupo que consiste de: SEQ ID NO.: 21, SEQ ID NO.: 22 y SEQ ID NO.: 23. (CDRsVu-2); y SEQ ID NO: 24. En otro aspecto, la invención está dirigida a un polinucleótido aislado que comprende SEQ ID NO.: 8, SEQ ID NO.: 9 y SEQ ID NO.: 10. (CDRs VL). En una realización, cualquiera de estos polinucleótidos codifica un polipéptido de fusión.

[0021] En un aspecto adicional, la invención está dirigida a un polinucleótido aislado que comprende la SEQ ID No.: 2. En otro aspecto, la invención está dirigida a un polinucleótido aislado que comprende la SEQ ID No.: 4. En un aspecto adicional, la invención está dirigida a un polinucleótido aislado seleccionado del grupo que consiste de la SEQ ID No: 29; SEQ ID No: 31; SEQ ID No: 33; SEQ ID No: 35; SEQ ID No: 37; SEQ ID No: 39; SEQ ID No: 41; SEQ ID No: 43; SEQ ID No: 45; SEQ ID No: 47; SEQ ID No: 49; SEQ ID No: 51; SEQ ID No: 53; SEQ ID No: 55; SEQ ID No: 57; SEQ ID No: 59; SEQ ID No: 61; SEQ ID No: 63; SEQ ID No: 65; SEQ ID No: 67; SEQ ID No: 69; y SEQ ID No: 71. En otro aspecto, la invención está dirigida a un polinucleótido aislado que comprende la SEQ ID No.: 75. En una realización, tales polinucleótidos codifican los polipéptidos de fusión.

[0022] La invención se dirige además a un polinucleótido aislado que comprende una secuencia que tiene al menos 80% de identidad a la SEQ ID NO: 2, en donde dicho polinucleótido aislado codifica un polipéptido de fusión. En un aspecto adicional, la invención está dirigida con un polinucleótido aislado que comprende una secuencia que tiene al menos 80% de identificación a la SEQ ID NO: 4, en donde dicho polinucleótido aislado codifica un polipéptido de fusión. La invención está además dirigida a un polinucleótido aislado que comprende una secuencia que tiene al menos 80% de identidad a una secuencia seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID No: 29; SEQ ID No: 31; SEQ ID No: 33; SEQ ID No: 35; SEQ ID No: 37; SEQ ID No: 39; SEQ ID No: 41; SEQ ID No: 43; SEQ ID No: 45; SEQ ID

No: 47; SEQ ID No: 49; SEQ ID No:51; SEQ ID No: 53; SEQ ID No: 55; SEQ ID No: 57; SEQ ID No: 59; SEQ ID No: 61; SEQ ID No: 63; SEQ ID No: 65; SEQ ID No: 67; SEQ ID No: 69; y SEQ ID No:71, en donde dicho polinucleótido aislado codifica un polipéptido de fusión. En un aspecto adicional, la invención está dirigida a un polinucleótido aislado que comprende una secuencia que tiene al menos 80% de identidad a la SEQ ID NO: 75, en donde dicho polinucleótido aislado codifica un polipéptido de fusión.

[0023] La invención se dirige además a un polinucleótido que comprende la SEQ ID NO: 11 (cadena pesada total), o a polinucleótidos que tienen 80%, 85%, 90%, 95% o 99% de identidad a la SEQ ID NO: 11. La invención también está dirigida a un polinucleótido que comprende SEQ ID NO: 12 (la cadena ligera total), o a polinucleótidos que tienen 80%, 85%, 90%, 95% o 99% de identidad a SEQ ID NO: 12.

[0024] La invención también está dirigida a un polinucleótido aislado que codifica un polipéptido quimérico que tiene la secuencia de SEQ ID No.:1. En una realización, el polinucleótido comprende una secuencia que codifica un polipéptido que tiene la secuencia de SEQ ID No.:1; y una secuencia que codifica un polipéptido que tiene la secuencia de una región Fc de anticuerpo, o un fragmento de la misma, de una especie diferente a la de ratón. La invención también está dirigida a un polinucleótido aislado que codifica un polipéptido quimérico que tiene una secuencia seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID No: 30; SEQ ID No: 32; SEQ ID No: 34; SEQ ID No: 36; SEQ ID No: 38; SEQ ID No: 40; SEQ ID No: 42; SEQ ID No: 44; SEQ ID No : 46; SEQ ID No: 48 ; SEQ ID No: 50; SEQ ID No: 52; SEQ ID No: 54; SEQ ID No: 56; SEQ ID No: 58; SEQ ID No: 60; SEQ ID No: 62; SEQ ID No: 64; SEQ ID No : 66; SEQ ID No : 68; SEQ ID No: 70; y SEQ ID No: 72. En una realización, el polinucleótido comprende una secuencia que codifica un polipéptido que tiene una secuencia seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID No: 30; SEQ ID No: 32; SEQ ID No: 34; SEQ ID No: 36; SEQ ID No: 38; SEQ ID No: 40; SEQ ID No: 42; SEQ ID No: 44; SEQ ID No: 46; SEQ ID No: 48 ;SEQ ID No : 50; SEQ ID No: 52; SEQ ID No: 54; SEQ ID No: 56; SEQ ID No: 58; SEQ ID No: 60; SEQ ID No: 62; SEQ ID No: 64; SEQ ID No: 66; SEQ ID No: 68; SEQ ID No: 70; y SEQ ID No : 72; y una secuencia que codifica un polipéptido que tiene la secuencia de la región Fc de

anticuerpo, o un fragmento de la misma, de una especie diferente a la de ratón.

[0025] En ya otro aspecto, la invención está dirigida a un polinucleótido aislado que codifica un polipéptido quimérico que tiene la secuencia de SEQ ID No.: 3. En una realización, el polinucleótido comprende una secuencia que codifica un polipéptido que tiene la secuencia de SEQ ID No.: 3; y una secuencia que codifica un polipéptido que tiene la secuencia de una región Fc de anticuerpo, o un fragmento de la misma, de una especie diferente al ratón. En ya otro aspecto, la invención está dirigida a un polinucleótido aislado que codifica un polipéptido quimérico que tiene la secuencia de SEQ ID No.: 76. En una realización, el polinucleótido comprende una secuencia que codifica un polipéptido que tiene la secuencia de SEQ ID No.: 76; y una secuencia que codifica un polipéptido que tiene la secuencia de una región Fc de anticuerpo, o un fragmento de la misma, de una especie diferente a la de ratón.

[0026] La invención también está dirigida a un polinucleótido aislado que comprende una secuencia que codifica un polipéptido que tiene la región VH del anticuerpo B-Ly1 murino, o variantes funcionales de la misma, y una secuencia que codifica un polipéptido que tiene la secuencia de una región Fc de anticuerpo, o un fragmento de la misma, de una especie diferente a la de ratón. En otro aspecto, la invención está dirigida a un polinucleótido aislado que comprende una secuencia que codifica un polipéptido que tiene la región VL del anticuerpo B-Ly1 murino, o variantes funcionales de la misma, y una secuencia que codifica un polipéptido que tiene la secuencia de una región Fc de anticuerpo, o un fragmento de la misma, de una especie diferente a la de ratón.

[0027] La invención se dirige además a un vector de expresión que comprende cualquiera de los polinucleótidos aislados descritos anteriores, y a una célula huésped que comprende tal vector de expresión. En un aspecto adicional, la invención está dirigida a una célula huésped que comprende cualquiera de los polinucleótidos aislados descritos anteriormente.

[0028] En un aspecto, la invención está dirigida a un polipéptido aislado que comprende: (a) una secuencia seleccionada de un grupo que

consiste de: SEQ ID NO.: 15, SEQ ID NO.: 16 y SEQ ID NO. : 17. (CDRs VH-1) ; (b) una secuencia seleccionada de un grupo que consiste de: SEQ ID NO. : 25, SEQ ID NO.: 26 y SEQ ID NO. : 27 (CDRs VH-2); y SEQ ID NO: 28, en donde dicho polipéptido es un polipéptido de fusión. En otro aspecto, la invención está dirigida a un polipéptido aislado que comprende la SEQ ID NO. : 18, SEQ ID NO.: 19 y SEQ ID NO. : 20. (CDRs VL), en donde dicho polipéptido es un polipéptido de fusión.

[0029] La invención también está dirigida a un polipéptido quimérico que comprende la secuencia de SEQ ID NO.: 1 o una variante de la misma. La invención se dirige además a un polipéptido quimérico que comprende la secuencia de SEQ ID NO. : 3 o una variante de la misma. En una realización, cualquiera de estos polipéptidos comprende además una región Fc humana. La invención también está dirigida a un polipéptido quimérico que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID No : 30; SEQ ID No: 32; SEQ ID No: 34; SEQ ID No: 36; SEQ ID No: 38; SEQ ID No: 40; SEQ ID No: 42; SEQ ID No: 44; SEQ ID No: 46; SEQ ID No: 48; SEQ ID No: 50; SEQ ID No: 52; SEQ ID No: 54; SEQ ID No: 56; SEQ ID No: 58; SEQ ID No: 60; SEQ ID No: 62; SEQ ID No: 64; SEQ ID No: 66; SEQ ID No : 68; SEQ ID No: 70; y SEQ ID No: 72, o una variante de la misma. La invención se dirige además a un polipéptido quimérico que comprende la secuencia de SEQ ID NO.: 76 o una variante de la misma. En una realización, cualquiera de estos polipéptidos comprende además una región Fc humana.

[0030] En otro aspecto la invención está dirigida a un polipéptido que comprende una secuencia derivada del anticuerpo B-Ly1 murino y una secuencia derivada de un polipéptido heterólogo y a una molécula que se enlaza a antígeno que comprende tal polipéptido. En una realización la molécula que se enlaza a antígenos es un anticuerpo. En una realización preferida, el anticuerpo es quimérico. En otra realización preferida, el anticuerpo es humanizado o primatizado.

[0031] En un aspecto adicional, la invención está dirigida a un polipéptido aislado que comprende la SEQ ID NO: 13 o una variante de la misma. En otro aspecto, la invención está dirigida a un polipéptido aislado que comprende la SEQ ID NO: 14.

[0032] En otro aspecto, la invención está dirigida a una ABM, que es capaz de competir con el anticuerpo B-Ly1 murino para enlazarse a CD20 y que es quimérica. En una realización, la ABM es un anticuerpo o un fragmento de la misma. En una realización adicional, la ABM es un anticuerpo recombinante que comprende una región VH que tiene una secuencia de amino ácido seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO.:1 ; SEQ ID No: 30; SEQ ID No: 32; SEQ ID No: 34; SEQ ID No: 36; SEQ ID No: 38; SEQ ID No: 40; SEQ ID No: 42; SEQ ID No: 44; SEQ ID No: 46; SEQ ID No: 48; SEQ ID No: 50; SEQ ID No: 52; SEQ ID No: 54; SEQ ID No: 56; SEQ ID No: 58 ; SEQ ID No: 60; SEQ ID No: 62;SEQ ID No: 64; SEQ ID No : 66; SEQ ID No : 68 ; SEQ ID No: 70; y SEQ ID No: 72. En otra realización, la ABM es un anticuerpo recombinante que comprende una región VL que tiene una secuencia de amino ácido seleccionada del grupo consistente de SEQ ID NO.: 3 y SEQ ID NO: 76. En una realización adicional la ABM es un anticuerpo recombinante que es primatizado. En ya una realización adicional la ABM es un anticuerpo recombinante que es humanizado. En otra realización, la ABM es un anticuerpo recombinante que comprende una región Fc humana. En una realización adicional, cualquiera de las ABMs discutidas anteriormente puede estar conjugada con una entidad tal como una toxina o un radiomarcador.

[0033] La invención se relaciona además con una ABM de la presente invención, dicha ABM tiene oligosacáridos modificados. En una realización los oligosacáridos modificados tienen fucosilación reducida comparada con oligosacáridos no modificados. En otras realizaciones, los oligosacáridos modificados son híbridos o complejos. En una realización adicional, la ABM tiene una proporción aumentada de oligosacáridos no fucosilados o bisecados, oligosacáridos no fucosilados en la región Fc de dicha molécula. En una realización, los oligosacáridos no fucosilados bisecados son híbridos. En una realización adicional, los oligosacáridos fucosilados bisecados son complejos. En una realización, al menos 20% de los oligosacáridos en la región Fc de dicho polipéptido son no fucosilados o bisecados, no fucosilados. En realizaciones más preferidas, al menos 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70% o 75% o más de los oligosacáridos son no fucosilados o bisecados, no fucosilados.

[0034] La invención se relaciona además con un polinucleótido que codifica cualquiera de las ABMs discutidas anteriormente, y a vectores de expresión y células que comprenden tal polinucleótido.

[0035] La invención se relaciona además con un método para producir una ABM, que es capaz de competir con el anticuerpo B-Ly1 murino para enlazarse a CD20 y en donde dicha ABM es quimérica; dicho método comprende: (a) cultivar una célula huésped que comprende un polinucleótido que codifica una ABM de la presente invención en un medio bajo condiciones que permiten la expresión de dicho polinucleótido que codifica dicha ABM; y (b) recuperar dicha ABM del cultivo resultante.

[0036] En otro aspecto, la invención está relacionada con una composición farmacéutica que comprende la ABM de la invención. Se contempla que la composición farmacéutica pueda además comprender un vehículo, un adyuvante farmacéuticamente aceptable, o una combinación de los mismos.

[0037] En un aspecto adicional, la invención está relacionada con un método para tratar un trastorno tratable por la depleción de célula B. El método comprende administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de la ABM de la presente invención a un sujeto humano en necesidad de la misma. En una realización preferida, el trastorno es tratado por la administración de una ABM que es un anticuerpo quimérico, o un fragmento quimérico de un anticuerpo.

[0038] En ya otro aspecto, la invención está relacionada con una célula huésped diseñada para expresar al menos un ácido nucleico que codifica un polipéptido que tiene actividad GnTIII, en una cantidad suficiente para modificar los oligosacáridos en la región Fc producidos por la célula huésped, en donde la ABM es capaz de competir con el anticuerpo B-Ly1 murino para enlazarse a CD20, y en donde la ABM es quimérica. En una realización, el polipéptido que tiene actividad GnTIII, es un polipéptido de fusión. En otra realización, la ABM producida por la célula huésped es un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo. In a further realización, la ABM comprende una región equivalente a la región Fc de un IgG humano.

[0039] La invención también está dirigida a un polinucleótido aislado que comprende al menos una región determinante de complementariedad del anticuerpo B-Ly1 murino, o una variante o truncación de la misma, que contiene al menos los residuos determinantes de especificidad para dicha región determinante de complementariedad, en donde dicho polinucleótido aislado codifica un polipéptido de fusión. Preferiblemente, tales polinucleótidos aislados codifican un polipéptido de fusión que es una molécula que se enlaza a antígeno. En una realización, el polinucleótido comprende tres regiones determinantes de complementariedad del anticuerpo B-Ly1 murino, o formas variantes o truncaciones de las mismas que contiene al menos los residuos determinantes de especificidad para cada una de dichas tres regiones determinantes de complementariedad. En otra realización, el polinucleótido codifica la región variable entera de la cadena pesada o ligera del anticuerpo aquimérico (e.g., humanizado). La invención está dirigida además a los polipéptidos codificados por tales polinucleótidos.

[0040] En otra realización, la invención está dirigida a una molécula que combina antígeno que comprende al menos una región determinante de complementariedad del anticuerpo B-Ly1 murino, o una forma variante o truncación del mismo, que contiene al menos los residuos determinantes de especificidad para dicha región determinante de complementariedad, y que comprende una secuencia derivada de un polipéptido heterólogo. En una realización, la molécula que enlaza antígeno comprende tres regiones determinantes de complementariedad del anticuerpo B-Ly1 murino, o formas variantes o truncación de las mismas, que contienen al menos los residuos determinantes de especificidad para cada una de las regiones determinantes de complementariedad. En otro aspecto, la molécula que se enlaza a antígeno comprende la región variable de una cadena ligera o pesada de anticuerpo. En una realización particularmente útil, la molécula que se enlaza a antígeno es aquimérica, e.g., humanizada, anticuerpo. La invención también está dirigida a métodos para preparar tales moléculas que se enlazan a antígeno, y el uso de las mismas en el tratamiento de trastorno, incluyendo linfomas de célula B.

[0041] La presente invención es la primera instancia conocida en la cual un anticuerpo anti-CD20 tipo II ha sido diseñado para tener funciones effectoras aumentadas tales como ADCC, mientras aún retienen habilidad de apóptosis potente. En consecuencia, la presente invención está dirigida a un anticuerpo anti-CD20 tipo II diseñado, que tiene ADCC aumentada como un resultado de dicho diseño y sin pérdida de la habilidad sustancial para inducir apóptosis. En una realización, los anticuerpos anti-CD20 Tipo II han sido diseñados para tener un patrón alterado de glicosilación en la región Fc. En una realización particular, la glicosilación alterada comprende un nivel aumentado de residuos complejos bisecados en la región Fc. En otra realización particular, la glicosilación alterada comprende un nivel reducido de residuos de fucosa en la región Fc. En otra realización, los anticuerpos anti-CD20 Tipo II anticuerpos tienen diseño de polipéptido sometido. La invención se dirige además a métodos para preparar tales anticuerpos Tipo II diseñados, y a métodos para usar tales anticuerpos en el tratamiento de diferentes trastornos de célula B, incluyendo linfomas de célula B.

[0042] La célula huésped de la presente invención se puede seleccionar del grupo que incluye, pero no se limita a, una célula CHO, una célula BHK, una célula NSO, una célula SP2/0, una célula de mieloma YO, una célula de mieloma de ratón P3X63, una célula PER, una célula PER. C6 o una célula de hidridoma. En una realización, la célula huésped de la invención comprende además un polinucleótido transfectado que comprende un polinucleótido que codifica la región VL del anticuerpo B-Ly1 murino o variantes de la misma y una secuencia que codifica una región equivalente a la región Fc de una inmunoglobulina humana. En otra realización, la célula huésped de la invención comprende además un polinucleótido transfectado que comprende un polinucleótido que codifica la región VH del anticuerpo B-Ly1 murino o variantes de las mismas y una secuencia que codifica una región equivalente a la región Fc de una inmunoglobulina humana.

[0043] En un aspecto adicional, la invención está dirigida a una célula huésped que produce una ABM que exhibe afinidad de enlace al receptor Fc aumentada y/o función efectora aumentada como un resultado de la modificación de sus oligosacáridos. En una realización, la afinidad de enlace

aumentada es a un receptor Fc, particularmente, el receptor FcγRIIIA. La function efectora contemplada aquí se puede seleccionar del grupo que incluye, pero no se limita a, citotoxicidad celular mediada por Fc aumentada; enlace aumentado a células NK; enlace aumentado a macrófagos; enlace aumentado a células polimorfonucleares; enlace aumentado a monocitos; señalización directa aumentada que induce apoptosis; maduración de célula dendrítica aumentada; y copiado de célula T aumentado.

[0044] En una realización adicional, la célula huésped de la presente invención comprende al menos un ácido nucleico que codifica un polipéptido que tiene actividad GnTIII que está operablemente enlazado a un elemento promotor constitutivo.

[0045] En otro aspecto, la invención está dirigida a un método para producir una ABM en una célula huésped, que comprende: (a) cultivar una célula huésped diseñada para expresar menos un polinucleótido que codifica un polipéptido de fusión que tiene actividad GnTIII bajo condiciones que permiten la producción de dicha ABM y que permite la modificación de los oligosacáridos presentes en la región Fc de dicha ABM; y (b) aislar dicha ABM; en donde dicha ABM es capaz de competir con el anticuerpo B-Ly1 murino para enlazarse a CD20 y en donde dicha ABM es quimérica. En una realización, el polipéptido que tiene actividad GnTIII es un polipéptido de fusión, que comprende preferiblemente el dominio catalítico de GnTIII y el dominio de localización Golgi de un polipéptido residente en Golgi heterólogo seleccionado del grupo que consiste del dominio de localización de manosidasa II, el dominio de localización de $\beta(1,2)$ -N-acetilglucosaminiltransferasa I ("GnTI"), el dominio de localización de manosidasa I, el dominio de localización de $\beta(1,2)$ -N-acetilglucosaminiltransferasa II ("GnTII"), y el dominio de localización de fucosiltransferasa de núcleo α -6. Preferiblemente, el dominio de localización Golgi es de manosidasa II o GnTI.

[0046] En un aspecto adicional, la invención está dirigida a a método para modificar el perfil de glicosilación de una ABM anti-CD20 producida por una célula huésped que comprende introducir en la célula huésped al menos un ácido nucleico o vector de expresión de la invención. En una realización,

la ABM es un anticuerpo o un fragmento del mismo; que comprende preferiblemente la región Fc de un IgG. Alternativamente, el polipéptido es una proteína de fusión que incluye una región equivalente a la región Fc de un IgG humano.

[0047] En un aspecto, la invención está relacionada con un anticuerpo recombinante, quimérico, o un fragmento del mismo, capaz de competir con el anticuerpo B-Ly1 murino para enlazarse a CD20 y que tiene fucosilación reducida.

[0048] En otro aspecto, la presente invención está dirigida a un método para modificar la glicosilación del anticuerpo recombinante o un fragmento del mismo de la invención usando un polipéptido de fusión que tiene actividad GnTIII y que comprende el dominio de localización Golgi de un polipéptido residente Golgi heterólogo. En una realización, los polipéptidos de fusión de la invención comprenden el dominio catalítico de GnTIII. En otra realización, el dominio de localización Golgi se selecciona del grupo que consiste de: el dominio de localización de manosidasa II, el dominio de localización de GnTI, el dominio de localización de manosidasa I, el dominio de localización de GnTII y el dominio de localización de fucosiltransferasa de núcleo α -6. Preferiblemente, el dominio de localización Golgi es de manosidasa II o GnTI.

[0049] En una realización, el método de la invención está dirigido a producir un anticuerpo recombinante quimérico o un fragmento del mismo, con oligosacáridos modificados en donde dichos oligosacáridos modificados tienen fucosilación reducida comparado con oligosacáridos no modificados. De acuerdo con la presente invención, estos oligosacáridos modificados pueden ser híbridos o complejos. En otra realización, el método de la invención está dirigido a producir un anticuerpo recombinante quimérico o un fragmento del mismo que tiene una proporción aumentada de oligosacáridos bisecados no fucosilados en la región Fc de dicho polipéptido. En una realización, los oligosacáridos bisecados no fucosilados son híbridos. En otra realización, los oligosacáridos bisecados no fucosilados son complejos. En una realización adicional, el método de la invención está dirigido a producir un anticuerpo recombinante quimérico o un fragmento del mismo, que tiene

al menos 20% de los oligosacáridos en la región Fc de dicho polipéptido que son bisecatos, no fucosilados. En una realización preferida, al menos 30% de los oligosacáridos en la región Fc de dicho polipéptido son bisecados no fucosilados. En otra realización preferida, en donde al menos 35% de los oligosacáridos en la región Fc de dicho polipéptido son bisecados, no fucosilados.

[0050] En un aspecto adicional, la invención está dirigida a un anticuerpo recombinante quimérico o un fragmento del mismo, que muestra una afinidad aumentada de enlace al receptor Fc y/o función efectora aumentada como resultado de la modificación de sus oligosacáridos. En una realización, la afinidad de enlace aumentada es a un receptor de activación de Fc. En una realización adicional, el receptor Fc es el receptor de activación de Fc γ R111A. La función efectora contemplada aquí se puede seleccionar del grupo que incluye, pero no se limita a, citotoxicidad celular mediada por Fc aumentada; enlace aumentado a células NK; enlace aumentado a macrófagos; enlace aumentado a células polimorfonucleares; enlace aumentado a monocitos; señalización directa aumentada que induce apoptosis; maduración de célula dendrítica aumentada; y copiado de célula T aumentado.

[0051] En otro aspecto, la invención está dirigida a un fragmento de anticuerpo recombinante, quimérico, que tiene especificidad de enlace al anticuerpo B-Ly1 murino y que contiene la región Fc, que está diseñado para tener función efectora aumentada producida por cualquiera de los métodos de la presente invención.

[0052] En otro aspecto, la presente invención está dirigida a una proteína de fusión que incluye un polipéptido que tiene la secuencia de SEQ ID NO: 1 y una región equivalente a la región Fc de una inmunoglobulina y diseñada para tener función efectora aumentada producida por cualquiera de los métodos de la presente invención.

[0053] En otro aspecto, la presente invención está dirigida a una proteína de fusión que incluye un polipéptido que tiene la secuencia de SEQ ID NO: 3 y una región equivalente a la Región Fc de una inmunoglobulina y

diseñada para tener función efectora aumentada producida por cualquiera de los métodos de la presente invención.

[0054] En un aspecto, la presente invención está dirigida a una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo recombinante quimérico, producido por cualquiera de los métodos de la presente invención, y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En otro aspecto, la presente invención está dirigida a una composición farmacéutica que comprende un fragmento de anticuerpo recombinante quimérico producido por cualquiera de los métodos de la presente invención, y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En otro aspecto, la presente invención está dirigida a una composición farmacéutica que comprende una proteína de fusión producida por cualquiera de los métodos de la presente invención, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

[0055] La invención está dirigida además con un método para el tratamiento de un trastorno tratable mediante la depleción de células, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente efectiva del anticuerpo recombinante, quimérico o un fragmento del mismo, producido por cualquiera de los métodos de la presente invención, a un sujeto humano en necesidad del mismo.

BREVE DESCRIPCION DE LAS FIGURAS

[0056] FIG 1. Secuencia de nucleótido (SEQ ID NO: 2) y amino ácido (SEQ ID NO: 1) de la región V_H del B-Ly1 murino.

[0057] FIG 2. Secuencia de nucleótido (SEQ ID NO: 4) y amino ácido (SEQ ID NO: 3) de la región V_L del B-Ly1 murino.

[0058] FIG 3. Enlace de Rituximab (O) y ch-B_Ly1 (Δ) a CD20 sobre células de linfoma B Raji.

[0059] FIG 4. Depleción de célula B por Rituximab® (O) y ch-B_Ly1 (Δ) en sangre entera de las tres clases diferentes del genotipo FcγRIIIa-158V/F: (A) sangre entera de un donador F/F, homocigótico para el receptor de afinidad

inferior; (B) sangre entera de un donador F/V, heterocigótico para el receptor de afinidad; y (C) sangre entera de un donador V/V, homocigótico para el receptor de afinidad superior.

[0060] FIG 5. Secuencia de nucleótido (SEQ ID NO: 11) y amino ácido (SEQ ID NO: 13) de la cadena pesada de un anticuerpo anti-CD20 quimérico.

[0061] FIG 6. Secuencia de nucleótido (SEQ ID NO: 12) y amino ácido (SEQ ID NO: 14) de la cadena ligera de un anticuerpo anti-CD20 quimérico.

[0062] FIG 7. Secuencias de nucleótido y amino ácido de CDRs del anticuerpo B-Ly1 murino. (A) CDRs predichos para la región V_H. (B) CDRs predichos para la región V_L.

[0063] FIG 8. Perfil MALDI-TOF de un anticuerpo B-Ly1 quimérico glicodiseñado. (A) Tabla que detalla los porcentajes de picos específicos; (B) Espectro para B-Ly1 quimérico glicodiseñado; (C) Espectro para el B-Ly1 quimérico glicodiseñado tratado con Endo-H.

[0064] FIG 9. Enlace de diferentes anticuerpos anti-CD20 humanizados a células B Raji. Las diferencias entre el constructo B-HH2 y los constructos B-HL8 y B-HL11 están localizadas en las regiones de marco 1 y 2 con los tres CDRs idénticos. B-HL8 y B-HL11 tienen sus secuencias FR1 y FR2 derivadas de la clase VH3 humana, mientras que el marco de B-HH2 completo es derivado de VH1 humano. B-HL11 es un derivado de B-HL8 con la mutación simple Glu/Gln, siendo Gln el residuo de amino ácido en el constructo B-HH2. Esto significa que el intercambio Glu/Gln no altera la afinidad de enlace o intensidad. Las otras diferencias entre B-HH2 y B-HL8 son residuos 14 FR, de los cuales uno o más influenciarán el comportamiento de enlace a antígeno de este anticuerpo.

[0065] FIG 10. Enlace del anticuerpo anti-CD20 BHL4-KV1 humanizado en células objetivo Raji. El constructo B-HL4 se deriva del anticuerpo B-HH2 reemplazando el FR1 de B-HH2 con el de la secuencia VH1_45 de línea germinal humana. Este constructo muestra capacidad de enlace a antígeno disminuida en gran medida, a pesar de tener diferentes

amino ácidos en solamente tres posiciones dentro de FR1. Estos residuos están localizados en las posiciones 2, 14, y 30 de acuerdo con la numeración Kabat. De estos, la posición 30 parece ser la posición más influyente, porque es parte de la definición Chothia de CDR1.

[0066] FIG 11. Comparación del comportamiento de enlace entre B-HH1, B-HH2, B-HH3, y el anticuerpo B-Ly1 parental. Los datos muestran que todas las Abs exhiben un valor EC50 similar, pero el constructo B-HH1 se enlaza con una intensidad/estequiometría inferior que las variantes B-HH2 y B-HH3. B-HH1 puede ser distinguido de B-HH2 y B-HH3 por sus regiones CDR1 y CDR2 parcialmente humanas (definición Kabat), así como el polimorfismo Ala/Thr en la posición 28 (numeración Kabat). Esto indica que cualquier 28, el CDR1 completo, y/o el CDR2 completo es importante para la interacción del anticuerpo/antígeno.

[0067] FIG 12. La comparación de B-HL1, B-HH1, y el anticuerpo B-Ly1 parental. Los datos mostraron ausencia de cualquier actividad de enlace en el constructo B-HL1, y cerca de la mitad de la intensidad/estequiometría de enlace de B-HH1 comparada con B-Ly1. Ambos B-HL1, así como B-HH1, están diseñados con base en marcos de aceptor derivados de la clase humana VH1. Entre otras diferencias, la posición 71 (numeración Kabat) del constructo B-HL1 es una diferencia notoria, indicando su importancia putativa para el enlace de antígeno.

[0068] FIG 13. Análisis fluorocitométrico de la capacidad del anticuerpo anti-CD20 a su antígeno. Los datos mostraron que los constructos B-HL2 y B-HL3 no muestran actividad de enlace de CD-20.

[0069] FIG 14. Apóptosis de anticuerpos anti-CD20 en células MCL Z-138.

[0070] FIG 15. Apóptosis por anticuerpos anti-CD20. Detalles del ensayo: 5×10^5 células/agujero fueron sembradas en placas de 24 agujeros (5×10^5 células/ml) en medio de cultivo. 10 mg del respectivo Ab, PBS para control negativo o Camptotecina 5mM (CPT) control positivo, se agregaron a los agujeros. Las muestras fueron incubadas o/n (16 h), teñidas con AnnV-FITC y analizadas mediante FACS. El ensayo se realizó en triplicados. (*):

Señal para PBS solo sustraído (PBS solo produjo 8% y 2% AnnV+ para células PR-1 y Z-138 respectivamente). Anticuerpos usados aquí: C2B8 (quimérico, no glicodiseñado); BHH2-KV1 (humanizado, no glicodiseñado). Nota: este ensayo no involucra ninguna célula efectora adicional, solo objetivos más anticuerpo o controles.

[0071] FIG 16. Muerte de células objetivo por anticuerpos anti-CD20 con células efectoras inmunes. Detalles del ensayo: depleción de células B en incubación durante la noche de sangre entera normal y análisis para CD19+/CD3+ mediante FACS. ADCC usando PBMCs como efectores, incubación de 4 h, relación efector:objetivo de 25:1, muerte de objetivo medida por retención de calceína con relación a lisis de detergente (100%) y a lisis sin Ab (0%). Anticuerpos usados: C2B8 (forma quimérica, no glicodiseñada); BHH2-KVI-wt (forma humanizada, no glicodiseñada de BHH2-KV1); BHH2-KV1-GE (forma humanizada, glicodiseñada de BHH2-KV1).

[0072] FIG 17. Perfil de MALDI/TOF-MS de oligosacáridos Fc liberados por PNGasa de anticuerpo CD20 anti-humano B-Ly11 humanizado BHH2-KV1 IgG1 no modificado, no glicodiseñado.

[0073] FIG 18. Perfil de MALDI/TOF-MS de oligosacáridos Fc liberados por PNGasa de anticuerpo CD20 anti-humano B-ly1 IgG1 humanizado g1 BHH2-KV1. El glicodiseño se hizo mediante la co-expresión en células huésped de genes de anticuerpo y enzimas que codifican gen con actividad catalítica de β -1,4-N- acetilglucosaminiltransferasa III (GnT-III).

[0074] FIG 19. Perfil de MALDI/TOF-MS de oligosacáridos de Fc liberados por PNGasa de anticuerpo CD20 anti-humano de B-ly1 lhG g2 humanizado BHH2-KVI glicodiseñado. El glicodiseño se hizo mediante la co-expresión en células huésped de genes de anticuerpo y enzima que codifica genes con actividad catalítica de β -1,4-N- acetilglucosaminiltransferasa III (GnT-111) y que codifica enzima con actividad catalítica Golgi α -manosidasa II.

[0075] FIG 20. Enlace de anticuerpos no glicodiseñados y glicodiseñados al receptor FcγRIIIa humano mostrado en la superficie de células CHO-CD16 recombinantes.

[0076] FIG 21. Apóptosis de anticuerpos anti-CD20 de Fc no diseñada o Fc diseñada sobre células MCL Z-138. Detalles del ensayo: 5 x 10⁵ cells/agujero fueron sembradas en placas de 24 agujeros (5 x10⁵ cells/ml) en medio del cultivo. 10 mg del Ab respectivo, PBS para el control negativo se agregaron a los agujeros. Las muestras fueron incubadas o/n (16 h), teñidas con AnnV-FITC y analizadas mediante FACS. En ensayo se hizo en triplicados. Abs usado: C2B8 = rituximab (forma quimérica, no glicodiseñada, igual que la forma comercial); BHH2-KV1 (humanizado, no diseñado – ver Figura 6 para el perfil de glicosilación); BHH2-KV1 g1 (humanizado, glicodiseñado – ver Fig. 7 para el perfil de glicosilación); BHH2-KV1 g2 (humanizado, glicodiseñado – ver Fig 8 para el perfil de glicosilación). Nota: Este ensayo no involucra ninguna célula efectora adicional, solo objetivos más anticuerpo o controles. (*): Señal para PBS solo sustraído.

DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION

[0077] Los términos usados son los generalmente usados la técnica, a menos que se definan de otra forma.

[0078] Como se usa aquí, el término *anticuerpo* pretende incluir moléculas de anticuerpo enteras, incluyendo anticuerpos monoclonales, policlonales y multiespecíficos (e.g., biespecíficos), así como fragmentos de anticuerpo que tienen la Región Fc y retienen especificidad de enlace, y proteínas de fusión que incluyen una región equivalente a la Región Fc de una inmunoglobulina y que retienen especificidad de enlace. También se abarcan anticuerpos humanizados, primatizados y quiméricos.

[0079] Como se usa aquí, el término *Región Fc* se refiere a la región terminal C de una cadena pesada de IgG. Aunque los límites de la Región Fc de una cadena pesada de IgG pueden variar ligeramente, la Región Fc

de cadena pesada de IgG humano está definida para estirarse desde el residuo de amino ácido en la posición Cys226 al terminal carboxilo.

[0080] Como se usa aquí, el término *región equivalente a la Región Fc de una inmunoglobulina* pretende incluir variantes alélicas de la Región Fc que se encuentran naturalmente de una inmunoglobulina así como variantes que alteraciones que producen sustituciones, adiciones o eliminaciones pero que no disminuyen sustancialmente la habilidad de la inmunoglobulina para mediar las funciones efectoras (tales como citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo). Por ejemplo, uno o más amino ácidos pueden ser borrados del terminal N o el terminal C de la Región Fc de una inmunoglobulina sin pérdida sustancial de función biológica. Tales variantes se pueden seleccionar de acuerdo con reglas generales conocidas en la técnica con el fin de tener el efecto mínimo sobre la actividad. (Ver, e.g., Bowie, J. U. et al., *Science* 247: 1306-10 (1990)).

[0081] Como se usa aquí, el término *molécula que se enlaza a antígeno* se refiere en su sentido más amplio a una molécula que se enlaza específicamente a un determinante antigénico. Más específicamente, *una molécula que se enlaza a CD20* es una molécula que se enlaza específicamente a una fosfoproteína no glicosilada de superficie celular de 35,000 Daltons, típicamente designada como antígeno Bp35 de diferenciación restringida de linfocito B humano, referida comúnmente como CD20. "Se enlaza específicamente" significa que el enlace es selectivo para el antígeno y puede ser discriminado de interacciones no deseadas o no específicas.

[0082] Como se usa aquí, los términos *fusión* y *quimérico*, cuando se usan en referencia a polipéptidos tales como ABMs se refiere a polipéptidos que comprenden secuencias de amino ácido derivadas de dos o más polipéptidos heterólogos, tales como porciones de anticuerpos de especies diferentes. Para ABMs quiméricas, por ejemplo, los componentes de enlace a no antígeno se pueden derivar de una amplia variedad de especies, incluyendo primates tales como chimpancés y humanos. La región constante de la ABM quimérica es lo más preferiblemente sustancialmente idéntica a la región constante de un anticuerpo humano natural; la región variable del anticuerpo quimérico es lo más preferiblemente sustancialmente idéntica a la

de un anticuerpo antiCD-20 recombinante que tiene la secuencia de amino ácido de la región variable de B-Ly1 murino. Los anticuerpos humanizados son una forma particularmente preferida de anticuerpo de fusión o quimérico.

[0083] Como se usa aquí, un polipéptido que tiene "*actividad GnTIII*" se refiere a polipéptidos que son capaces de catalizar la adición de un residuo de N-acetilglucosamina (GlcNAc) en la unión β -1-4 a la manosida enlazada por β del núcleo de trimanosil de oligosacáridos enlazados por N. Esto incluye polipéptidos de fusión que muestran actividad enzimática similar a, pero no necesariamente idéntica a una actividad de β (1,4)-N-acetilglucosaminiltransferasa III, también conocida como β -1,4-manosil-glicoproteína 4-beta-N-acetilglucosaminil-transferasa (EC 2.4.1.144), de acuerdo con el Comité de Nomenclatura de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular (NC-IUBMB), medido en un ensayo biológico particular, con o sin dependencia a la dosis. En el caso en que existe dependencia a la dosis, no necesita ser idéntica a la de GnTIII, pero que es sustancialmente similar a la dependencia de dosis en una actividad dada comparada con la GnTIII (i. e., el polipéptido candidato exhibirá mayor actividad o no más de 25 veces menos y, preferiblemente, no más de aproximadamente 10 veces menos actividad, y más preferiblemente, no más de aproximadamente tres veces menos actividad con relación a la GnTIII.)

[0084] Como se usa aquí, el término *variante* (o análogo) se refiere a un polipéptido que difiera de un polipéptido citado específicamente de la invención por inserciones, eliminaciones y sustituciones de amino ácido creadas usando, e.g., técnicas de ADN recombinante. Las variantes de las ABMs de la presente invención incluyen moléculas que se enlazan a antígeno quiméricas, primatizadas o humanizadas en donde uno o varios de los residuos de amino ácido están modificados por sustitución, adición y/o eliminación de forma que no afectan sustancialmente la afinidad de enlace a antígeno (e. g., CD20). Guía para determinar que residuos de amino ácido pueden ser reemplazados, adicionados o eliminados sin abolir las actividades de interés, se puede encontrar comparando la secuencia del polipéptido particular con la de péptidos homólogos y minimizando el número de cambios de secuencia de amino ácido hechos en las regiones de alta

homología (regiones conservadas) o reemplazando amino ácidos con secuencia de consenso.

[0085] Alternativamente, las variantes de recombinante que codifican estos polipéptidos iguales o similares se pueden sinterizar o seleccionar haciendo uso de la "redundancia" en el código genético. Se pueden introducir varias sustituciones de codón, tales como los cambios silenciosos que producen varios sitios de restricción, para optimizar la clonación en un vector de plásmido o viral o la expresión en un sistema procariótico o eucariótico particular. Las mutaciones en la secuencia de polinucleótido se pueden reflejar en el polipéptido o dominios de otros péptidos adicionados al polipéptido para modificar las propiedades de cualquier parte del polipéptido, para cambiar características tales como afinidades de enlace a ligando, afinidades intercadena, o velocidad de degradación/recambio.

[0086] Preferiblemente, las "sustituciones" de amino ácido son el resultado de reemplazar un amino ácido con otro amino ácido que tiene propiedades estructurales y/o químicas similares, i.e., reemplazos de amino ácido conservadores. Las sustituciones de amino ácido "conservadoras" se pueden hacer con base en la similitud de polaridad, carga, solubilidad, hidrofobicidad, hidrofiliidad, y/o la naturaleza anfipática de los residuos involucrados. Por ejemplo, amino ácidos no polares (hidrofóbicos) incluyen alanina, leucina, isoleucina, valina, prolina, fenilalanina, triptofan, y metionina; amino ácidos polares neutros incluyen glicina, serina, treonina, cisteína, tirosina, asparagina, y glutamina; amino ácidos cargados positivamente (básicos) incluyen arginina, lisina, e histidina; y amino ácidos cargados negativamente (ácidos) incluyen ácido aspártico y ácido glutámico. Las "inserciones" o "eliminaciones" están preferiblemente en el rango de aproximadamente 1 a 20 amino ácidos, más preferiblemente 1 a 10 amino ácidos. La variación permitida puede determinarse experimentalmente haciendo inserciones, eliminaciones o sustituciones de aminoácidos sistemáticamente en una molécula de polipéptido usando técnicas de ADN recombinante y ensayando las variantes recombinantes resultantes para actividad.

[0087] Como se usa aquí, el término *humanizado* se usa para referirse a una molécula que se enlaza a antígeno derivada de una molécula que se

enlaza a antígeno no humana, por ejemplo, un anticuerpo murino, que retiene o retiene sustancialmente las propiedades de enlace a antígeno de la molécula base pero que es menos inmunogénica en humanos. Esto puede lograrse por varios métodos que incluyen (a) injertar los dominios variables no humanos enteros en las regiones constantes humanas para generar anticuerpos quiméricos, (b) injertar solo los CDRs no humanos en marco humano y regiones constantes con o sin retención de residuos de marco críticos (e.g., aquellos que son importantes para retener buena afinidad de enlace a antígeno o funciones de anticuerpo), o (c) trasplantar los dominios variables no humanos enteros, pero "encubriendolos" con una sección tipo humana mediante el reemplazo de residuos de superficie. Tales métodos están revelados en Jones et al., Morrison et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 81: 6851-6855 (1984); Morrison y Oi, *Adv. Immunol.*, 44: 65-92(1988); Verhoeyen et al., *Science*, 239: 1534-1536 (1988); Padlan, *Molec. Immun.*, 28: 489-498 (1991); Padlan, *Molec. Immun.*, 31 (3): 169-217 (1994), todos los cuales están incorporados aquí para referencia en su totalidad. Generalmente hay 3 regiones determinantes de complementariedad, o CDRs, (CDR1, CDR2 y CDR3) en cada uno de los dominios variables de cadena pesada y ligera de un anticuerpo, que están flanqueados por cuatro subregiones de marco (i.e., FR1, FR2, FR3, y FR4) en cada uno de los dominios variables de cadena pesada y ligera de un anticuerpo: FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4. Una discusión de anticuerpos humanizados se puede encontrar, *inter alia*, en la Patente U.S. No. 6,632,927, y en la Solicitud publicada U.S. No. 2003/0175269, ambas incorporadas aquí para referencia en su totalidad.

[0088] Igualmente, como se usa aquí, el término *primatizado* se usa para referirse a una molécula que se enlaza a antígeno derivada de una molécula que se enlaza a antígeno de no primate, por ejemplo, un anticuerpo murino, que retiene o retiene sustancialmente las propiedades de enlace a antígeno de la molécula base, pero que es menos inmunogénica en primates.

[0089] En el caso en que hay dos o más definiciones de un término que se usa y/o es aceptado en la técnica, la definición del término como se usa aquí pretende incluir todos aquellos significados a menos que se declare específicamente lo contrario. Un ejemplo específico es el uso del término

"región determinante de complementariedad" ("CDR") para describir los sitios de combinación de antígeno no continuos encontrados dentro de la región variable de los polipéptidos de cadena pesada y ligera. Esta region particular ha sido descrita por Kabat et al., Dep. U.S. de Salud y Servicios Humanos, "Sequences of Proteins of Immunological Interest" (1983) y por Chothia et al., *J. Mol. Biol.* 196: 901-917 (1987), que están incorporadas aquí para referencia, en donde las definiciones incluyen sobreposiciones o subconjuntos de residuos de amino ácidos cuando son comparados entre sí. Sin embargo, la aplicación de cualquier definición para referirse a una CDR de un anticuerpo o variantes de los mismos pretende estar dentro del alcance del término como de ha definido y usado aquí. Los residuos de amino ácido apropiados que abarcan las CDRs definidas por cada una de las referencias citadas anteriormente están establecidas en la Tabla I como una comparación. Los números de residuo exactos que abarcan una CDR particular variarán dependiendo de la secuencia y tamaño de la CDR. Los expertos en la técnica pueden rutinariamente determinar que residuos comprenden una CDR particular dada la secuencia de amino ácido de región variable del anticuerpo.

TABLA 1. Definiciones de CDR¹

	Kabat	Chothia	AbM
V _H CDR1	31-35	26-32	26-35
V _H CDR2	50-65	52-58	50-58
V _H CDR3	95-102	95-102	95-102
V _L CDR1	24-34	26-32	
V _L CDR2	50-56	50-52	
V _L CDR3	89-97	91-96	

¹ La numeración de todas las definiciones de CDR en la Tabla 1 es de acuerdo con las convenciones de numeración establecidas por Rabat et al. (ver más adelante)

[0090] Kabat et al. también definió un sistema de numeración para secuencias de dominio variable que es aplicable a cualquier anticuerpo. Aquel de conocimiento común en la técnica puede asignar sin ambigüedad este sistema de "numeración Rabat" a cualquier secuencia de dominio

variable, sin basarse en cualquier dato experimental más allá de la secuencia misma. Como se usa aquí, "numeración Kabat" se refiere al sistema de numeración establecido en Kabat et al., Departamento Americano de Salud y Servicios Humanos, "Secuencia de proteínas de interés inmunológico" (1983). A menos que se especifique de otra forma, las referencias a la numeración de posiciones de residuo de amino ácido específicos en una ABM están de acuerdo con el sistema de numeración Kabat. Las secuencias del listado de secuencias (i.e., SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 78) no están enumerada de acuerdo al sistema de enumeración Kabat.

[0091] Por un ácido nucleico o polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótido al menos, por ejemplo 95% "idéntica" a una secuencia de nucleótido de referencia de la presente intención, se pretende que la secuencia de nucleótido del polinucleótido es idéntica a la secuencia de referencia excepto que la secuencia de polinucleótido puede incluir hasta cinco mutaciones de punto por cada 100 nucleótidos de la secuencia de nucleótido. En otras palabras, para obtener un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótido al menos 95% idéntica a una secuencia de nucleótido de referencia, hasta 5% de los nucleótidos en la secuencia de referencia pueden ser eliminados o sustituidos con otro nucleótido, o un número de nucleótidos hasta 5% de los nucleótidos totales en la secuencia de referencia pueden ser insertados en la secuencia de referencia. La secuencia de pregunta puede ser la secuencia entera mostrada en cualquier figura de FIG. 24 o FIG. 25.

[0092] Como una materia práctica, si una molécula de ácido nucléico particular o polipéptido es al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a una secuencia de nucleótido o secuencia de polipéptido de la presente invención puede determinarse convencionalmente usando programas de computadora conocidos. Un método preferido para determinar la mejor coincidencia global entre una secuencia de pregunta (una secuencia de la presente invención) y una secuencia sujeto, también referido como un alineamiento de secuencia global, se puede determinar usando el programa de computadora FASTDB basado en el algoritmo de Brutlag et al., *Comp. App. Biosci.* 6: 237-245 (1990). En una alineación de secuencia las secuencias de pregunta y sujeto son ambas secuencias de

AND. Una secuencia de RNA puede ser comparada convirtiendo las U's a T's. El resultado de dicha alineación de secuencia global está en porcentaje de identidad. Los parámetros preferidos usados en una alineación FASTDB de secuencias de ADN para calcular el porcentaje de identidad son: Matriz=Unitaria, k-tuple=4, Penalidad de no coincidencia = 1, Penalidad de Unión =30, Longitud del grupo de aleatorización =0, Puntaje de corte = 1, Penalidad de brecha = 5, Penalidad de Tamaño de brecha 0.05, Tamaño de ventana = 500 o la longitud de la secuencia de nucleótido sujeto, la que sea más corta.

[0093] Si la secuencia sujeto es más corta que la secuencia de pregunta por las eliminaciones 5' o 3', no por eliminaciones internas, se debe hacer una corrección manual a los resultados. Esto es porque el programa FASTDB no cuenta par alas truncaciones 5' y 3' de la secuencia sujeto cuando se calcula el porcentaje de identidad. Para las secuencias sujetos truncadas en los extremos 5' o 3', con relación a la secuencia de pregunta, el porcentaje de identidad es corregido calculando el número de bases de la secuencia de pregunta que son 5' y 3' de la secuencia sujeto, que no coinciden/están alineadas, como un porcentaje de las bases totales de la secuencia de pregunta. Si un nucleótido coincide/está alineado se determina mediante los resultados de la alineación de secuencia FASTDB. Este porcentaje es entonces sustraído del porcentaje de identidad, calculado por el programa FASTDB anterior usando los parámetros especificados, para llegar a un puntaje de porcentaje de identidad final. Este puntaje corregido es el que se usa para los propósitos de la presente invención. Solamente las bases fuera de las bases 5' y 3' de la secuencia sujeto, como se muestran en la alineación FASTDB, que no coinciden/están alineadas con la secuencia de pregunta, son calculadas para los propósitos de ajustar manualmente el puntaje de porcentaje de identidad.

[0094] Por ejemplo, una secuencia sujeto de 90 bases es alineada a una secuencia de pregunta de 100 bases para determinar el porcentaje de identidad. Las eliminaciones ocurren en el extremo 5' de la secuencia sujeto y por lo tanto, la alineación FASTDB no muestra una coincidencia/alineación de las primeras 10 bases en el extremo 5'. Las 10 bases no emparejadas representan el 10% de la secuencia (número de bases en los extremos 5' y 3' que no coinciden/número total de bases en la secuencia de pregunta) de

forma que el 10% es sustraído del puntaje de porcentaje de identidad calculado por el programa FASTDB. Si las 90 bases restantes estuvieran coincidieran perfectamente, el porcentaje de identidad final sería 90%. En otro ejemplo, una secuencia sujeto de 90 bases es comparada con una secuencia de pregunta de 100 bases. Esta vez las eliminaciones son eliminaciones internas de forma que no hay bases en 5' o 3' de la secuencia sujeto que no coinciden/están alineadas con la de pregunta. En este caso el porcentaje de identidad calculado por FASTDB no se corrige manualmente. De nuevo, solamente las bases 5' y 3' de la secuencia sujeto que no coinciden/están alineadas con la secuencia query se corrigen manualmente corregidas. No se hace ninguna otra corrección manual para los propósitos de la presente invención.

[0095] Por un polipéptido que tiene una secuencia de amino ácido al menos, por ejemplo, 95% "idéntica" a una secuencia de amino ácido de pregunta de la presente invención, se pretende que la secuencia de amino ácido del polipéptido sujeto sea idéntica a la secuencia de pregunta excepto que la secuencia de polipéptido sujeto puede incluir hasta cinco alteraciones de amino ácido por cada 100 amino ácidos de la secuencia de amino ácido de pregunta. En otras palabras, para obtener un polipéptido que tenga una secuencia de amino ácido al menos 95% idéntica a una secuencia de amino ácido de pregunta, hasta 5% de los residuos de amino ácido en la secuencia sujeto puede ser insertada, eliminada, o sustituida con otro amino ácido. Estas alteraciones de la secuencia de referencia pueden ocurrir en las posiciones del terminal amino o carboxi de la secuencia de amino ácido de referencia o en cualquier parte entre aquellas posiciones terminales, intercaladas ya sea individualmente entre residuos en la secuencia de referencia o en uno o más grupos contiguos dentro de la secuencia de referencia.

[0096] Como una material práctica, si cualquier polipéptido particular es al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntico a un polipéptido de referencia, se puede determinar convencionalmente usando programas de computadora conocidos. Un método preferido para determinar la mayor coincidencia entre una secuencia de pregunta (una secuencia de la presente invención) y una secuencia sujeto, también referido como una alineación de secuencia global, se puede determinaer usando el programa

de computadora FASTDB basado en el algoritmo de Brutlag *et al.*, *Comp. App. Biosci.* 6: 237-245 (1990). En una alineación de secuencia, las secuencias de pregunta y sujeto son ambas secuencias de nucleótido o ambas secuencias de amino ácido. El resultado de dicha alineación de secuencia global está en porcentaje de identidad. Los parámetros preferidos usados en una alineación FASTDB de amino ácido son: Matriz=PAM 0, k-tuple=2, Penalidad de no coincidencia = 1, Penalidad de Unión = 20, Longitud de Grupo de aleatorización =0, Puntaje de corte = 1, Tamaño de ventana = longitud de secuencia, Penalidad de brecha = 5, Penalidad de tamaño de brecha = 0.05, Tamaño de Ventana =500 o la longitud de la secuencia de amino ácido sujeto, la que sea más corta.

[0097] Si la secuencia sujeto es más corta que la secuencia de pregunta debido a las eliminaciones del terminal N- o C-, no debidas a eliminaciones internas, se debe hacer una corrección manual a los resultados. Esto se debe a que el programa FASTDB no tiene en cuenta las truncaciones de terminal de N- y C- de la secuencia sujeto cuando se calcula el porcentaje de identidad global. Para las secuencias sujeto truncadas en los terminales N- y C-, con relación a la secuencia de pregunta, el porcentaje de identidad es corregido calculando el número de residuos de la secuencia de pregunta que son terminal N- y C- de la secuencia sujeto, que no coinciden/están alineadas con un residuo sujeto correspondiente, como un porcentaje de las bases totales de la secuencia de pregunta. Si un residuo coincide/está alineado se determina por los resultados de la alineación de secuencia FASTDB. Este porcentaje es entonces sustraído del porcentaje de identidad, calculado por el programa FASTDB anterior usando los parámetros especificados, para llegar a un puntaje de porcentaje de identidad final. Este puntaje de porcentaje de identidad final es el que se usa para los propósitos de la presente invención. Solamente los residuos en los terminales N- C- de la secuencia sujeto, que no coinciden/están alineados con la secuencia de pregunta, son consideradas para los propósitos de ajustar manualmente el puntaje de porcentaje de identidad. Esto es, solamente las posiciones de residuo de pregunta fuera de los residuos más lejados de los terminales N- y C-de la secuencia sujeto.

[0098] Por ejemplo, una secuencia sujeto de residuo de amino ácido 90 está alineada con una secuencia de pregunta de residuo 100 para

determinar el porcentaje de identidad. La eliminación ocurre en el terminal N- de la secuencia sujeto y por lo tanto, la alineación FASTDB no muestra una coincidencia/alineación de los primeros 10 residuos en el terminal N-. Los 10 residuos no emparejados representan el 10% de la secuencia (número de residuos en los terminales N- y C- no emparejados/número total de residuos en la secuencia de pregunta) de forma que 10% es sustraído del puntaje de porcentaje de identidad calculado por el programa FASTDB. Si los 90 residuos restantes coincidieron perfectamente, el porcentaje de identidad final sería 90%. En otro ejemplo, una secuencia sujeto de 90 residuos es comparada con una secuencia de pregunta de 100 residuos. Esta vez las eliminaciones son eliminaciones internas de forma que no hay residuos en los terminales N- o C- de la secuencia sujeto con no coinciden/están alineados con la de pregunta. En este caso el porcentaje de identidad calculado por FASTDB no se corrige manualmente. Una vez más, solamente las posiciones de residuo fuera de los extremos de terminales N- y C- de la secuencia sujeto, como se muestra en la alineación FASTDB, que no coinciden/están alineados con la secuencia de pregunta se corrigen manualmente. No se hace ninguna otra corrección manual para los propósitos de la invención.

[0099] Como se usa aquí, un ácido nucleico que "se hibridiza bajo condiciones severas" a una secuencia de ácido nucleico de la invención, se refiere a un polinucleótido que se hibridiza en una incubación durante la noche a 42 °C en una solución que comprende 50% de formamida, 5xSSC (NaCl 750 mM, citrato de sodio 75 mM), fosfato de sodio 50 mM (pH 7.6), 5x solución de Denhardt, 10% de sulfato de dextran, y 20ug/ml de ADN de esperma de salmón cortado, desnaturalizado, seguido por lavado de los filtros en 0.1x SSC a aproximadamente 65 °C.

[0100] Como se usa aquí, el término *dominio de localización Golgi* se refiere a la secuencia de aminoácido de un polipéptido residente en Golgi que es responsable de anclar el polipéptido en la ubicación dentro del complejo Golgi. Generalmente, los dominios de localización comprenden "colas" terminales de amino de una enzima.

[0101] Como se usa aquí, el término *función efectora* se refiere a aquellas actividades biológicas que son atribuibles a la Región Fc (una

Región Fc se secuencia nativa o una Región Fc variante de secuencia de amino ácido) de un anticuerpo. Ejemplos de funciones efectoras de anticuerpo incluyen, pero no se limitan a, afinidad de enlace de receptor Fc, citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC), fagocitosis celular dependiente de anticuerpo (ADCP), secreción de citocina, captación de antígeno mediada por el complejo inmune por células que presentan antígeno, regulación descendente de receptores de superficie celular, etc.

[0102] Como se usa aquí, el término diseñar, diseñado, que diseña y diseño de glicosilación se considera que incluyen cualquier manipulación del patrón de glicosilación de un polipéptido que se encuentra naturalmente o recombinante o fragmento del mismo. El diseño de glicosilación incluye diseño metabólico de la maquinaria de glicosilación de una célula, incluyendo manipulaciones genéticas de las rutas de síntesis de oligosacárido para alcanzar glicosilación alterada de glicoproteínas expresadas en células. Adicionalmente, el diseño de glicosilación incluye los efectos de las mutaciones y el ambiente celular a la glicosilación.

[0103] Como se usa aquí, el término *célula huésped* cubre cualquier caso de sistema celular que puede ser diseñada para generar los polipéptidos y las moléculas que se enlazan a antígeno de la presente invención. En una realización, la célula huésped es diseñada para permitir la producción de una molécula que se enlaza a antígeno con glicoformas modificadas. En una realización preferida, la molécula que se enlaza a antígeno es un anticuerpo, fragmento de anticuerpo, o proteína de fusión. En ciertas realizaciones, las células huésped han sido manipuladas adicionalmente para expresar niveles aumentados de uno o más polipéptidos que tienen actividad GnTIII. Las células huésped incluyen células cultivadas, e.g., células cultivadas mamíferas, tales como células CHO, células BHK, células NSO, células SP2/0, células de mieloma YO, células de mieloma de ratón P3X63, células PER, células PER.C6 o células de hibridoma, células de levadura, células de insecto, y células de planta, por nombrar solemante unas pocas, pero también células comprendidas dentro de un animal transgénico, planta transgénica o planta cultivada o tejido de animal.

[0104] Como se usa aquí, el término *citotoxicidad celular mediada por Fc* incluye citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo y citotoxicidad celular mediada por una proteína de fusión de Fc soluble que contiene una región Fc humana. Es un mecanismo inmune que conduce a la lisis de "células marcadas por anticuerpo" por "células efectoras inmunes humanas", en donde:

[0105] Las *células efectoras inmunes humanas* son una población de leucocitos que muestran receptores Fc sobre su superficie a través de la cual se enlazan a la región Fc de anticuerpos o de proteínas de fusión de Fc y realizan funciones efectoras. Tal población puede incluir, pero sin limitarse a, células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y/o células asesinas naturales (NK).

[0106] Las *células marcadas por anticuerpo* son células enlazadas por los anticuerpos o proteínas de fusión Fc. Los anticuerpos o proteínas de fusión Fc se enlazan a células objetivo mediante el terminal N- de la parte de proteína a la Región Fc.

[0107] Como se usa aquí, el término *citotoxicidad celular mediada por Fc aumentada* se define como ya sea un aumento del número de "células marcadas por anticuerpo" que son lisadas en un tiempo dado, a una concentración dada de anticuerpo, o de proteína de fusión Fc, en el medio que circunda las células marcadas, mediante el mecanismo de citotoxicidad celular mediado por Fc definido anteriormente, y/o una reducción de la concentración de anticuerpo, o de proteína de fusión Fc, en el medio que circunda las células objetivo, requerido para alcanzar la lisis de un número dado de "células marcadas por anticuerpo", en un tiempo dado, mediante el mecanismo de citotoxicidad celular mediado por Fc. El aumento de la citotoxicidad celular mediada por Fc es relativo a la citotoxicidad celular mediada por el mismo anticuerpo, o proteína de fusión Fc, producida por el mismo tipo de células huésped, usando los mismos métodos de producción, purificación, formulación y almacenamiento estándar, que son conocidos por los expertos en la técnica, pero que no han sido producidos por células huésped diseñadas para expresar la glicosiltransferasa GnTIII mediante los métodos descritos aquí.

[0108] *Anticuerpo que tiene citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo aumentada* (ADCC) se refiere a un anticuerpo, como el término definido aquí, que tiene ADCC aumentada determinada por cualquier método adecuado conocido por los expertos en la técnica. Un ensayo de ADCC in vitro aceptado es el siguiente:

- 1) El ensayo usa células objetivo que son conocidas por expresar el antígeno objetivo reconocido por la región que se enlaza a antígeno del anticuerpo;
- 2) el ensayo usa células mononucleares de sangre periférica humana (PBMCs), aisladas de sangre de un donador saludable escogido aleatoriamente, como células efectoras;
- 3) el ensayo se realiza de acuerdo con el siguiente protocolo:
 - i) las PBMCs son aisladas usando procedimientos de centrifugación de densidad estándar y son suspendidas a 5×10^6 células/ml en medio de cultivo de célula RPMI;
 - ii) las células objetivo son cultivadas mediante métodos de cultivo de tejido estándares, recolectadas de la fase de crecimiento exponencial con una viabilidad mayor de 90%, lavadas en medio de cultivo de célula RPMI, marcadas con 100 micro-Curies de ^{51}Cr , lavadas dos veces con medio de cultivo de célula, y resuspendidas en medio de cultivo de célula a una densidad de 10^5 células/ml;
 - iii) 100 microlitros de la suspensión de célula objetivo final anterior, son transferidos a cada agujero de una placa microtituladora de 96-agujeros;
 - iv) el anticuerpo se diluye serialmente de 4000 ng/ml a 0.04 ng/ml en medio de cultivo de célula y 50 microlitros de las soluciones de anticuerpo resultante son agregadas a las células objetivo en la placa microtituladora de 96-agujeros, ensayadas en triplicado varias

concentraciones de anticuerpo que cubren el rango total de concentración anterior;

v) para los controles de liberación máxima (MR), 3 agujeros adicionales en la placa que contiene las células objetivo marcadas, reciben 50 microlitros de una solución acuosa al 2% (V/V) de detergente no iónico (Nonidet, Sigma, St. Louis), en lugar de la solución de anticuerpo (punto iv anterior);

vi) para los controles de liberación espontánea (SR), 3 agujeros adicionales en la placa que contiene las células objetivo marcadas, reciben 50 microlitros de medio de cultivo de célula RPMI en lugar de la solución de anticuerpo (punto iv anterior);

vii) la placa microtituladora de 96 agujeros es entonces centrifugada a 50 x g por 1 minuto e incubada por 1 hora a 4 °C;

viii) 50 microlitros de la suspensión de PBMC (punto i anterior) se agregan a cada agujero para producir un efector: relación de célula objetivo de 25:1 y las placas son colocadas en un incubador bajo atmósfera al 5% de CO₂ a 37 °C por 4 horas;

ix) el sobrenadante libre de célula de cada agujero es recolectado y la radiactividad liberada experimentalmente (ER) es cuantificada usando un contador gama;

x) el porcentaje de lisis específica se calcula para cada concentración de anticuerpo de acuerdo con la formula $(ER-MR)/(MR-SR) \times 100$, en donde ER es la radiactividad promedio cuantificada (ver punto ix anterior) para esa concentración de anticuerpo, MR es el promedio de radiactividad cuantificada (ver punto ix anterior) para los controles de MR (ver punto v anterior), y SR es la radiactividad promedio cuantificada (ver punto ix anterior) para los controles de SR (ver punto vi anterior);

4) "ADCC aumentada" se define como ya sea un aumento del porcentaje máximo de lisis específica observada dentro del rango de concentración de

anticuerpo probado anteriormente, y/o una reducción de concentración de anticuerpo requerida para alcanzar la mitad del porcentaje máximo de lisis específica observada dentro del rango de concentración de anticuerpo probado anteriormente. El aumento de ADCC es relativo a la ADCC, medida con el ensayo anterior, mediado por el mismo anticuerpo, producido por el mismo tipo de células huésped, usando los mismos métodos de producción, purificación, formulación y almacenamiento estándar, que son conocidos por los expertos en la técnica, pero que no han sido producidos por células huésped diseñadas para sobreexpresar GnTIII.

[0109] En un aspecto, la presente invención se relaciona con moléculas que se enlazan a antígeno que tienen la especificidad de enlace del anticuerpo B-Ly1 murino, y al descubrimiento que sus funciones efectoras pueden ser mejoradas mediante glicosilación alterada. En una realización, la molécula que se enlaza a antígeno es un anticuerpo quimérico. En una realización preferida, la invención está dirigida a un anticuerpo quimérico, o un fragmento del mismo, que comprende las CDRs mostradas en la Figura 7. Específicamente, en una realización preferida, la invención está dirigida a un polinucleótido aislado que comprende: (a) una secuencia seleccionada de un grupo que consiste de: SEQ ID NO.: 5, SEQ ID NO.: 6 y SEQ ID NO.: 7. (CDRs_{V_{H-1}}); y (b) una secuencia seleccionada del grupo que consiste de: SEQ ID NO.: 21, SEQ ID NO.: 22 y SEQ ID NO.: 23. (CDRs_{V_{H-2}}); y SEQ ID NO.: 24. En otra realización preferida, la invención está dirigida a un polinucleótido aislado que comprende SEQ ID NO.: 8, SEQ ID NO.: 9 y SEQ ID NO.: 10. (CDRs_{V_L}). En una realización, cualquiera de estos polinucleótidos codifican un polipéptido de fusión.

[0110] En otra realización, la molécula que se enlaza a antígeno comprende el dominio V_H del anticuerpo B-Ly1 murino mostrado en la Figura 1, o una variante del mismo; y un polipéptido de no murina. En otra realización preferida, la invención está dirigida a una molécula que se enlaza a antígeno que comprende el dominio V_L del anticuerpo B-Ly1 murino mostrado en la Figura 2, o una variante del mismo; y un polipéptido de no murina.

[0111] En otro aspecto, la invención está dirigida a una molécula que se enlaza a antígeno que comprende una o más CDRs truncadas de B-Ly-1.

Tales CDRs truncadas contendrán, como mínimo, los residuos de amino ácido determinantes de especificidad para la CDR dada. Por "residuo determinante de especificidad" se entiende aquellos residuos que están directamente involucrados en la interacción con el antígeno. En general, solo aproximadamente un quinto a un tercio de los residuos en una CDR dada participan en el enlace al antígeno. Los residuos determinantes de especificidad en una CDR particular pueden ser identificados mediante, por ejemplo, computación de contactos interatómicos de modelamiento tridimensional y determinación de la variabilidad de secuencia en una posición de residuo dada de acuerdo con los métodos descritos en Padlan *et al.*, *FASEB J.* 9 (1): 133-139 (1995), cuyos contenidos están incorporados aquí para referencia en su totalidad.

[0112] En consecuencia, la invención también está dirigida a un polinucleótido aislado que comprende al menos una región determinante de complementariedad del anticuerpo B-Ly1 murino, o una variante o forma truncada del mismo, que contiene al menos los residuos determinantes de especificidad para dicha región determinante de complementariedad, en donde dicho polinucleótido aislado codifica un polipéptido de fusión. Preferiblemente, tales polinucleótidos aislados codifican un polipéptido de fusión que es una molécula que se enlaza a antígeno. En una realización, el polinucleótido comprende tres regiones determinantes de complementariedad del anticuerpo B-Ly1 murino, o formas variantes o truncadas del mismo, que contienen al menos los residuos determinantes de especificidad para cada una de dichas regiones determinantes de complementariedad. En otra realización, el polinucleótido codifica la región variable entera de la cadena ligera o pesada de un anticuerpo quimérico (e. g., humanizado). La invención se dirige además a los polipéptidos codificados por tales polinucleótidos.

[0113] En otra realización, la invención está dirigida a una molécula que combina antígeno, que comprende al menos una región determinante de complementariedad del anticuerpo B-Ly1 murino, o una forma variante o truncada del mismo, que contiene al menos los residuos determinantes de especificidad para dicha región determinante de complementariedad, y que comprenden una secuencia derivada de un polipéptido heterólogo. En una realización, la molécula que se enlaza a antígeno comprende tres regiones

determinantes de complementariedad del anticuerpo B-Ly1 murino, o formas variantes o truncadas del mismo que contienen al menos los residuos determinantes de especificidad para cada una de las tres regiones determinantes de complementariedad. En otro aspecto, la molécula que se enlaza a antígeno comprende la región variable de una cadena ligera o pesada de anticuerpo. En una realización particularmente útil, la molécula que se enlaza a antígeno es un anticuerpo quimérico, e.g., humanizado. La invención también está dirigida a métodos para preparar tales moléculas que se enlazan a antígeno, y al uso de las mismas en el tratamiento de enfermedad, incluyendo linfomas de célula B.

[0114] Es conocido que varios mecanismos están involucrados en la eficacia terapéutica de los anticuerpos anti-CD20, incluyendo la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC), citotoxicidad dependiente de complemento (CDC), y la inducción de detención del crecimiento o apoptosis. Por ejemplo, la mayoría de evidencia experimental indica que el rituximab opera mediante mecanismos efectores convencionales medidor por ensayos CDC y ADCC. Igualmente, se ha mostrado que la resistencia de diferentes células de linfoma al rituximab in vivo es una función de su sensibilidad a CDC in vitro. En contraste, el modo de acción in vivo de otro anticuerpo que ha sido aprobado para uso terapéutico, B1, no requiere actividad de célula de complemento ni asesina natural (NK). En su lugar, la eficacia de B1 in vivo se debe a su habilidad para inducir apoptosis potente.

[0115] En general, los anticuerpos monoclonales anti-CD20 caen en dos categorías distintas basadas en su mecanismo de acción para erradicar las células de linfoma. Los anticuerpos anti-CD20 Tipo I utilizan principalmente complemento para asesinar células objetivo, mientras que los anticuerpos Tipo II operan mediante mecanismos diferentes, principalmente apoptosis. El Rituximab y 1F5 son ejemplos de anticuerpos anti-CD20 Tipo I, mientras que B1 es un ejemplo de un anticuerpo Tipo II. Ver, e.g., Cragg, M. S. y Glennie, M. J., *Blood* 103 (7): 2738-2743 (Abril 2004); Teeling, J. L. et al., *Blood* 104 (6): 1793-1800 (Septiembre 2004), cuyos contenidos totales están incorporados aquí para referencia.

[0116] La presente invención es la primera instancia conocida en la cual un anticuerpo anti-CD20 Tipo II ha sido diseñado para tener funciones

efectoras aumentadas tales como ADCC, mientras que retiene la habilidad de apoptosis potente. En consecuencia, la presente invención está dirigida a un anticuerpo anti-CD20 Tipo II diseñado, que tiene ADCC aumentada como resultado de dicho diseño y sin pérdida de habilidad sustancial para inducir apoptosis. En una realización, los anticuerpos anti-CD20 Tipo II han sido diseñados para tener un patrón alterado de glicosilación en la Región Fc. En una realización particular, la glicosilación alterada comprende un nivel aumentado de residuos complejos bisecados en la Región Fc. En otra realización particular, la glicosilación alterada comprende un nivel reducido de residuos de fucosa en la Región Fc. Ver Pub. De Sol. De Pat. U.S. No. 2004 0093621 a Shitara *et al.*, cuyos contenidos totales están incorporados aquí para referencia. En otra realización, los anticuerpos anti-CD20 Tipo II han sido sometidos a diseño de polipéptido como se enseña en la Pat. U.S. No. 6,737,056 a Presta o Pub. De Sol. De Pat. U.S. No. 2004 0185045 (Macrogenics) o Pub. Sol. Pat. U.S. No. 2004 0132101 (Xencor), cuyos contenidos totales están incorporados aquí para referencia. La invención se dirige además a métodos para preparar tales anticuerpos diseñados Tipo II y a los métodos para usar tales anticuerpos en el tratamiento de varios trastornos de célula B, incluyendo linfomas de célula B.

[0117] Los anticuerpos quiméricos de ratón/humano han sido descritos. Ver, por ejemplo, Morrison, S. L. et al., *PNAS* 11: 6851-6854 (Noviembre 1984); Publicación de Patente Europea No. 173494; Boulianna, G. L, at al., *Nature* 312: 642 (Diciembre 1984); Neubeiger, M. S. et al., *Nature* 314: 268 (Marzo 1985); Publicación de Patente Europea No. 125023; Tan et al., *J. Immunol.* 135: 8564 (Noviembre 1985); Sun, L. K et al., *Hybridoma* 5 (1): 517 (1986); Sahagan et al., *J. Immunol.* 137: 1066- 1074 (1986). Ver generalmente, Muron, *Nature* 312: 597 (Diciembre 1984); Dickson, *Genetic Engineering News* 5 (3) (Marzo 1985); Marx, *Science* 229: 455 (Agosto 1985); y Morrison, *Science* 229: 1202-1207 (Septiembre 1985). Robinson *et al.*, en el Número de Publicación PCT WO/88104936 describe un anticuerpo quimérico con una region constante humana y region variable murino, que tiene especificidad a un epítope de CD20; la porción murino del anticuerpo quimérico de las referencias Robinson se deriva del anticuerpo monoclonal de ratón 2H7 (gama 2b, kapa). Mientras que la referencia nota que el anticuerpo quimérico descrito es un "Candidato de copiado" para el tratamiento de trastornos de célula B, esta declaración puede ser vista como

no más que una sugerencia para los expertos en la técnica para determinar si esta sugerencia es precisa o no para este anticuerpo particular, particularmente porque la referencia carece de cualquier dato para soportar una aserción de efectividad terapéutica, y en forma importante, datos usando mamíferos de orden superior tales como primates o humanos.

[0118] Las metodologías para generar anticuerpos quiméricos están disponibles a los expertos en la técnica. Por ejemplo, las cadenas ligera y pesada se pueden expresar separadamente, usando, por ejemplo, cadena ligera de inmunoglobulina y cadenas pesadas de inmunoglobulina en plásmidos separados, o en un solo vector (e.g., policistrónico). Estas pueden ser entonces purificadas y ensambladas in vitro en anticuerpos completos; las metodologías para realizar talensamble han sido descritas. Ver, por ejemplo, Scharff, M., Harvey Lectures 69: 125 (1974). Los parámetros de reacción in vitro para la formación de anticuerpos IgG de cadenas ligera y pesada aisladas reducidas también han sido descritos. Ver, por ejemplo, Sears *et al.*, *Biochem.* 16 (9): 2016-25 (1977).

[0119] En una realización particularmente preferida, la ABM quimérica de la presente invención es un anticuerpo humanizado. Los métodos para humanizar anticuerpos no humanos son conocidos en la técnica. Por ejemplo, las ABMs humanizadas de la presente invención se pueden preparar de acuerdo con los métodos de la Pat. U.S. No. 5,225,539 a Winter, Pat. U.S. No. 6,180,370 a Queen *et al.*, o Pat. U.S. No. 6,632,927 a Adair *et al.*, cuyos contenidos enteros están incorporados aquí para referencia. Preferiblemente, un anticuerpo humanizado tiene uno o más residuos de amino ácido introducidos en este de una fuente que no es humana. Estos residuos de amino ácido no humanos son referidos usualmente como residuos "importados", que son tomados típicamente de un dominio variable "importado". La humanización puede realizarse esencialmente siguiendo el método de Winter y colaboradores (Jones *et al.*, *Nature*, 321: 522- 525 (1986); Riechmann *et al.*, *Nature*, 332: 323-327(1988); Verhoeyen *et al.*, *Science*, 239: 1534-1536(1988)), sustituyendo secuencias de región hipervariables para las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano. En consecuencia, tales anticuerpos "humanizados" son anticuerpos quiméricos (Pat. U.S. No. 4,816, 567) en donde sustancialmente menos de un dominio variable humano intacto ha sido sustituido por la

secuencia correspondiente de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados son típicamente anticuerpos humanos en los cuales algunos residuos de región hipervariable y posiblemente algunos residuos FR son sustituidos por residuos de sitios análogos en anticuerpos de roedor. Los anticuerpos anti-CD20 humanos sujetos comprenderán regiones constantes de inmunoglobulina humana.

[0120] La elección de dominios variables humanos, ligeros y pesados, a ser usados en la preparación de anticuerpos humanizados es muy importante para reducir la antigenicidad. De acuerdo con el llamado método de "mejor ajuste", la secuencia del dominio variable de un anticuerpo de roedor es seleccionada contra la librería entera de secuencias de dominio variable humanas conocidas. La secuencia humana que es la más cercana a la del roedor es entonces aceptada como la región de marco humana (FR) para el anticuerpo humanizado (Sims et al., *J. Immunol.*, 151: 2296 (1993); Chothia et al., *J Mol. Biol.*, 196: 901 (1987)). Otro método para seleccionar la secuencia de marco humana es comparar la secuencia de cada subregión individual del marco de roedor total (i.e., FR1, FR2, FR3, y FR4) o alguna combinación de las subregiones individuales (e.g., FR1 y FR2) contra una librería conocida de secuencia de región variable humana que corresponde a esa subregión de marco (e.g., determinada por la numeración Kabat), y escoger la secuencia humana para cada subregión o combinación que es la más cercana a la del roedor (Leung Publicación de Solicitud de Patente No. 2003/0040606^{a1}, publicada en 27 de Febrero de 2003). Otro método usa una región de marco particular derivada de la secuencia de consenso de todos los anticuerpos humanos de un subgrupo particular de cadenas ligera o pesada. El mismo marco se puede usar para varios anticuerpos humanizados diferentes (Carter et al., *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 89:4285 (1992)); Presta et al., *J. Immunol.*, 151:2623 (1993)).

[0121] Es además importante que los anticuerpos sean humanizados con retención de alta afinidad para el antígeno y otras propiedades biológicas favorables. Para alcanzar esta meta, de acuerdo con un método preferido, los anticuerpos humanizados se preparan mediante un proceso de análisis de secuencias parental y diferentes productos humanizados conceptuales usando modelos tridimensionales de las secuencias parental y humanizada. Los moldeos de inmunoglobulina tridimensionales están

comúnmente disponibles y son familiares a los expertos en la técnica. Están disponibles programas de computadora que ilustran y muestran estructuras conformacionales tridimensionales probables de secuencias de inmunoglobulina candidatas seleccionadas. La inspección de esas representaciones permite el análisis de el papel probable de los residuos en el funcionamiento de la secuencia de inmunoglobulina candidata, i.e., el análisis de residuos que influencia la habilidad de la inmunoglobulina candidata para enlazarse a su antígeno. De esta forma, los residuos FR pueden ser seleccionados y combinados a partir de secuencias de recipiente e importadas de forma que se logra la característica de anticuerpo deseada, tal como afinidad aumentada para antígeno(s) marcado(s). En general, los residuos de región hipervariable están directamente y más sustancialmente involucrados en la influencia de enlace de antígeno.

[0122] En otra realización, las moléculas que se enlazan a antígeno de la presente invención son diseñadas para tener afinidad de enlace mejorada de acuerdo con, por ejemplo, los métodos revelados en Pub. Sol. Pat. U.S. No. 2004/0132066 a Balint *et al.*, cuyos contenidos enteros están incorporados aquí para referencia.

[0123] En una realización, la molécula que se enlaza a antígeno de la presente invención está conjugada a una mitad adicional, tal como un radiomarcador o una toxina. Tales ABMs conugadas se pueden producir mediante métodos numerosos que son bien conocidos en la técnica.

[0124] Una variedad de radionúclidos son aplicables a la la presente invención y los expertos en la técnica están acreditados con la habilidad de determinar fácilmente cual radionúclido es el más apropiado bajo una variedad de circunstancias. Por ejemplo, ¹³¹yodo es un radionúclido usado para inmunoterapia marcada. Sin embargo, la utilidad clínica del ¹³¹yodo puede estar limitada por varios factores que incluyen: vida media física de ocho días; deshalogenación de anticuerpo yodinado tanto en la sangre y en los sitios de tumor; y características de emisión (eg, componente gama grande) que puede ser subóptimo para la deposición localizada de dosis en tumor. Con la llegada de agentes quelantes superiores, la oportunidad de adherir grupos quelantes metálicos a las proteínas ha aumentado las oportunidades de utilizar otros radionúclidos tales como ¹¹¹indio y ⁹⁰itrio. El

$^{90}\text{Itrio}$ provee varios beneficios para utilización en aplicaciones radioinmunoterapéuticas: la vida media de 64 horas del $^{90}\text{Itrio}$ es lo suficientemente larga para permitir la acumulación de anticuerpo por el tumor y, contrario al, $^{131}\text{Yodo}$, el $^{90}\text{Itrio}$ es un emisor beta puro de alta energía sin irradiación gama acompañante en su decaída, con un rango en tejido de 100 a 1000 diámetros de célula. Adicionalmente, la cantidad mínima de radiación penetrante permite la administración a un paciente externo de anticuerpos marcados con $^{90}\text{Itrio}$. Adicionalmente, la internalización de anticuerpo marcado no se requiere para la muerte de células, y la emisión local de radiación de ionización debe ser letal para células de tumor adyacentes que carecen de antígeno marcado.

[0125] Las dosis de tratamiento simple efectivas (i.e., cantidades terapéuticamente efectivas) de anticuerpos anti-CD20 marcados con $^{90}\text{Itrio}$ varían de entre aproximadamente 5 y aproximadamente 75 mCi, más preferiblemente entre aproximadamente 10 y aproximadamente 40 mCi. Las dosis de ablación diferente de médula de tratamiento simple efectivo de anticuerpos anti-CD20 marcados con $^{131}\text{Yodo}$ varía de entre aproximadamente 5 y aproximadamente 70 mCi, más preferiblemente entre aproximadamente 5 y aproximadamente 40 mCi. Las dosis ablativa de tratamiento simple efectivo (ie, puede requerir trasplante de médula espinal autólogo) de anticuerpos anti-CD20 marcados con $^{131}\text{Yodo}$ varía de entre aproximadamente 30 y aproximadamente 600 mCi, más preferiblemente entre aproximadamente 50 y menos de aproximadamente 500 mCi. En conjunción con un anticuerpo anti-CD20 quimérico, que pertenece a anticuerpos murino vis-à-vis de vida media más larga, las dosis ablativas diferentes de médula de tratamiento simple efectivo de anticuerpos anti-CD20 quiméricos marcados con $^{131}\text{Yodo}$ varía de entre aproximadamente 5 y aproximadamente 40mCi, más preferiblemente menos de aproximadamente 30 mCi. Los criterios de representación para, e.g., la etiqueta de $^{111}\text{Indio}$, son típicamente de menos de aproximadamente 5 mCi.

[0126] Con respecto a los anticuerpos anti-CD20 radiomarcados, también puede ocurrir terapia con estos usando un tratamiento de terapia simple o usando tratamientos múltiples. Debido al componente radionúclido, se prefiere que antes del tratamiento, las células de tallo periféricas ("PSC") o médula espinal ("BM") sean "recolectadas" para pacientes que

experimentan toxicidad de médula espinal de hueso potencialmente fatal producida por la radiación. BM y/o PSC son recolectadas usando técnicas estándar, y luego purgadas y congeladas para posible reinfusión. Adicionalmente, es lo más preferido que antes del tratamiento se conduzca un estudio de dosimetría de diagnóstico usando un anticuerpo marcado de diagnóstico (eg, usando "indio") en el paciente, cuyo propósito es asegurar que el anticuerpo marcado terapéuticamente (e.g, usando ⁹⁰Itrio) no se volverá innecesariamente "concentrado" en ningún órgano o tejido normal.

[0127] En una realización preferida, la presente invención está dirigida a un polinucleótido aislado que comprende una secuencia que codifica un polipéptido que tiene una secuencia de amino ácido como se muestra en la Tabla 3 siguiente. La invención se dirige además a un ácido nucleídco aislado que comprende una secuencia al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a una secuencia de nucleótido mostrada en la Tabla 2 siguiente. En otra realización, la invención está dirigida a un ácido nucleico aislado que comprende una secuencia que condifica un polipéptido que tiene una secuencia de amino ácido al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a una secuencia de amino ácido en la Tabla 3. La invención también abarca un ácido nucleico aislado que comprende una secuencia que condifica un polipéptido que tiene la secuencia de amino ácido de cualquiera de los constructos de la Tabla 3 con sustituciones de amino ácido conservadoras.

TABLA 2

CONSTRUCTO	SECUENCIA DE NUECLEOTIDO	SEC ID No
B-HH1	<u>CAGGTGCAATTGGTGCAGTCTGGCGCTGA</u> <u>AGTTAAGAAGCCTGGGAGTTCAGTGAAGGT</u> <u>CTCCTGCAAGGCTTCCGGATACACCTTCAG</u> <u>CTATTCTTGGATGAGCTGGGTGCGGCAGG</u> <u>CCCCTGGACAAGGGCTCGAGTGGATGGGA</u> <u>CGGATCTTTCCCGGCGATGGGGATACTGA</u> <u>CTACGCACAGAAATTCCAAGGAAGAGTCAC</u> <u>AATTACCGCCGACAAATCCACTAGCACAGC</u> <u>CTATATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGA</u> <u>GGACACGGCCGTGTATTACTGTGCAAGAAA</u> <u>TGTCTTTGATGGTTACTGGCTTGTTTACTGG</u>	29

	<u>GGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTC</u> <u>A</u>	
B-HH2	<u>CAGGTGCAATTGGTGCAGTCTGGCGCTGA</u> <u>AGTTAAGAAGCCTGGGAGTTCAGTGAAGGT</u> <u>CTCCTGCAAGGCTTCCGGATACGCCTTCAG</u> <u>CTATTCTTGGATGAACTGGGTGCGGCAGGC</u> <u>CCCTGGACAAGGGCTCGAGTGGATGGGAC</u> <u>GGATCTTTCCCGGCGATGGGGATACTGACT</u> <u>ACAATGGGAAATTCAAGGGCAGAGTCACAA</u> <u>TTACCGCCGACAAATCCACTAGCACAGCCT</u> <u>ATATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAG</u> <u>GACACGGCCGTGTATTACTGTGCAAGAAAT</u> <u>GTCTTTGATGGTTACTGGCTTGTTTACTGG</u> <u>GGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCT</u> <u>CCTCA</u>	31
B-HH3	<u>CAGGTGCAATTGGTGCAGTCTGGCGCTGA</u> <u>AGTTAAGAAGCCTGGGAGTTCAGTGAAGGT</u> <u>CTCCTGCAAGGCTTCCGGATACGCCTTCAG</u> <u>CTATTCTTGGATGAACTGGGTGCGGCAGGC</u> <u>CCCTGGACAAGGGCTCGAGTGGATGGGAC</u> <u>GGATCTTTCCCGGCGATGGGGATACTGACT</u> <u>ACAATGGGAAATTCAAGGGCAGAGTCACAA</u> <u>TTACCGCCGACAAATCCACTAGCACAGCCT</u> <u>ATATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAG</u> <u>GACACGGCCGTGTATCTGTGTGCAAGAAAT</u> <u>GTCTTTGATGGTTACTGGCTTGTTTACTGG</u> <u>GGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCT</u> <u>CCTCAGCTAGCACC</u>	33
B-HH4	<u>CAGGTGCAATTGGTGCAGTCTGGCGCTGA</u> <u>AGTTAAGAAGCCTGGAGCTTCAGTGAAGGT</u> <u>CTCCTGCAAGGTCTCCGGATACGCGTTCAG</u> <u>CTATTCTTGGATGAACTGGGTGCGGCAGGC</u> <u>CCCTGGACAAGGGCTCGAGTGGATGGGAC</u> <u>GGATCTTTCCCGGCGATGGGGATACTGACT</u> <u>ACAATGGGAAATTCAAGGGCAGAGTCACAA</u> <u>TTACCGCCGACAAATCCACTAGCACAGCCT</u> <u>ATATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAG</u> <u>GACACGGCCGTGTATTACTGTGCAAGAAAT</u> <u>GTCTTTGATGGTTACTGGCTTGTTTACTGG</u>	35

	<u>GGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCT</u> <u>CCTCA</u>	
B-HH5	<u>CAGGTGCAATTGGTGCAGTCTGGCGCTGA</u> <u>AGTTAAGAAGCCTGGGAGTTCAGTGAAGGT</u> <u>CTCCTGCAAGGCTTCCGGATACGCGTTCAG</u> <u>CTATTCTTGGATGAGCTGGGTGCGGCAGG</u> <u>CGCCTGGACAAGGGCTCGAGTGGATGGGA</u> <u>CGGATCTTTCCCGGCGATGGGGATACTGA</u> <u>CTACAATGGGAAATTCAAGGGCAGAGTCAC</u> <u>AATTACCGCCGACAAATCCACTAGCACAGC</u> <u>CTATATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGA</u> <u>GGACACGGCCGTGTATTACTGTGCAAGAAA</u> <u>TGTCTTTGATGGTTACTGGCTTGTTTACTGG</u> <u>GGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCT</u> <u>CCTCA</u>	37
B-HH6	<u>CAGGTGCAATTGGTGCAGTCTGGCGCTGA</u> <u>AGTTAAGAAGCCTGGGAGTTCAGTGAAGGT</u> <u>CTCCTGCAAGGCTTCCGGATACGCCTTCAG</u> <u>CTATTCTTGGATCAATTGGGTGCGGCAGGC</u> <u>GCCTGGACAAGGGCTCGAGTGGATGGGAC</u> <u>GGATCTTTCCCGGCGATGGGGATACTGACT</u> <u>ACAATGGGAAATTCAAGGGCAGAGTCACAA</u> <u>TTACCGCCGACAAATCCACTAGCACAGCCT</u> <u>ATATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAG</u> <u>GACACGGCCGTGTATTACTGTGCAAGAAAT</u> <u>GTCTTTGATGGTTACTGGCTTGTTTACTGG</u> <u>GGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCT</u> <u>CCTCA</u>	39
B-HH7	<u>CAGGTGCAATTGGTGCAGTCTGGCGCTGA</u> <u>AGTTAAGAAGCCTGGGAGTTCAGTGAAGGT</u> <u>CTCCTGCAAGGCTTCCGGATACGCCTTCAG</u> <u>CTATTCTTGGATCTCGTGGGTGCGGCAGGC</u> <u>GCCTGGACAAGGGCTCGAGTGGATGGGAC</u> <u>GGATCTTTCCCGGCGATGGGGATACTGACT</u> <u>ACAATGGGAAATTCAAGGGCAGAGTCACAA</u> <u>TTACCGCCGACAAATCCACTAGCACAGCCT</u> <u>ATATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAG</u> <u>GACACGGCCGTGTATTACTGTGCAAGAAAT</u> <u>GTCTTTGATGGTTACTGGCTTGTTTACTGG</u>	41

	<u>GGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTC</u> <u>A</u>	
B-HH8	<u>CAGGTGCAATTGGTGCAGTCTGGCGCTGA</u> <u>AGTTAAGAAGCCTGGCGCCTCAGTGAAGGT</u> <u>CTCCTGCAAGGCTTCCGGATACACCTTCAC</u> <u>ATACAGCTGGATGAACTGGGTGCGGCAGG</u> <u>CCCCTGGACAAGGGCTCGAGTGGATGGGA</u> <u>CGGATCTTTCCCGGCGATGGGGATACTGA</u> <u>CTACAATGGGAAATTCAAGGGCAGAGTCAC</u> <u>AATTACCGCCGACAAATCCACTAGCACAGC</u> <u>CTATATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGA</u> <u>GGACACGGCCGTGTATTACTGTGCAAGAAA</u> <u>TGTCTTTGATGGTTACTGGCTTGTTTACTGG</u> <u>GGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCT</u> <u>CCTCA</u>	43
B-HH9	<u>CAGGTGCAATTGGTGCAGTCTGGCGCTGA</u> <u>AGTTAAGAAGCCTGGCGCCTCAGTGAAGGT</u> <u>CTCCTGCAAGGCTTCCGGATACACCTTCAG</u> <u>CTATTCTTGGATGAACTGGGTGCGGCAGGC</u> <u>CCCTGGACAAGGGCTCGAGTGGATGGGAC</u> <u>GGATCTTTCCCGGCGATGGGGATACTGACT</u> <u>ACAATGGGAAATTCAAGGGCAGAGTCACAA</u> <u>TTACCGCCGACAAATCCACTAGCACAGCCT</u> <u>ATATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAG</u> <u>GACACGGCCGTGTATTACTGTGCAAGAAAT</u> <u>GTCTTTGATGGTTACTGGCTTGTTTACTGG</u> <u>GGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCT</u> <u>CCTCA</u>	45
B-HL1	<u>CAGGTGCAATTGGTGCAGTCTGGCGCTGA</u> <u>AGTTAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGG</u> <u>TCTCCTGCAAGGCTTCCGGATACACCTTCA</u> <u>CCTATTCTTGGATGCACTGGGTGCGGCAG</u> <u>GCCCCTGGACAAGGGCTCGAGTGGATGGG</u> <u>ACGGATCTTTCCCGGCGATGGGGATACTGA</u> <u>CTACGCACAGAAATTCCAAGGAAGAGTCAC</u> <u>AATGACACGGGACACGTCCACTTCCACCGT</u> <u>CTATATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGA</u> <u>GGACACGGCCGTGTATTACTGTGCAAGAAA</u> <u>TGTCTTTGATGGTTACTGGCTTGTTTACTGG</u>	47

	<u>GGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTC</u> <u>A</u>	
B-HL2	<u>GAGGTGCAATTGGTGCAGTCTGGCGCTGA</u> <u>AGTTAAGAAGCCTGGGGCCACCGTGAAGA</u> <u>TCTCCTGCAAGGTGTCCGGATACACCTTCA</u> <u>CCTATTCTTGGATGCACTGGGTGCAGCAGG</u> <u>CCCCTGGAAAGGGGCTCGAGTGGATGGGA</u> <u>CGGATCTTTCCCGGCGATGGGGATACTGA</u> <u>CTACGCAGAGAAATTCCAAGGAAGAGTCAC</u> <u>AATCACAGCCGACACGTCCACTGACACCGC</u> <u>CTATATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGA</u> <u>GGACACGGCCGTGTATTACTGTGCAACCAA</u> <u>TGTCTTTGATGGTTACTGGCTTGTTTACTGG</u> <u>GGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTC</u> <u>A</u>	49
B-HL3	<u>GAGGTGCAATTGGTGCAGTCTGGCGCTGA</u> <u>AGTTAAGAAGCCTGGGGCCACCGTGAAGA</u> <u>TCTCCTGCAAGGTGTCCGGATACACCTTCA</u> <u>CCTATTCTTGGATGAACTGGGTGCAGCAGG</u> <u>CCCCTGGAAAGGGGCTCGAGTGGATGGGA</u> <u>CGGATCTTTCCCGGCGATGGGGATACTGA</u> <u>CTACAATGGGAAATTCAAGGAAGAGTCAC</u> <u>AATCACAGCCGACACGTCCACTGACACCGC</u> <u>CTATATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGA</u> <u>GGACACGGCCGTGTATTACTGTGCAACCAA</u> <u>TGTCTTTGATGGTTACTGGCTTGTTTACTGG</u> <u>GGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTC</u> <u>A</u>	51
B-HL4	<u>CAGATGCAATTGGTGCAGTCTGGCGCTGAA</u> <u>GTTAAGAAGACCGGGAGTTCAGTGAAGGTC</u> <u>TCCTGCAAGGCTTCCGGATACACCTTCACC</u> <u>TATTCTTGGATGAGCTGGGTGCGGCAGGC</u> <u>CCCTGGACAAGGGGCTCGAGTGGATGGGAC</u> <u>GGATCTTTCCCGGCGATGGGGATACTGACT</u> <u>ACGCACAGAAATTCCAAGGAAGAGTCACAA</u> <u>TTACCGCCGACAAATCCACTAGCACAGCCT</u> <u>ATATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAG</u> <u>GACACGGCCGTGTATTACTGTGCAAGAAAT</u> <u>GTCTTTGATGGTTACTGGCTTGTTTACTGG</u>	53

	<u>GGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTC</u> <u>AGCTAGCACC</u>	
B-HL8	<u>GAAGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGAGGAGG</u> <u>CTTGGTCAAGCCTGGCGGGTCCCTGCGGC</u> <u>TCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACATTTA</u> <u>GCTATTCTTGGATGAACTGGGTGCGGCAG</u> <u>GCTCCTGGAAAGGGCCTCGAGTGGGTGGG</u> <u>ACGGATCTTTCCCGGCGATGGGGATACTGA</u> <u>CTACAATGGGAAATTCAAGGGCAGAGTCAC</u> <u>AATTACCGCCGACAAATCCACTAGCACAGC</u> <u>CTATATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGA</u> <u>GGACACGGCCGTGTATTACTGTGCAAGAAA</u> <u>TGTCTTTGATGGTTACTGGCTTGTTTACTGG</u> <u>GGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTC</u> A	55
B-HL10	<u>CGGAATTCGGCCCAACCGGTGGCCACCATG</u> <u>GACTGGACCTGGAGGATCCTCTTCTTGGTG</u> <u>GCAGCAGCCACAGGAGCCCACTCCGAAGT</u> <u>GCAGCTGGTGGAGTCTG</u> <u>GAGGAGGCTTGGTCAAGCCTGGCGGGTCC</u> <u>CTGCGGCTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTC</u> <u>GCATTCAGCTATTCTTGGATGAACTGGGTG</u> <u>CGGCAGGCTCCTGGAAA</u> <u>GGGCCTCGAGTGGGTGGGACGGATCTTTC</u> <u>CCGGCGATGGGGATACTGACTACAATGGG</u> <u>AAATTCAAGGGCAGAGTCACAATTACCGCC</u> <u>GACAAATCCACTAGCACAGCCTATATGGAG</u> <u>CTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGC</u> <u>CGTGTATTACTGTGCAAGAAATGTCTTTGAT</u> <u>GGTTACTGGCTTGTTTACTGGGGCCAGGGA</u> <u>ACCCTGGTCACCGTCTCCTCAGCTAGCGAA</u> <u>TTCTCGA</u>	57
B-HL11	<u>CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGAGGAGG</u> <u>CTTGGTCAAGCCTGGCGGGTCCCTGCGGC</u> <u>TCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACATTTA</u> <u>GCTATTCTTGGATGAACTGGGTGCGGCAG</u> <u>GCTCCTGGAAAGGGCCTCGAGTGGGTGGG</u> <u>ACGGATCTTTCCCGGCGATGGGGATACTGA</u> <u>CTACAATGGGAAATTCAAGGGCAGAGTCAC</u>	59

	<u>AATTACCGCCGACAAATCCACTAGCACAGC</u> <u>CTATATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGA</u> <u>GGACACGGCCGTGTATTACTGTGCAAGAAA</u> <u>TGTCTTTGATGGTTACTGGCTTGTTTACTGG</u> <u>GGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTC</u> <u>A</u>	
B-HL12	<u>CGGAATTCGGCCCACCGGTGGCCACCATG</u> <u>GACTGGACCTGGAGGATCCTCTTCTTGGTG</u> <u>GCAGCAGCCACAGGAGCTCACTCCGAAGT</u> <u>GCAGCTCGTGGAGTCTG</u> <u>GAGCAGGCTTGGTCAAGCCTGGCGGGTCC</u> <u>CTGCGGCTCTCCTGCGCAGCCTCTGGATTG</u> <u>ACATTTAGCTATTCTTGGATGAACTGGGTG</u> <u>CGGCAGGCTCCTGGAAAGGGCCTCGAGTG</u> <u>GGTGGGACGGATCTTTCCCGGCGATGGGG</u> <u>ATACTGACTACAATGGGAAATTCAAGGGCA</u> <u>GAGTCACAATTACCGCCGACAAATCCACTA</u> <u>GCACAGCCTATATGGAGCTGAGCAGCCTG</u> <u>AGATCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGT</u> <u>GCAAGAAATGTCTTTGATGGTTACTGGCTT</u> <u>GTTTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCAC</u> <u>CGTCTCCTCAGCTAGCGAATTCTCGA</u>	61
B-HL13	<u>CGGAATTCGGCCCACCGGTGGCCACCATG</u> <u>GACTGGACCTGGAGGATCCTCTTCTTGGTG</u> <u>GCAGCAGCCACAGGAGCTCACTCCGAAGT</u> <u>GCAGCTCGTCGAGTCTGGAGGAGGCGTGG</u> <u>TCAAGCCTGGCGGGTCCCTGCGGCTCTCC</u> <u>TGCGCAGCCTCTGGATTCACATTTAGCTAT</u> <u>TCTTGGATGAACTGGGTGCGGCAGGCTCC</u> <u>TGGA</u> <u>GGGCCTCGAGTGGGTGGGACGGATCTTTC</u> <u>CCGGCGATGGGGATACTGACTACAATGGG</u> <u>AAATTCAAGGGCAGAGTCACAATTACCGCC</u> <u>GACAAATCCACTAGCACAGCCTATATGGAG</u> <u>CTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGC</u> <u>CGTGTATTACTGTGCAAGAAATGTCTTTGAT</u> <u>GGTTACTGGCTTGTTTACTGGGGCCAGGGA</u> <u>ACCCTGGTCACCGTCTCCTCAGCTAGCGAA</u> <u>TTCTCGA</u>	63

B-HL14	<u>CGGAATTCGGCCCACCGGTGGCCACCATG</u> <u>GACTGGACCTGGAGGATCCTCTTCTTGGTG</u> <u>GCAGCAGCCACAGGAGCTCACTCCGAAGT</u> <u>GCAGCTGGTCGAGTCCG</u> <u>GAGGAGGCTTGAAGAAGCCTGGCGGGTCC</u> <u>CTGCGGCTCTCCTGCGCAGCCTCTGGATTG</u> <u>ACATTTAGCTATTCTTGGATGAACTGGGTG</u> <u>CGGCAGGCTCCTGGAAAGGGCCTCGAGTG</u> <u>GGTGGGACGGATCTTTCCCGGCGATGGGG</u> <u>ATACTGACTACAATGGGAAATTCAAGGGCA</u> <u>GAGTCACAATTACCGCCGACAAATCCACTA</u> <u>GCACAGCCTATATGGAGCTGAGCAGCCTG</u> <u>AGATCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGT</u> <u>GCAAGAAATGTCTTTGATGGTTACTGGCTT</u> <u>GTTTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCAC</u> <u>CGTCTCCTCAGCTAGCGAATTCTCGA</u>	65
B-HL15	<u>CGGAATTCGGCCCACCGGTGGCCACCATG</u> <u>GACTGGACCTGGAGGATCCTCTTCTTGGTG</u> <u>GCAGCAGCCACAGGAGCCCACTCCGAAGT</u> <u>GCAGCTGGTGGAGTCTG</u> <u>GAGGAGGCTTGGTCAAGCCTGGCTCTTCC</u> <u>CTGCGGCTCTCCTGCGCAGCCTCTGGATTG</u> <u>ACATTTAGCTATTCTTGGATGAACTGGGTG</u> <u>CGGCAGGCTCCTGGAAAGGGCCTCGAGTG</u> <u>GGTGGGACGGATCTTTCCCGGCGATGGGG</u> <u>ATACTGACTACAATGGGAAATTCAAGGGCA</u> <u>GAGTCACAATTACCGCCGACAAATCCACTA</u> <u>GCACAGCCTATATGGAGCTGAGCAGCCTG</u> <u>AGATCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGT</u> <u>GCAAGAAATGTCTTTGATGGTTACTGGCTT</u> <u>GTTTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCAC</u> <u>CGTCTCCTCAGCTAGCGAATTCTCGA</u>	67
B-HL16	<u>CGGAATTCGGCCCACCGGTGGCCACCATG</u> <u>GACTGGACCTGGAGGATCCTCTTCTTGGTG</u> <u>GCAGCAGCCACAGGAGCCCACTCCGAAGT</u> <u>GCAGCTGGTGGAGTCTGGAGGAGGCTTGG</u> <u>TCAAGCCTGGCGGGTCCCTGCGGGTCAGC</u> <u>TGCGCAGCCTCTGGATTCACATTTAGCTAT</u> <u>TCTTGGATGAACTGGGTGCGGCAGGCTCC</u>	69

	<u>TGAAA</u> <u>GGGCCTCGAGTGGGTGGGACGGATCTTTC</u> <u>CCGGCGATGGGGATACTGACTACAATGGG</u> <u>AAATTCAAGGGCAGAGTCACAATTACCGCC</u> <u>GACAAATCCACTAGCACAGCCTATATGGAG</u> <u>CTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGC</u> <u>CGTGTATTACTGTGCAAGAAATGTCTTTGAT</u> <u>GGTTACTGGCTTGTTTACTGGGGCCAGGGA</u> <u>ACCCTGGTCACCGTCTCCTCAGCTAGCGAA</u> <u>TTCTCGA</u>	
B-HL17	<u>CGGAATTCGGCCCACCGGTGGCCACCATG</u> <u>GACTGGACCTGGAGGATCCTCTTCTTGGTG</u> <u>GCAGCAGCCACAGGAGCCCACTCCGAAGT</u> <u>GCAGCTGGTGGAGTCTG</u> <u>GAGGAGGCTTGGTCAAGCCTGGCGGGTCC</u> <u>CTGCGGCTCTCCTGCGCAGCCTCTGGATTG</u> <u>ACATTTAGCTATTCTTGGATGAACTGGGTG</u> <u>CGGCAGGCTCCTGGAAAGGGCCTCGAGTG</u> <u>GGTGGGACGGATCTTCCCGGCGATGGGG</u> <u>ATACTGACTACAATGGGAAATCAAGGGCA</u> <u>GAGTCACAATTACCGCCGACAAATCCACTA</u> <u>GCACAGCCTATATGGAGCTGAGCAGCCTG</u> <u>AGATCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGT</u> <u>GCAAGAAATGTCTTTGATGGTTACTGGCTT</u> <u>GTTTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCAC</u> <u>CGTCTCCTCAGCTAGCGAATTCTCGA</u>	71
Secuencia de señal de V _H	<u>ATGGACTGGACCTGGAGGATCCTCTTCTTG</u> <u>GTGGCAGCAGCCACAGGAGCCCACTCC</u>	73
B-KV1	<u>GATATCGTGATGACCCAGACTCCACTCTCC</u> <u>CTGCCCGTCACCCCTGGAGAGCCCGCCAG</u> <u>CATTAGCTGCAGGTCTAGCAAGAGCCTCTT</u> <u>GCACAGCAATGGCATCACTTATTTGTATTG</u> <u>GTACCTGCAAAAGCCAGGGCAGTCTCCACA</u> <u>GCTCCTGATTTATCAAATGTCCAACCTTGTC</u> <u>TCTGGCGTCCCTGACCGGTTCTCCGGATCC</u> <u>GGGTCAGGCACTGATTTCACTGAAAATC</u> <u>AGCAGGGTGGAGGCTGAGGATGTTGGAGT</u> <u>TTATTACTGCGCTCAGAATCTAGAACTTCCT</u> <u>TACACCTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGA</u>	75

	<u>GATCAAACGTACGGTG</u>	
Secuencia de Señal de V _L	<u>ATGGACATGAGGGTCCCCGCTCAGCTCCT</u> <u>GGGCCTCCTGCTGCTCTGGTTCCCAGGTG</u> <u>CCAGGTGT</u>	77

TABLA 3

<u>CONSTRUCTO</u>	<u>SECUENCIA DE AMINOACIDO</u>	<u>SEC ID No</u>
B-HH1	<u>QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFS</u> <u>YSWMSWVRQAPGQGLEWMGRIFPGDGD</u> <u>YAKFKGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSED</u> <u>AVYYCARNVFDGYWLVYWGQGTL VTVSS</u>	<u>30</u>
B-HH2	<u>OVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYAFS</u> <u>YSWMNWVRQAPGQGLEWMGRIFPGDGD</u> <u>YNGKFKGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSED</u> <u>AVYYCARNVFDGYWLVYGGG TLVTVSS</u>	<u>32</u>
B-HH3	<u>QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYAFS</u> <u>YSVVMNWVRQAPGQGLEWMGRIFPGDGD</u> <u>DYNGKFKGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSE</u> <u>DTAVYLCARNVFDGYWLVYWGQGTLVTVSS</u>	<u>34</u>
B-HH4	<u>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSGYAFS</u> <u>YSWMNWVRQAPGQGLEWMGRIFPGDGD</u> <u>YNGKFKGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSED</u> <u>AVYYCARNVFDGYWLVYWGQGTLVTVSS</u>	<u>36</u>
B-HH5	<u>QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYAFS</u> <u>YSWMSWVRQAPGQGLEWMGRIFPGDGD</u> <u>YNGKFKGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSED</u> <u>AVYYCARNVFDGYWLVYWGOGTLVTVSS</u>	<u>38</u>
B-HH6	<u>QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYAFS</u> <u>YSWINWVRQAPGQGLEWMGRIFPGDGD</u> <u>YNGKFKGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSED</u> <u>TA VYYCARNVFDGYWLVYWGQGTLVTVSS</u>	<u>40</u>
B-HH7	<u>QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYAFS</u> <u>YSWISWVRQAPGQGLEWMGRIFPGDGD</u> <u>YNGKFKGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSED</u> <u>TA VYYCARNVFDGYWLVYWGQGTLVTVSS</u>	<u>42</u>
B-HH8	<u>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTY</u> <u>SWMNWVRQAPGQGLEWMGRIFPGDGD</u> <u>YNGKFKGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSED</u> <u>TA</u>	<u>44</u>

	<u>VYYCARNVFDGYWLVYWGQGLTVTVSS</u>	
B-HH9	<u>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFS</u> <u>YSWMNWVRQAPGQGLEWMGRIFPGDGD</u> <u>YNGKFKGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSED</u> <u>AVYYCARNVFDGYWLVYWGQGLTVTVSS</u>	<u>46</u>
B-HL1	<u>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTY</u> <u>SWMHWVROAPGQGLEWMGRIFPGDGD</u> <u>AQKFOGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSED</u> <u>AVYYCARNVFDGYWLVYWGQGLTVTVSS</u>	<u>48</u>
B-HL2	<u>ELVQSGAEVKKPGATVKISCKVSGYTFTYSW</u> <u>MHWVQQAPGKGLEWMGRIFPGDGD</u> <u>KFQGRVTITADTSTDTAYMELSSLRSED</u> <u>YCATNVFDGYWLVYWGQGLTVTVSS</u>	<u>50</u>
B-HL3	<u>EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSGYTFTY</u> <u>SWMNWVQQAPGKGLEWMGRIFPGDGD</u> <u>YNGKFKGRVTITADTSTDTAYMELSSLRSED</u> <u>TA VYYCATNVFDGYWLVYWGQGLTVTVSS</u>	<u>52</u>
B-HL4	<u>QMQLVQSGAEVKKTGSSVKVSCKASGYTFT</u> <u>YSWMSWVRQAPGQGLEWMGRIFPGDGD</u> <u>TDY YAQKFQGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSED</u> <u>TA AVYYCARNVFDGYWLVYWGQGLTVTVSS</u>	<u>54</u>
B-HL8	<u>EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSY</u> <u>SWMNWVRQAPGKGLEWVGRIFPGDGD</u> <u>TDY YNGKFKGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSED</u> <u>TA VYYCARNVFDGYWLVYWGQGLTVTVSS</u>	<u>56</u>
B-HL10	<u>EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFAFSY</u> <u>SWMNWVRQAPGKGLEWVGRIFPGDGD</u> <u>TDY YNGKFKGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSED</u> <u>TA VYYCARNVFDGYWLVYWGQGLTVTVSS</u>	<u>58</u>
B-HL11	<u>QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSY</u> <u>SWMNWVRQAPGKGLEWVGRIFPGDGD</u> <u>TDY YNGKFKGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSED</u> <u>TA VYYCARNVFDGYWLVYWGQGLTVTVSS</u>	<u>60</u>
B-HL12	<u>EVQLVESGAGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSY</u> <u>SWMNWVROAPGKGLEWMGRIFPGDGD</u> <u>TDY YNGKFKGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSED</u> <u>TA VYYCARNVFDGYWLVYWGQGLTVTVSS</u>	<u>62</u>
B-HL13	<u>EVQLVESGGGVKPGGSLRLSCAASGFTFSY</u> <u>SWMNWVROAPGKGLEWMGRIFPGDGD</u> <u>TDY</u>	<u>64</u>

	<u>NGKFKGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTA</u> <u>VYYCARNVFDGYWLVYWGGQGLVTVSS</u>	
B-HL14	<u>EVQLVESGGGLKPKGSSLRLSCAASGFTFSY</u> <u>SWMNWRQAPGKGLEWMGRIFPGDGDY</u> <u>NGKFKGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTA</u> <u>VYYCARNVFDGYWLVYWGGQGLVTVSS</u>	<u>66</u>
B-HL15	<u>EVQLVESGGGLVKPGSSLRLSCAASGFTFSY</u> <u>SWMNWRQAPGKGLEWMGRIFPGDGDY</u> <u>NGKFKGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTA</u> <u>VYYCARNVFDGYWLVYWGGQGLVTVSS</u>	<u>68</u>
B-HL16	<u>EVQLVESGGGLVKPGSLRVSCAASGFTFSY</u> <u>SWMNWRQAPGKGLEWMGRIFPGDGDY</u> <u>NGKFKGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTA</u> <u>VYYCARNVFDGYWLVYWGGQGLVTVSS</u>	<u>70</u>
B-HL17	<u>EVQLVESGGGLVKPGSSLRLSCAASGFTFSY</u> <u>SWMNWRQAPGKGLEWMGRIFPGDGDY</u> <u>NGKFKGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTA</u> <u>VYYCARNVFDGYWLVYWGGQGLVTVSS</u>	<u>72</u>
Secuencia de señal de V _H	<u>MDWTWRILFLVAAATGAHS</u>	<u>74</u>
B-KV1	<u>DIVMTQTPLSLPVTGPGEPAISCRSSKSLLS</u> <u>NGITYLYWYLQKPGQSPQLLIYOMSNLVSGV</u> <u>PDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCA</u> <u>ONLELPYTFGGGTKVEIKRTV</u>	<u>76</u>
Secuencia de señal de V _L	<u>MDMRVPAOLLGLLLWFPGARC</u>	<u>78</u>

[0128] En otra realización preferida, la presente invención está dirigida a un polinucleótido aislado que comprende una secuencia que codifica un polipéptido que tiene la secuencia de amino ácido mostrada en la FIG.1 o FIG. 2. La invención está dirigida además a un ácido nucleico aislado que comprende una secuencia al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% or 99% idéntica a la secuencia de nucleótido mostrada en la FIG. 5 o FIG. 6. En otra realización, la invención está dirigida a un ácido nucléico aislado que comprende una secuencia que codifica un polipéptido que tiene una secuencia de amino ácido al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a la secuencia de amino ácido de la FIG. 5 o FIG. 6. La invención también abarca un ácido nucleico que comprende una secuencia

que codifica un polipéptido que tiene la secuencia de amino ácido de cualquiera de la FIG. 1, FIG. 2, FIG. 5 o FIG. 6 con sustituciones de amino ácido conservadoras.

[0129] En otra realización, la presente invención está dirigida a un vector de expresión y/o una célula huésped que comprende uno o más polinucleótidos aislados de la presente invención.

[0130] Generalmente, se puede usar cualquier tipo de línea de célula cultivada para expresar la ABM de la presente invención. En una realización preferida, se usan células CHO, células BHK, células NSO, células SP2/0, células de mieloma YO, células de mieloma de ratón P3X63, células PER, células PER. C6 o células de hibridoma, otras células mamíferas, células de levadura, células de insecto, o células de planta como la línea de célula patrón para generar las células huésped diseñadas de la invención.

[0131] La eficacia terapéutica de las ABMs de la presente invención se puede mejorar produciéndolas en una célula huésped que expresa además un polinucleótido que codifica un polipéptido que tiene actividad GnTIII. En una realización preferida, el polipéptido que tiene actividad GnTIII es un polipéptido de fusión que comprende el dominio de localización Golgi de un polipéptido residente en Golgi. En otra realización preferida, la expresión de las ABMs de la presente invención en una célula huésped que expresa un polinucleótido que codifica un polipéptido que tiene actividad GnTIII produce ABMs con afinidad de enlace a Fc aumentada y función efectora aumentada. En consecuencia, en una realización, la presente invención está dirigida a una célula huésped que comprende (a) un ácido nucleico aislado que comprende una secuencia que codifica un polipéptido que tiene actividad GnTIII; y (b) un polinucleótido aislado que codifica una ABM de la presente invención, tal como un anticuerpo quimérico, primatizado o humanizado que se enlaza a CD20 humano. En una realización preferida, el polipéptido que tiene actividad GnTIII es un polipéptido de fusión que comprende el dominio catalítico de GnTIII, y el dominio de localización Golgi es el dominio de localización de manosidasa II. Los métodos para generar tales polipéptidos de fusión y usarlos para producir anticuerpos con funciones efectoras aumentadas se revelan en la Sol. De Pat. Provisional U.S. No. 60/495,142, cuyos contenidos totales están expresamente incorporados aquí para

referencia. En otra realización preferida, la ABM quimérica es un anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo, que tiene la especificidad de enlace del anticuerpo B-LY1 murino. En una realización particularmente preferida, el anticuerpo quimérico comprende un Fc humano. En otra realización preferida, el anticuerpo es primatizado o humanizado.

[0132] En una realización, uno o varios polinucleótidos que codifican una ABM de la presente invención se pueden expresar bajo el control de un promotor constitutivo o, alternativamente, de un sistema de expresión regulado. Sistemas de expresión regulada adecuados incluyen, pero no se limitan a, un sistema de expresión regulado por tetraciclina, un sistema de expresión inducible por ecdisona, un sistema de expresión de interruptor lac, un sistema de expresión inducible por glucocorticoide, un sistema promotor inducible por temperatura, y un sistema de expresión inducible por metal de metalotioneina. Si varios ácidos nucleicos diferentes que codifican una ABM de la presente invención están comprendidos dentro de un sistema de célula huésped, algunos de ellos pueden ser expresados bajo el control de un promotor constitutivo, mientras que otros son expresados bajo el control de un promotor regulado. El nivel máximo de expresión se considera ser el más alto posible de expresión de polipéptido estable que no tiene un efecto adverso significativo sobre la velocidad de crecimiento de célula, y será determinado usando experimentación de rutina. Los niveles de expresión se determinan mediante métodos generalmente conocidos en la técnica, incluyendo análisis de manchas al Occidente usando un anticuerpo específico para la ABM o un anticuerpo específico para una etiqueta de péptido fusionada a la ABM; y análisis de manchas al Norte. En una alternativa adicional, el polinucleótido puede estar operativamente unido a un gen reportero; los niveles de expresión de una ABM quimérica que tiene sustancialmente la misma especificidad de enlace del anticuerpo B-Ly1 murino, se determinan mediante la medida de una señal correlacionada con el nivel de expresión del gen reportero. El gen reportero puede ser transcrito junto con el(los) ácidos nucleico(s) que codifican dicho polipéptido de fusión como una molécula de RNA simple; sus secuencias de codificación respectivas pueden estar unidas ya sea mediante un sitio de entrada de ribosoma interno (IRES) o mediante un mejorador de traslación independiente de capuchón (CITE). El gen reportero puede ser trasladado junto con al menos un ácido nucleico que codifica una ABM quimérica que

tiene sustancialmente la misma especificidad de enlace del anticuerpo B-Ly1 murino de forma que se forma una cadena de polipéptido simple. Los ácidos nucleicos que codifican las AMBs de la presente invención pueden estar operativamente unidos al gen reportero bajo el control de un promotor simple, de forma que el ácido nucleico que codifica el polipéptido de fusión y el gen reportero son transcritos a una molécula de RNA que es alternativamente dividida en dos moléculas de RNA mensajeras (mRNA); una de las mRNAs resultantes es trasladada en dicha proteína reportera, y la otra es trasladada a dicho polipéptido de fusión.

[0133] Se pueden usar los métodos que son bien conocidos por los expertos en la técnica para construir vectores de expresión que contienen la secuencia de codificación de una ABM que tiene sustancialmente la misma especificidad de enlace del anticuerpo B-Ly1 murino junto con señales de control transcripcional/trasnacional apropiadas. Estos métodos incluyen técnicas de AND recombinante *in vitro*, técnicas sintéticas y recombinación *in vivo*/recombinación genética. Ver, por ejemplo, las técnicas descritas en Maniatis *et al.*, MOLECULAR CLONING A LABORATORY MANUAL, Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y. (1989) y Ausubel *et al.*, CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, Greene Publishing Associates y Wiley Interscience, N.Y (1989).

[0134] Se puede utilizar una variedad de sistemas de vector de expresión por huésped para expresar la secuencia de codificación de las ABMs de la presente invención. Preferiblemente, las células mamíferas son usadas como sistemas de célula huésped transfectadas con ADN de plásmido recombinante o vectores de expresión de ADN cósmido que contienen la secuencia de codificación de la proteína de interés y la secuencia de codificación del polipéptido de fusión. Lo más preferido, células CHO, células BHK, células NSO, células SP2/0, células de mieloma YO, células de mieloma P3X63 de ratón, células PER, células PER. C6 o células de hibridoma, otras células mamíferas, células de levadura, células de insecto, o células de planta se usan como sistema de célula huésped. Algunos ejemplos de sistemas de expresión y métodos de selección están descritos en las siguientes referencias, y las referencias de allí: Borth *et al.*, *Biotechnol. Bioen.* 71 (4): 266-73 (2000-2001), en Werner *et al.*, *Arzneimittelforschung/Drug Res.* 48 (8): 870-80(1998), en Andersen y

Krummen, *Curr. Op. Biotechnol.* 13: 117-123 (2002), en Chadd y Chamow, *Curr. Op. Biotechnol.* 12: 188-194 (2001), y en Giddings, *Curr. Op. Biotechnol.* 12: 450-454 (2001). En realizaciones alternas, se pueden contemplar sistemas de célula huésped eucariótica, incluyendo células de levadura transformadas con vectores de expresión de levadura recombinantes que contienen la secuencia de codificación de una ABM de la presente invención; sistemas de célula de insecto infectadas con vectores de expresión de virus recombinante (e. g. , baculovirus) que contienen la secuencia de codificación de una ABM quimérica que tiene sustancialmente la misma especificidad de enlace del anticuerpo B-Ly1 murino; sistemas de célula de planta infectados con vectores de expresión de virus recombinantes (e.g., virus de mosaico de coliflor, CaMV; virus de mosaico de tabaco, TMV) o transformados con vectores de expresión de plásmido recombinantes (e.g., plásmido Ti) que contienen la secuencia de codificación de la ABM de la invención; o sistemas de célula animal infectados con vectores de expresión de virus recombinantes (e.g., adenovirus, virus de vaccinia) que incluyen líneas de células diseñadas para contener múltiples copias de ADN que codifican una ABM quimérica que tiene sustancialmente la misma especificidad de enlace del anticuerpo B-Ly1 murino ya sea amplificado establemente (CHO/dhfr) o amplificado inestablemente en cromosomas dobles diminutos (e.g., líneas de célula murino). En una realización, el vector que comprende el(los) polinucleótido(s) que codifica(n) la ABM de la invención es policistrónico. También, en una realización la ABM discutida anteriormente es un anticuerpo o un fragmento del mismo. En una realización preferida, la ABM es un anticuerpo humanizado.

[0135] Para los métodos de esta invención, generalmente se prefiere la expresión estable a la expresión transitoria porque típicamente logra resultados más reproducibles y también es más dócil para producción a gran escala. En lugar de usar vectores de expresión que contienen orígenes virales de replicación, las células huésped pueden ser transformadas con los ácidos nucleicos codificadores respectivos controlados por los elementos de control de expresión apropiados (e.g., promotor, mejorador, secuencias, terminadores de transcripción, sitios de poliadenilación, etc.), y un marcador elegible. Siguiendo a la introducción de AND extraño, las células diseñadas se pueden dejar crecer por 1-2 días en un medio enriquecido, y luego son cambiados a un medio selectivo. El marcador elegible en el plásmido

recombinante confiere resistencia a la selección y permite la selección de células que tienen integrado establemente el plásmido en sus cromosomas y crecen para formar focos que a su vez pueden ser clonados y expandidos en líneas de célula.

[0136] Se puede usar un número de sistemas de selección, incluyendo, pero sin limitarse a, la timidina quinasa del virus de herpes simplex (Wigler *et al.*, *Cell* 11: 223 (1977)), genes hipoxantina-guanina fosforibosiltransferasa (Szybalska & Szybalski, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 48: 2026 (1962)), y adenina fosforibosiltransferasa (Lowy *et al.*, *Cell* 22: 817 (1980)), que se pueden emplear en células tk-, hgprt o aprt, respectivamente. También, la resistencia de antimetabolito se puede usar como la base de selección para genes dhfr, que confieren resistencia a metotrexato (Wigler *et al.*, *Natl. Acad. Sci. USA* 77: 3567 (1989); O'Hare *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78: 1527 (1981)); gpt, que confieren resistencia al ácido micofenólico (Mulligan & Berg, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78: 2072 (1981)); neo, que confieren resistencia al aminoglicósido G-418 (Colberre-Garapin *et al.*, *J. Mol. Biol.* 150: 1 (1981)); e hgro, que confieren resistencia a la higromicina (Santerre *et al.*, *Gene* 30: 147 (1984). Recientemente, genes elegibles adicionales han sido descritos, a saber trpB, que permite a las células usar indol en lugar de triptofan; hisD, que permite a las células usar histinol en lugar de histidina (Hartman & Mulligan, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 8047(1988)); el sistema de glutamina sintasa; y ODC (ornitina descarboxilasa) que confiere resistencia al inhibidor de ornitina descarboxilasa, 2-(difluorometil)-DL-ornitina, DFMO (McConlogue, en: *Current Communications in Molecular Biology*, Cold Spring Harbor Laboratory ed. (1987)).

[0137] La presente invención está dirigida además a un método para modificar el perfil de glicosilación de las ABMs de la presente invención que son producidas por una célula huésped, que comprende la expresión en dicha célula huésped de un ácido nucleico que codifica una ABM de la invención y un ácido nucleico que codifica un polipéptido con actividad GnTIII, o un vector que comprende tales ácidos nucleicos. Preferiblemente, el polipéptido modificado es IgG o un fragmento del mismo que comprende la Región Fc. En una realización particularmente preferida, la ABM es un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo.

[0138] Las ABMs modificadas producidas por las células huésped de la invención exhiben afinidad de enlace al receptor Fc aumentada y/o función efectora aumentada como resultado de la modificación. En una realización particularmente preferida, la ABM es un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo que contiene la Región Fc. Preferiblemente, la afinidad aumentada de enlace al receptor Fc es enlace aumentado a un receptor que activa Fc γ , tal como el receptor Fc γ RIIIa receptor. La función efectora aumentada es preferiblemente un aumento en uno o más de las siguientes: citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo aumentada, fagocitosis celular dependiente de anticuerpo aumentada (ADCP), secreción de citocina aumentada, captación aumentada de antígeno mediada por complejo inmune por células que presentan antígeno, citotoxicidad celular mediada por Fc aumentada, enlace aumentado a células NK, enlace aumentado a macrófagos, enlace aumentado a células polimorfonucleares (PMNs), enlace aumentado a monocitos, entrecruzamiento aumentado de anticuerpos enlazados a objetivo, señalización directa aumentada que induce apoptosis, maduración de célula dendrítica aumentada, y copiado aumentado de célula T.

[0139] La presente invención también está dirigida a un método para producir una ABM de la presente invención, que tiene oligosacáridos modificados en una célula huésped que comprende (a) cultivar una célula huésped diseñada para expresar al menos un ácido nucleico que codifica un polipéptido que tiene actividad GnTIII bajo condiciones que permiten la producción de una ABM de acuerdo con la presente invención, en donde dicho polipéptido que tiene actividad GnTIII está expresado en una cantidad suficiente para modificar los oligosacáridos en la Región Fc de dicha ABM producida por dicha célula huésped; y (b) aislar dicha ABM. En una realización preferida, el polipéptido que tiene actividad GnTIII es un polipéptido de fusión que comprende el dominio catalítico de GnTIII. En una realización particularmente preferida, el polipéptido de fusión comprende además el dominio de localización Golgi de un polipéptido residente en Golgi.

[0140] Preferiblemente, el dominio de localización Golgi es el dominio de localización de manosidasa II o GnTI. Alternativamente, el dominio de

localización Golgi se selecciona del grupo que consiste de: el dominio de localización de manosidasa I, el dominio de localización de GnTII, y el dominio de localización de fucosiltransferasa de núcleo α 1-6. Las ABMs producidas por los métodos de la presente invención tienen afinidad de enlace al receptor Fc aumentada y/o función efectora aumentada. Preferiblemente, la función efectora aumentada es una o más de las siguientes: citotoxicidad celular mediada por Fc aumentada (incluyendo citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo aumentada), fagocitosis celular dependiente de anticuerpo aumentada (ADCP), secreción de citocina aumentada, captación de antígeno mediado por complejo inmune aumentada por células que presentan antígeno, enlace aumentado a células NK, enlace aumentado a macrófagos, enlace aumentado a monocitos, enlace aumentado a células polimorfonucleares, señalización directa aumentada que induce apoptosis, reticulación aumentada de anticuerpos enlazados a objetivo, maduración de célula dendrítica aumentada, o copiado aumentado de célula T. La afinidad de enlace al receptor Fc aumentado es preferiblemente enlace aumentado a los receptores que activan Fc tal como Fc γ RIIIa. En una realización particularmente preferida, la ABM es un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo.

[0141] En otra realización, la presente invención está dirigida a una ABM quimérica que tiene sustancialmente la misma especificidad de enlace del anticuerpo B-Ly1 murino producidos mediante los métodos de la invención que tiene una proporción aumentada de oligosacáridos bisecados en la Región Fc de dicho polipéptido. Se contempla que tal ABM abarque anticuerpos y fragmentos de los mismos que comprenden la Región Fc. En una realización preferida, la ABM es un anticuerpo humanizado. En una realización, el porcentaje de oligosacáridos bisecados en la Región Fc de la ABM es al menos 50%, más preferiblemente, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, o al menos 90%, y lo más preferido al menos 90-95% de los oligosacáridos totales. En ya otra realización, la ABM producida mediante los métodos de la invención tiene una proporción aumentada de oligosacáridos no fucosilados en la Región Fc como resultado de la modificación de sus oligosacáridos mediante los métodos de la presente invención. En una realización, el porcentaje de oligosacáridos no fucosilados es al menos 50%, preferiblemente, al menos 60% a 70%, lo más preferido al

menos 75%. Los oligosacáridos no fucosilados pueden ser tipo híbrido o complejo. En una realización particularmente preferida, la ABM producida por las células huésped y los métodos de la invención tiene una proporción aumentada de oligosacáridos bisecados, no fucosilados en la Región Fc. Los oligosacáridos bisecados, no fucosilados pueden ser híbridos o complejos. Específicamente, los métodos de la presente invención se pueden usar para producir ABMs en las cuales al menos 15%, más preferiblemente al menos 20%, más preferiblemente al menos 25%, más preferiblemente al menos 30%, más preferiblemente al menos 35% de los oligosacáridos en la Región Fc de la ABM son bisecados, no fucosilados. Los métodos de la presente invención también se pueden usar para producir polipéptidos en los cuales al menos 15%, más preferiblemente al menos 20%, más preferiblemente al menos 25%, más preferiblemente al menos 30%, más preferiblemente al menos 35% de los oligosacáridos en la Región Fc del polipéptido son bisecados híbridos no fucosilados.

[0142] En otra realización, la presente invención está dirigida a una ABM quimérica que tiene sustancialmente la misma especificidad de enlace al anticuerpo B-Ly1 murino diseñado para tener función efectora aumentada y/o afinidad de enlace al receptor Fc aumentada, producida mediante los métodos de la invención. Preferiblemente, la función efectora aumentada es una o más de las siguientes: citotoxicidad celular mediada por Fc aumentada (incluyendo citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo aumentada), fagocitosis celular dependiente de anticuerpo aumentada (ADCP), secreción de citocina aumentada, captación de antígeno mediado por complejo inmune aumentada por células que presentan antígeno, enlace aumentado a células NK, enlace aumentado a macrófagos, enlace aumentado a monocitos, enlace aumentado a células polimorfonucleares, señalización directa aumentada que induce apoptosis, reticulación aumentada de anticuerpos enlazados a objetivo, maduración de célula dendrítica aumentada, o copiado aumentado de célula T. En una realización preferida, la afinidad de enlace al receptor Fc aumentada es enlace aumentado a un receptor que activa Fc, el más preferido, FcγRIIIa. En una realización, la ABM es un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo que contiene la Región Fc, o una proteína de fusión que incluye una región equivalente a la Región Fc de una inmunoglobulina.

En una realización particularmente preferida, la ABM es un anticuerpo humanizado.

[0143] La presente invención está dirigida además a composiciones farmacéuticas que comprenden las ABMs de la presente invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

[0144] La presente invención está dirigida además al uso de tales composiciones farmacéuticas en el método de tratamiento del cáncer. Específicamente, la presente invención está dirigida a un método para el tratamiento del cáncer, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de la composición farmacéutica de la invención.

[0145] La presente invención provee además métodos para la generación y uso de sistemas de célula huésped para la producción de glicoformas de las ABMs de la presente invención, que tienen afinidad de enlace al receptor Fc aumentada, preferiblemente enlace aumentado a los receptores que activan Fc, y/o que tienen funciones efectoras aumentadas, incluyendo citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo. La metodología de glicodiseño que se puede usar con las ABMs de la presente invención han sido descritas en gran detalle en la Pat. U.S. No. 6,602,684 y la Solicitud de Patente U.S. Provisinal No. 60/441,307 y WO 2004/065540, cuyos contenidos totales de cada una están incorporados aquí para referencia en su totalidad. Las ABMs de la presente invención pueden alternativamente ser glicosideñadas para tener residuos de fucosa reducidos en la Región Fc de acuerdo con las técnicas reveladas en EP 1 176 195 A1, cuyos contenidos totales están incorporados aquí para referencia.

Generación de Líneas de Celula para la Producción de Proteínas con Patrón de Glicosilación Alterado

[0146] La presente invención provee sistemas de expresión de célula huésped para la generación de las ABMs de la presente invención, que tienen patrones de glicosilación modificados. En particular, la presente invención provee sistemas de célula huésped para la generación de glicoformas de las ABMs de la presente invención que tienen un valor terapéutico mejorado. Por lo tanto, la invención provee sistemas de

expresión de célula huésped seleccionados o diseñados para expresar un polipéptido que tiene actividad GnTIII. En una realización, el polipéptido que tiene actividad GnTIII es un polipéptido de fusión que comprende el dominio de localización Golgi de un polipéptido residente en Golgi heterólogo. Específicamente, tales sistemas de expresión de célula huésped pueden ser diseñados para comprender una molécula de ácido nucleico recombinante que codifica un polipéptido que tiene GnTIII, operativamente unida a un sistema promotor constitutivo o regulado.

[0147] En una realización específica, la presente invención provee una célula huésped que ha sido diseñada para expresar al menos un ácido nucleico que codifica un polipéptido de fusión que tiene actividad GnTIII, y que comprende el dominio de localización Golgi de un polipéptido residente en Golgi heterólogo. En un aspecto, la célula huésped es diseñada con una molécula de ácido nucleico que comprende al menos un gen que codifica un polipéptido de fusión que tiene actividad GnTIII y que comprende el dominio de localización Golgi de un polipéptido residente en Golgi heterólogo.

[0148] Generalmente, se puede usar cualquier tipo de línea de célula cultivada, incluyendo las líneas de célula discutidas anteriormente, como un patrón para diseñar las líneas de célula huésped de la presente invención. En una realización preferida, se usan células CHO, células BHK, células NSO, células SP2/0, células de mieloma YO, células de mieloma P3X63 de ratón, células PER, células PER.C6 o células de hibridoma, otras células mamíferas, células de levadura, células de insecto, o células de planta, como la línea de célula patrón para generar las células huésped diseñadas de la invención.

[0149] Se contempla que la invención abarque cualquier célula huésped diseñada que expresa un polipéptido que tiene actividad GnTIII, incluyendo un polipéptido de fusión que comprende el dominio de localización Golgi de un polipéptido residente en Golgi heterólogo como se definió aquí.

[0150] Uno o varios ácidos nucleicos que codifican un polipéptido que tiene actividad GnTIII se pueden expresar bajo el control de un promotor constitutivo o, alternativamente, un sistema de expresión regulado. Tales

sistemas son bien conocidos en la técnica, e incluyen los sistemas discutidos anteriormente. Si varios ácidos nucleicos diferentes que codifican polipéptidos de fusión que tienen actividad GnTIII y que comprenden el dominio de localización Golgi de un polipéptido residente en Golgi heterólogo, están comprendidos dentro de un sistema de célula huésped, algunos de ellos pueden ser expresados bajo el control de un promotor constitutivo, mientras que otros son expresados bajo el control de un promotor regulado. Los niveles de expresión de los polipéptidos de fusión que tienen actividad GnTIII son determinados mediante métodos generalmente conocidos en la técnica, incluyendo análisis de manchado al Occidente, análisis de manchas al Norte, análisis de expresión de gen reportero o medida de actividad GnTIII. Alternativamente, se puede emplear una lectina que se enlaza a productos biosintéticos de GnTIII, por ejemplo, lectina E4-PHA. Alternativamente, se puede usar un ensayo funcional que mide el enlace al receptor Fc aumentado o función efectora aumentada mediada por anticuerpos producidos por las células diseñadas con el ácido nucleico que codifican un polipéptido con actividad GnTIII.

Identificación de Transfectantes O Transformantes Que Expresan La Proteína Que Tiene Un Patrón de Glicosilación Modificado

[0151] Las células huésped que contienen la secuencia de codificación de una ABM quimérica que tienen sustancialmente la misma especificidad de enlace del anticuerpo B-Ly1 murino y que expresan los productos de gen biológicamente activos, pueden identificarse mediante al menos cuatro criterios generales; (a) hibridización ADN-ADN o ADN-RNA; (b) presencia o ausencia de funciones de gen "marcador"; (c) evaluación de el nivel de transcripción tal como se mide mediante la expresión de los respectivos transcritos de mRNA en la célula huésped; y (d) detección del producto de gen tal como se mide por medio de inmunoensayo o por su actividad biológica.

[0152] En el primer criterio, la presencia de la secuencia de codificación de una ABM quimérica que tiene sustancialmente la misma especificidad de enlace del anticuerpo B-Ly1 murino y la secuencia de codificación del polipéptido que tiene actividad GnTIII puede detectarse por medio de hibridización ADN-ADN o ADN-RNA utilizando pruebas que comprenden secuencias de nucleótidos que son homólogas a las secuencias

de codificación respectivas, respectivamente, o porciones o derivados de las mismas.

[0153] En el segundo criterio, la expresión recombinante del sistema vector/huésped puede identificarse y seleccionarse con base en la presencia o ausencia de ciertas funciones de gen "marcador" (e. g., actividad timidina quinasa, resistencia a antibióticos, resistencia a metotrexato, transformación de fenotipo, formación de cuerpo de oclusión en baculovirus, etc.). Por ejemplo, si la secuencia de codificación de la ABM de la invención, o un fragmento de la misma, y la secuencia de codificación del polipéptido que tiene actividad GnTIII se insertan dentro de una secuencia de gen marcador del vector, pueden identificarse los recombinantes que contienen la secuencias de codificación respectivas mediante la ausencia de la función del gen marcador. Alternativamente, un gen marcador puede colocarse en tándem con las secuencias de codificación bajo el control de promotor igual diferente utilizado para controlar la expresión de las secuencias de codificación. La expresión del marcador en respuesta a la inducción o selección indica la expresión de la secuencia de codificación de la ABM de la invención y la secuencia de codificación del polipéptido que tiene actividad GnTIII.

[0154] En el tercer criterio, la actividad transcripcional para la región codificante de la ABM de la invención, o un fragmento de la misma, y la secuencia de codificación del polipéptido que tiene actividad GnTIII puede evaluarse por medio de ensayos de hibridización. Por ejemplo, puede aislarse RNA y analizarse por medio de Northern blot (manchado hacia el Norte) utilizando una prueba homóloga a las secuencias de codificación de la ABM de la invención, o un fragmento de la misma, y la secuencia de codificación del polipéptido que tiene actividad GnTIII o porciones particulares del mismo. Alternativamente, pueden extraerse y ensayarse los ácidos nucleicos totales de la célula huésped para hibridización de tales pruebas.

[0155] En el cuarto criterio, la expresión de los productos de la proteína pueden evaluarse inmunológicamente, por ejemplo mediante Western blots (manchado hacia el Oeste), inmunoensayos tales como radioinmuno-precipitación, inmunoensayos unidos a enzima y similares. La

prueba final del éxito del sistema de expresión, sin embargo, involucra la detección de los productos de gen biológicamente activos.

Generación Y Uso de las ABMs Que Tienen Función Efectora Aumentada Incluyendo Citotoxicidad Celular Dependiente de Anticuerpo

[0156] En realizaciones preferidas, la presente invención proporciona glicomorfos de ABMs quiméricas que tienen sustancialmente la misma especificidad de enlace del anticuerpo B-Ly1 murino y que tienen función efectora aumentada que incluye citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo. El diseño de glicosilación de anticuerpos ha sido descrita previamente. Ver, por ejemplo, la Patente U. S. No. 6,602,684, incorporada aquí en su totalidad para referencia .

[0157] Recientemente los ensayos clínicos de anticuerpos monoclonales no conjugados (mAbs) para el tratamiento de algunos tipos de cáncer han producido resultados alentadores. Dillman, *Cancer Biother. & Radiopharm.* 12: 223-25 (1997); Deo *et al.*, *Immunology Today* 18:127 (1997). Se ha aprobado un IgG1 quimérico, no conjugado para el linfoma no Hodgkin de células B de grado inferior o folicular. Dillman, *Cancer Biother. & Radiopharm.* 12:223-25 (1997), mientras que otros mAb no conjugados, unos tumores de seno sólidos objetivo humanizados de IgG1, también han mostrado resultados promisorios en ensayos clínicos de fase III. Deo *et al.*, *Immunology Today* 18:127 (1997). Los antígenos de estos dos mAbs se expresan altamente en sus respectivas células tumorales y los anticuerpos median la destrucción potente del tumor por medio de células efectoras *in vitro* e *in vivo*. En contraste, muchos otros mAbs no conjugados con finas especificidades de tumor no pueden disparar funciones efectoras de potencia suficiente para ser clínicamente útiles. Frost *et al.*, *Cancer* 80:317-33 (1997); Surfus *et al.*, *J. Immunother.* 19:184-91 (1996). Actualmente se está probando terapia adjunta de citosina para algunos de estos mAbs más débiles. La adición de citosinas puede estimular la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC) por medio del incremento de la actividad y número de linfocitos circulantes. Frost *et al.*, *Cancer* 80: 317-33 (1997); Surfus *et al.*, *J. Immunother.* 19: 184-91 (1996). La ADCC, un ataque lítico sobre células de anticuerpo objetivo, se dispara por el enlace de receptores

de leucocitos a la región constante (Fc) de los anticuerpos. Deo *et al.*, *Immunology Today* 18: 127 (1997).

[0158] Un criterio diferente, pero complementario, para incrementar la actividad ADCC de IgG1s no conjugados es diseñar la región Fc del anticuerpo. Los estudios de diseño de proteína han mostrado que los FcγRs interactúan con la región eje inferior del dominio de IgG CH2. Lund *et al.*, *J. Immunol.* 157: 4963-69 (1996). Sin embargo, el enlace FcγR también requiere de la presencia de oligosacáridos unidos covalentemente al Asn 297 conservado en la región CH2. Lund *et al.*, *J. Immunol.* 157: 4963-69 (1996); Wright y Morrison, *Trends Biotech.* 15: 26-31 (1997), sugiriendo que tanto el oligosacárido y el polipéptido contribuyen ambos directamente al sitio de interacción o que se requiere del oligosacárido para mantener una conformación de polipéptido CH2 activa. La modificación de la estructura del oligosacárido puede, por lo tanto, explorarse como un medio para incrementar la afinidad de la interacción.

[0159] Una molécula de IgG porta dos oligosacáridos N-enlazados en su región Fc, uno sobre cada cadena pesada. Como cualquier glicoproteína, se produce un anticuerpo como una población de glicomorfos que comparten el mismo marco de polipéptido pero que tienen diferentes oligosacáridos unidos a los sitios de glicosilación. Los oligosacáridos normalmente encontrados en la región Fc de IgG de suero son de tipo complejo bi-antenario (Wormald *et al.*, *Biochemistry* 36: 130-38 (1997), con un bajo nivel de ácido siálico terminal y N-acetilglucosamina (GlcNAc) de bisección, y un grado variable de galactosilación terminal y fucosilación de núcleo. Algunos estudios sugieren que la estructura mínima de carbohidratos requerida para el enlace de FcγR yace dentro del núcleo de oligosacárido. Lund *et al.*, *J. Immunol.* 157: 4963-69 (1996).

[0160] Las líneas celulares derivadas de ratón o hámster utilizadas en la industria y la academia para la producción de mAbs terapéuticos no conjugados normalmente unen el oligosacárido requerido determinante para los sitios Fc. Los IgGs expresados en esas líneas celulares carecen, sin embargo, de la GlcNAc de bisección encontrada en bajas cantidades en IgGs de suero. Lifely *et al.*, *Glycobiology* 318: 813-22 (1995). En contraste,

se ha observado recientemente que un IgG1 producido de mieloma de rata, humanizado (CAMPATH-1H) portaba una GlcNAc de bisección en algunos de sus glicomorfos. Lively *et al.*, *Glycobiology* 318: 813-22 (1995). El anticuerpo derivado de célula de rata alcanzó una actividad ADCC in vitro máxima similar a la de los anticuerpos CAMPATH-1H producidos en líneas celulares estándar, pero en concentraciones significativamente inferiores de anticuerpo.

[0161] Normalmente el antígeno de CAMPATH está presente en altos niveles en células de linfoma, y este mAb quimérico tiene alta actividad ADCC en ausencia de una GlcNAc de bisección. Lively *et al.*, *Glycobiology* 318: 813-22 (1995). En la ruta de glicosilación N-enlazada, se adiciona una GlcNAc de bisección por GnTIII. Schachter, *Biochem. Cell Biol.* 64: 163-81 (1986).

[0162] Estudios previos utilizaron una línea celular CHO sencilla de producción de anticuerpo, que se diseñó previamente para expresar, de una manera regulada externamente, niveles diferentes de una enzima de GnT III clonado (Umana, P., *et al.*, *Nature Biotechnol.* 17: 176-180 (1999)). Esta aproximación estableció por primera vez una correlación rigurosa entre la expresión de GnTIII y la actividad ADCC del anticuerpo modificado. Por lo tanto, la invención contempla un anticuerpo recombinante, quimérico o un fragmento del mismo con la especificidad de enlace del anticuerpo B-Ly1 murina, que tiene una glicosilación alterada resultante de la actividad GnTIII aumentada. La actividad GnTIII aumentada resulta en un incremento en el porcentaje de oligosacáridos bisecados, así como también una disminución en el porcentaje de residuos de fucosa, en la región Fc del ABM. Este anticuerpo, o fragmento del mismo, tiene una afinidad de enlace al receptor Fc aumentada y una función efectora aumentada. Adicionalmente, la invención está dirigida a un fragmento de anticuerpo y proteínas de fusión que comprenden una región que es equivalente a la región Fc de las inmunoglobulinas.

Aplicaciones Terapéuticas de ABMs Producidas De Acuerdo con los Métodos de la invención.

[0163] Las ABMs de la presente pueden utilizarse solas para apuntar y matar células tumorales in vivo. Las ABMs pueden utilizarse además en conjunto con un agente terapéutico apropiado para tratar el carcinoma humano. Por ejemplo, las ABMs pueden utilizarse en combinación con métodos de tratamiento estándar o convencionales tales como quimioterapia, terapia de radiación o pueden conjugarse o unirse a un fármaco terapéutico, o toxina, así como también a una linfoquina o a un factor de crecimiento inhibidor de tumor, para liberar el agente terapéutico al sitio del carcinoma. Los conjugados de las ABMs de esta invención que son de primera importancia son (1) inmunotoxinas (conjugados de la ABM y una mitad citotóxica) y (2) ABMs marcadas (por ejemplo radiomarcado, marcaje con enzima, o fluorocromo-marcado) en los cuales el marcado proporciona medios para la identificación de complejos inmunes que incluyen la ABM marcada. Las ABMs también pueden utilizarse para inducir lisis a través del proceso complementario natural, y para interactuar con células citotóxicas dependientes de anticuerpo normalmente presentes.

[0164] La mitad citotóxica de la inmunotoxina puede ser un fármaco citotóxico o una toxina enzimáticamente activa de origen bacteriano o vegetal, o un fragmento enzimáticamente activo ("cadena A") de tal toxina. Toxinas enzimáticamente activas y fragmentos de las mismas utilizadas son la cadena A de difteria, fragmentos no de enlaces activos de la toxina de difteria, cadena A de exotoxina (de *Pseudomonas aeruginosa*), cadena A de ricina, cadena A de abrina, cadena A de modecina, alfa-sarcina, proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas de diantina, proteínas de *Phytolacca americana* (PAPI, PAPII, y PAP-S), inhibidor de momordica charantia, curcina, crotina, inhibidor de sapaonaria officinalis, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, y enomicina. En otra realización, las ABMs se conjugan con moléculas pequeñas de fármacos anticáncer. Los conjugados de la ABM y tales mitades citotóxicas se hacen utilizando una variedad de agentes de acoplamiento de proteína bifuncionales. Ejemplos de tales reactivos son SPDP, IT, derivados bifuncionales de imidoésteres tales como dimetil adipimidato HCl, ésteres activos tales como disuccinimidil suberato, aldehídos tales como glutaraldehído, compuestos bis-azido tales como bis (p-azidobenzoyl) hexandiamina, derivados de bis-diazonio tales como bis-(p-diazoniobenzoyl)-etilendiamina, diisocianatos tales como tolién 2,6-diisocianato, y compuestos de flúor bis-activos tales como 1,5-difluoro-2,4-

dinitrobenceno. Puede unirse la porción lisante de una toxina al fragmento Fab de los ABMs. Las toxinas adicionales apropiadas son conocidas en el estado de la técnica, tal como se evidencia en por ejemplo, la Solicitud de Patente U.S. No. 2002/0128448 publicada, aquí incorporada en su totalidad por referencia.

[0165] En una realización, se conjuga una ABM quimérica, glicodiseñada que tiene sustancialmente la misma especificidad de enlace del anticuerpo B-Ly1 murina, a una cadena A de ricina. Más ventajosamente, la cadena A de ricina es deglicosidada y producida a través de medios recombinantes. Se describe un método ventajoso para hacer la inmunotoxina ricina en Vitetta et al., *Science* 238, 1098 (1987), incorporada aquí por referencia.

[0166] Cuando se utilizan para matar células de cáncer humano in vitro para propósitos de diagnóstico, los conjugados se añadirán típicamente al medio de cultivo celular a una concentración de al menos aproximadamente 10 nM. La formulación y modo de administración para uso in vitro no son críticos. Normalmente se utilizarán formulaciones acuosas que sean compatibles con el medio de cultivo o perfusión. La citotoxicidad puede leerse por medio de técnicas convencionales para determinar la presencia o el grado de cáncer.

[0167] Tal como se discutió anteriormente, puede prepararse un radiofarmacéutico citotóxico para el tratamiento del cáncer mediante la conjugación de un isótopo radioactivo (por ejemplo, I, Y, Pr) a una ABM quimérica, glicodiseñada que tiene sustancialmente la misma especificidad de enlace del anticuerpo B-Ly1 murina. Se entiende que el término "mitad citotóxica" tal como se utiliza aquí incluye tales isótopos.

[0168] En otra realización, se llenan liposomas con un fármaco citotóxico y se recubren los liposomas con las ABMs de la presente invención. Debido a que existen muchas moléculas CD20 sobre la superficie de la célula B maligna, éste método permite la liberación de grandes cantidades de fármaco hacia el tipo celular correcto.

[0169] Las técnicas para la conjugación de tales agentes terapéuticos

a anticuerpos son bien conocidas (ver, por ejemplo, Arnon et al., "Monoclonal Antibodies for Immunotargeting of Drugs in Cancer Therapy", en *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Reisfeld et al. (eds.), pp. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom et al., "Antibodies For Drug Delivery", en *Controlled Drug Delivery* (2nd Ed.), Robinson et al. (eds.), pp. 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987) ; Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", in *Monoclonal Antibodies'84 : Biological And Clinical Applications*, Pinchera et al. (eds.), pp. 475-506(1985) ; y Thorpe et al., "The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates", *Immunol. Rev.*, 62:119-58 (1982)).

[0170] Aún otras aplicaciones terapéuticas para las ABMs de la invención incluyen la conjugación o unión, por ejemplo, mediante técnicas de ADN recombinante, a una enzima capaz de convertir un profármaco en un fármaco citotóxico y el uso de ese conjugado anticuerpo-enzima en combinación con el profármaco para convertir el profármaco a un agente citotóxico en el sitio del tumor (ver, por ejemplo, Senter et al., "Anti-Tumor Effects of Antibody-alkaline Phosphatase", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 4842-46 (1988); "Enhancement of the in vitro and in vivo Antitumor Activities of Phosphorylated Mitocycin C and Etoposide Derivatives by Monoclonal Antibody-Alkaline Phosphatase Conjugates", *Cancer Research* 49:5789-5792 (1989); y Senter, "Activation of Prodrugs by Antibody-Enzima Conjugates: A New Approach to Cancer Therapy," *FASEB J.* 4: 188-193 (1990)).

[0171] Aún otro uso terapéutico para las ABMs de la invención involucra el uso, bien sea no conjugado, en la presencia de complemento, o como parte de un conjugado anticuerpo-fármaco o anticuerpo-toxina, para remover células tumorales de la médula ósea de pacientes con cáncer. De acuerdo con esta aproximación, la médula ósea autóloga puede purgarse ex vivo mediante tratamiento con el anticuerpo y se infunde de vuelta la médula dentro del paciente [ver, por ejemplo, Ramsay et al., "Bone Marrow Purging Using Monoclonal Antibodies", *J. Clin. Immunol.*, 8 (2): 81-88 (1988)].

[0172] Adicionalmente, se contempla que la invención comprende una inmunotoxina de cadena sencilla que comprende dominios de enlace a antígeno que permiten sustancialmente la misma especificidad de enlace

que el anticuerpo B-Ly1 murino (por ejemplo, polipéptidos que comprenden las CDRs del anticuerpo B-Ly1 murino) y que comprenden adicionalmente un polipéptido de toxina. Las inmunotoxinas de cadena sencilla de la invención pueden utilizarse para tratar el carcinoma humano *in vivo*.

[0173] Similarmente, una proteína de fusión que comprende al menos la región de enlace a antígeno de una ABM de la invención unida a por lo menos una porción funcionalmente activa de una segunda proteína que tienen actividad anti-tumor, por ejemplo, una linfoquina u oncostatina, puede utilizarse para tratar el carcinoma humano *in vivo*.

[0174] La presente invención proporciona un método para matar selectivamente células de tumor que expresan CD20. Este método comprende la reacción del inmunoconjugado (por ejemplo, la inmunotoxina) de la invención con dichas células de tumor. Estas células de tumor pueden ser de un carcinoma humano.

[0175] Adicionalmente, esta invención proporciona un método de tratamiento de carcinomas (por ejemplo, carcinomas humanos) *in vivo*. Este método comprende la administración a un sujeto de una cantidad farmacéuticamente efectiva de una composición que contiene al menos uno de los inmunoconjugados (por ejemplo, la inmunotoxina) de la invención.

[0176] En un aspecto adicional, la invención está dirigida a un método mejorado para el tratamiento de trastornos proliferativos de célula B que incluyen el linfoma de célula B, así como también una enfermedad autoinmune producida en la totalidad o en parte por autoanticuerpos patogénicos, basada en el agotamiento de células B que comprende la administración de una cantidad terapéuticamente efectiva de una ABM de la presente invención a un sujeto humano en necesidad del mismos. En una realización preferida, la ABM es un anticuerpo anti-CD20 glicodiseñado con una especificidad de enlace sustancialmente igual a la del anticuerpo B-Ly1 murino. En otra realización preferida, el anticuerpo es humanizado. Ejemplos de enfermedades o trastornos autoinmunes incluyen, pero no están limitados a, trombocitopenias inmuno-mediadas, tales como púrpuras trombocitopénicas idiopáticas agudas y púrpuras trombocitopénicas

idiopáticas crónicas, dermatomiositis, corea de Sydenham, nefritis lupus, fiebre reumática, síndromes poliglandulares, púrpura de Henoch-Schonlein, nefritis pos-estreptocócica, eritema nodosum, arteritis de Takayasu, enfermedad de Addison, eritema multiforme, poliarteritis nodosa, espondilitis anquilosante, síndrome de Goodpasture, tromboangitis obliterans, cirrosis biliar primaria, tiroiditis de Hashimoto, tirotoxicosis, hepatitis activa crónica, polimiositis/dermatomiositis, policondritis, pénfigo vulgar, granulomatosis de Wegener, nefropatía membranosa, esclerosis lateral amiotrófica, tabes dorsalis, polimioglia, anemia perniciosa, glomerulonefritis rápidamente progresiva y alveolitis fibrosa, respuestas inflamatorias tales como enfermedades inflamatorias de la piel incluyendo soriasis y dermatitis (por ejemplo dermatitis atópica); escleroderma y esclerosis sistémicas; respuestas asociadas con la enfermedad inflamatoria del intestino (tales como la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerativa); síndrome de dolor respiratorio (incluyendo síndrome de dolor respiratorio adulto; ARDS); dermatitis; meningitis; encefalitis; uveítis; colitis; glomerulonefritis; condiciones alérgicas tales como eczema y asma y otras condiciones que involucran la infiltración de células T y respuestas inflamatorias crónicas; aterosclerosis; deficiencia de adhesión de leucocito; artritis reumatoidea; lupus eritematoso sistémico (SLE); diabetes mellitus (por ejemplo diabetes mellitus Tipo 1 o diabetes mellitus dependiente de insulina); esclerosis múltiple; síndrome de Reynaud; tiroiditis autoinmune; encefalomiелitis alérgica; síndrome de Sjögren; ataque juvenil de diabetes; y respuestas inmunes asociadas con hipersensibilidad aguda y retardada mediada por citosinas y linfocitos T encontrados típicamente en tuberculosis, sarcoidosis, polimiositis, granulomatosis y vasculitis; amenia perniciosa (enfermedad de Addison); enfermedades que involucran la diapedesis de leucocito; enfermedad inflamatoria del sistema nervioso central (CNS); síndrome de herida múltiple de órgano; anemia hemolítica (que incluye, pero no está limitada a crioglobulinemia o anemia positiva de Coombs); miastenia gravis; enfermedades mediadas por el complejo antígeno-anticuerpo; enfermedad de la membrana de basamento anti-glomerular; síndrome antifosfolípido; neuritis alérgica; enfermedad de Graves; síndrome miasténico de Lambert-Eaton; bulous penfigoide; pénfigo; poliendocrinopatías autoinmunes; enfermedad de Reiter; síndrome de hombre yerto; enfermedad de Behçet; arteritis de célula gigante; nefritis del complejo inmune; nefropatía IgA; polineuropatías de IgM; púrpura trombocitopénica inmune (ITP) o

trombocitopenia autoinmune etc. En este aspecto de la invención, los ABMs de la invención se utilizan para vaciar la sangre de las células B normales durante un periodo extendido.

[0177] De acuerdo con la práctica de esta invención, el sujeto puede ser un humano, equino, porcino, bovino, murino, canino, felino, y sujetos aviares. Otros animales de sangre caliente también están incluidos en esta invención.

[0178] La invención sujeto proporciona adicionalmente métodos para la inhibición del crecimiento de células tumorales humanas, tratamiento de un tumor en un sujeto, y tratamiento de una enfermedad tipo proliferativa en un sujeto. Estos métodos comprenden la administración al sujeto de una cantidad efectiva de la composición de la invención.

[0179] Es obvio, por lo tanto, que la presente invención abarca las composiciones, combinaciones y métodos farmacéuticos para el tratamiento de carcinomas humanos, tales como un linfoma de células B. Por ejemplo, la invención incluye composiciones farmacéuticas para uso en el tratamiento de carcinomas humanos que comprenden una cantidad farmacéuticamente efectiva de un anticuerpo de la presente invención y un portador farmacéuticamente aceptable.

[0180] Las composiciones de ABM de la invención pueden administrarse utilizando modos convencionales de administración que incluyen, pero no se limitan a, administración intravenosa, intraperitoneal, oral, intralinfática o directamente dentro del tumor. Se prefiere la administración intravenosa.

[0181] En un aspecto de la invención, las formulaciones terapéuticas que contienen las ABMs de la invención se preparan para almacenamiento por medio de la mezcla de un anticuerpo que tiene el grado deseado de pureza con portadores, excipientes o estabilizadores farmacéuticamente aceptables opcionales (Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)), en la forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. Portadores, excipientes o estabilizadores aceptables son no tóxicos para los receptores en las dosificaciones y concentraciones

empleadas, e incluyan soluciones amortiguadoras tales como fosfato, citrato, y otros ácidos orgánicos; antioxidantes que incluyen el ácido ascórbico y metionina; preservativos (tales como cloruro de octadecildimetilbencilamonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio; fenol, alcohol butílico o bencílico; alquil parabenos tales como metil o propil parabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 residuos); proteínas, tales como la albúmina de suero, gelatina, o inmunoglobulinas; polímeros hidrofílicos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina, o lisina; monosacáridos, disacáridos, y otros carbohidratos que incluyen glucosa, manosa, o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; azúcares tales como sucrosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contra-iones formadores de sal tales como sodio; complejos metálicos (por ejemplo, complejos Zn-proteína); y/o surfactantes no-iónicos tales como TWEENTM, PLURONICSTM o polietilenglicol (PEG).

[0182] Formulaciones ejemplares de ABM anti-CD20 se describen en WO98/56418, expresamente incorporada aquí por referencia. Esta publicación describe una formulación líquida multidosis que comprende 40 mg/mL de rituximab, acetato 25 mM, trehalosa 150 mM, 0.9% de alcohol bencílico, 0.02% de polisorbato 20 a pH 5.0 que tiene una vida media mínima de dos años de almacenamiento a 2-8° C. Otra formulación anti-CD20 de interés comprende 10 mg/mL de rituximab en 9.0 mg/mL de cloruro de sodio, 7.35 mg/mL de citrato de sodio dihidratado, 0.7 mg/mL de polisorbato 80, y Agua Estéril para Inyección, pH 6.5. En la presente invención, se sustituirá RITUXAN® por una ABM de la presente invención.

[0183] Las formulaciones liofilizadas adaptadas para administración subcutánea se describen en WO97/04801. Tales formulaciones liofilizadas pueden reconstituirse con un diluyente adecuado hasta una alta concentración de proteína y la formulación reconstituida puede administrarse subcutáneamente al mamífero a ser tratado aquí.

[0184] La formulación de aquí también puede contener más de un compuesto activo tal como sea necesario para la indicación particular que

esté siendo tratada, preferiblemente aquellos con actividades complementarias que no afecten adversamente el uno al otro. Por ejemplo, puede ser deseable proporcionar adicionalmente un agente citotóxico, un agente quimioterapéutico, citosina o agente inmunosupresor (por ejemplo uno que actúe sobre las células T, tal como ciclosporina o un anticuerpo que se enlace a las células T, por ejemplo, uno que se enlace a LFA-1). La cantidad efectiva de tales otros agentes depende de la cantidad de antagonista presente en la formulación, el tipo de enfermedad o desorden o tratamiento, y otros factores discutidos anteriormente. Estos se utilizan generalmente en las mismas dosificaciones y con rutas de administración tal como las usadas aquí anteriormente o aproximadamente de 1 a 99% de las dosificaciones hasta aquí empleadas.

[0185] Los ingredientes activos también pueden ser atrapados en microcápsulas preparadas, por ejemplo, por medio de técnicas de coacervación o mediante polimerización interfacial, por ejemplo, microcápsulas de hidroximetilcelulosa o gelatina y microcápsulas de poli-(metilmetacilato), respectivamente, en sistemas de liberación de fármacos coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nano-partículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Tales técnicas se revelan en Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980).

[0186] Pueden prepararse preparaciones de liberación sostenida. Ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrofóbicos sólidos que contienen el antagonista, matrices las cuales están en la forma de artículos formados, por ejemplo, películas, o microcápsulas. Ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli (2-hidroxietil-metacilato), o poli(vinilalcohol)), polilacturos (Pat. U. S. No. 3,773, 919), copolímeros de ácido L-glutámico y yetil-L-glutamato, etilen-vinil acetato no degradable, copolímeros de ácido láctico-ácido glicólico degradables tales como el LUPRON DEPOT™ (microesferas inyectables compuestas de copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuproluro), y ácido poli-D- (-)-3-hidroxibutírico.

[0187] Las formulaciones para ser utilizadas para administración in vivo deben ser estériles. Esto se consigue fácilmente mediante filtración a través de membranas de filtración estériles.

[0188] Las composiciones de la invención pueden estar en una variedad de formas de dosificación que incluyen, pero no están limitadas a, soluciones o suspensión líquidas, tabletas, píldoras, polvos, supositorios, microcápsulas o microvesículas poliméricas, liposomas, y soluciones inyectables o infusibles. La forma preferida dependerá del modo de administración y de la aplicación terapéutica.

[0189] Las composiciones de la invención también incluyen preferiblemente portadores y adyuvantes farmacéuticamente aceptables convencionales conocidos en el estado de la técnica tales como albúmina de suero humano, intercambiadores de iones, alúmina, lecitina, sustancias amortiguadoras tales como fosfatos, glicina, ácido sórbico, sorbato de potasio, y sales o electrolitos tales como sulfato de protamina.

[0190] El modo de administración y el régimen de dosificación más efectivos para las composiciones farmacéuticas de esta invención dependen de la severidad y curso de la enfermedad, la salud del paciente y la respuesta al tratamiento y el juicio del médico tratante. De acuerdo con lo anterior, las dosificaciones de las composiciones pueden ser tituladas para el paciente individual. Sin embargo, una dosis efectiva de las composiciones de esta invención generalmente estará en el rango de desde aproximadamente 0.01 hasta aproximadamente 2000 mg/kg.

[0191] Las moléculas aquí descritas pueden estar en una variedad de formas de dosificación las cuales incluyen, pero no están limitadas a, soluciones o suspensiones líquidas, tabletas, píldoras, polvos, supositorios, microcápsulas o microvesículas poliméricas, liposomas, y soluciones inyectables o infusibles. La forma preferida dependerá del modo de administración y de la aplicación terapéutica.

[0192] La composición que comprende una ABM de la presente invención se formulará, dosificará, y administrará en una manera consistente

con la buena práctica médica. Los factores de consideración en este contexto incluyen la enfermedad o desorden particular que esté siendo tratado, el mamífero particular que esté siendo tratado, la condición clínica del paciente individual, la causa de la enfermedad o desorden, el sitio de liberación del agente, el método de administración, el horario de administración, y otros factores conocidos para los practicantes médicos. La cantidad terapéuticamente efectiva del antagonista a ser administrado estará gobernada por tales consideraciones.

[0193] Como una propuesta general, la cantidad terapéuticamente efectiva del anticuerpo administrado parenteralmente por dosis estará en el rango de aproximadamente 0.1 a 20 mg/kg de peso corporal del paciente por día, estando el rango típico inicial de antagonista utilizado en el rango de aproximadamente 2 a 10 mg/kg.

[0194] En una realización preferida, la ABM es un anticuerpo, preferiblemente un anticuerpo humanizado. Dosis adecuadas para tal anticuerpo no conjugado están, por ejemplo, en el rango de aproximadamente 20 mg/m² a aproximadamente 1000 mg/m². En una realización, la dosificación del anticuerpo difiere de la actualmente recomendada para RITUXANO®. Por ejemplo, uno puede administrar al paciente una o más dosis de sustancialmente menos de 375 mg/m² del anticuerpo, por ejemplo, donde la dosis esté en el rango de aproximadamente 20 mg/m² a aproximadamente 250 mg/m², por ejemplo desde aproximadamente 50 mg/m² a aproximadamente 200 mg/m².

[0195] Más aún, uno puede administrar una o más dosis inicial(es) del anticuerpo seguida por una o más dosis subsecuente(s), en donde la dosis de mg/m² del anticuerpo en la dosis subsecuente(s) excede la dosis de mg/m² del anticuerpo en la dosis inicial(es). Por ejemplo, la dosis inicial puede estar en el rango de aproximadamente 20 mg/m² a aproximadamente 250 mg/m² (por ejemplo, desde aproximadamente 50 mg/m² hasta aproximadamente 200 mg/m²) y la dosis subsecuente puede estar en el rango de aproximadamente 250 mg/m² hasta aproximadamente 1000 mg/m².

[0196] Tal como se anotó anteriormente, sin embargo, estas

cantidades sugeridas de ABM están sujetas a una gran cantidad de discreción terapéutica. El factor clave en la selección de una dosis y horario apropiados es el resultado obtenido, tal como se indicó anteriormente. Por ejemplo, dosis relativamente más altas pueden necesitarse inicialmente para el tratamiento de enfermedades continuadas y agudas. Para obtener los resultados más eficaces, dependiendo de la enfermedad o desorden, el antagonista se administra tan cerca como sea posible de la primera señal, diagnóstico, aparición, u ocurrencia de la enfermedad o desorden o durante las remisiones de la enfermedad o desorden.

[0197] La ABM de la presente invención se administra por medio de cualquier medio adecuado, incluyendo administración parenteral, subcutánea, intraperitoneal, intrapulmonar, e intranasal, y, si se desea para tratamiento local inmunosupresor, intralesional. Las infusiones parenterales incluyen la administración intramuscular, intravenosa, intraarterial, intraperitoneal, o subcutánea. Adicionalmente, el antagonista puede administrarse adecuadamente por medio de infusión de pulso, por ejemplo, con dosis declinantes del antagonista. La dosificación se da preferiblemente por medio de inyecciones, más preferiblemente inyecciones intravenosas o subcutáneas, dependiendo en parte de si la administración es breve o crónica.

[0198] Uno puede administrar otros compuestos, tales como agentes citotóxicos, agentes quimioterapéuticos, agentes inmunosupresores y/o citosinas con los antagonistas de aquí. La administración combinada incluye la coadministración, utilizando formulaciones separadas o una formulación farmacéutica sencilla, y la administración consecutiva en cualquier orden, en donde existe preferiblemente un periodo de tiempo mientras ambos (o todos) los agentes activos ejercen simultáneamente sus actividades biológicas.

[0199] Será claro que la dosis requerida de la composición de la invención para alcanzar curas puede reducirse adicionalmente con la optimización del horario.

[0200] De acuerdo con la práctica de la invención, el portador farmacéutico puede ser un portador lipido. El portador lipido puede ser un

fosfolípido. Adicionalmente, el portador lípido puede ser un ácido graso. Además, el portador lípido puede ser un detergente. Tal como se utiliza aquí, un detergente es cualquier sustancia que altera la tensión superficial de un líquido, generalmente bajándola.

[0201] En un ejemplo de la invención, el detergente puede ser un detergente no iónico. Ejemplos de detergentes no iónicos incluyen, pero no están limitados a, polisorbato 80 (también conocido como Tween 80 o (polioxietilensorbitan monooleato), Brij, y Triton (por ejemplo Triton WR-1339 y Triton A-20).

[0202] Alternativamente, el detergente puede ser un detergente iónico. Un ejemplo de un detergente iónico incluye, pero no está limitado a, bromuro de alquiltrimetilamonio.

[0203] Adicionalmente, de acuerdo con la invención, el portador lípido puede ser un liposoma. Tal como se utilice en esta solicitud, un "liposoma" es cualquier vesícula unida a membrana que contiene cualquier molécula de la invención o combinaciones de las mismas.

[0204] Los ejemplos a continuación explican la invención en más detalle. Las siguientes preparaciones y ejemplos son proporcionados para facilitar a aquellos versados en la materia a entender más claramente y a practicar la presente invención. El alcance de la presente invención, sin embargo, no está limitado por las realizaciones ejemplificadas, las cuales se entienden como ilustraciones de aspectos sencillos de la invención únicamente, y los métodos que son funcionalmente equivalentes están dentro del alcance de la invención. Realmente, diversas modificaciones de la invención adicionalmente a aquellas aquí descritas serán aparentes para aquellos versados en la materia a partir de la descripción precedente y los dibujos acompañantes. Se entiende que tales modificaciones caen dentro del alcance de las reivindicaciones anexas.

EJEMPLOS

[NOTA: A menos que se especifique otra cosa, las referencias a la numeración de posiciones de residuo de aminoácidos específicos en los siguientes Ejemplos están de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat.]

EJEMPLO 1

Materiales y Métodos

Clonación y Expresión de Anticuerpo B-Ly1 Recombinante

[0205] Las células de hibridoma que expresan B-Ly1 crecieron en RPMI que contiene 10% de FBS y 4 mM de L-glutamina. Se cosecharon 6×10^6 células con una viabilidad > 90% y se aisló el RNA total utilizando un Qiagen RNAeasy midi kit. Los cADNs que codifican las cadenas pesadas y ligeras variables de B-Ly1 se amplificaron por medio de RT-PCR. Se realizó la reacción de RT-PCR utilizando las siguientes condiciones: 30 min 50° C para la primera síntesis de hebra de cADN; 15 min 95° C desnaturalización inicial; 30 ciclos de 1 min 94° C, 1 min 45° C, 1.5 min 72° C; y un paso de elongación final durante 10 min a 72° C. El tamaño esperado de los productos de la PCR se confirmó por medio de electroforesis en gel. Los productos de la PCR se clonaron dentro de vectores adecuados de E. coli y el secuenciamiento de ADN confirmó que se aislaron los genes que codifican la cadena ligera y pesada variable.

[0206] Para la construcción de los vectores de expresión quiméricos de B-Ly1, se fusionaron secuencias de señal sintética y sitios de restricción apropiados a las cadenas variables por medio de reacciones adicionales de PCR. Después de una confirmación final de la secuencia correcta de ADN de las cadenas variables, se combinaron con las regiones constantes de IgG1 humano correspondientes. Una vez se construyeron los genes, se clonaron bajo control del promotor MPSV y hacia arriba de un sitio sintético de poliA, utilizando dos vectores separados, uno para cada cadena,

resultando en los plásmidos pETRI 808 (vector de expresión de cadena pesada) y pETR1813 (vector de expresión de cadena ligera). Cada vector portaba una secuencia EBV OriP.

[0207] Se produjo B-Ly1 quimérico por medio de co-transfección de células HEK293-EBNA con vectores pETR1808 y pETR1813 utilizando una aproximación de transfección de fosfato de calcio. Creciendo exponencialmente las células HEK293-EBNA se transfectaron mediante el método de fosfato de calcio. Las células crecieron como cultivos de monocapa adherents en frascos T utilizando medio de cultivo DMEM complementado con FCS al 10%, y se transfectaron cuando estuvieron entre un 50 y 80% de confluencia. Para la transfección de un frasco T75, se sembraron 8 millones de células 24 horas antes de la transfección en 14 ml de medio de cultivo DMEM complementado con FCS (al 10% V/V final), 250, µg/ml de neomicina, y las células se colocaron a 37° C en un incubador con una atmósfera al 5% de CO₂ durante la noche. Para cada frasco T75 a ser transfectado, se prepare una solución de ADN, CaCl₂ y agua por medio de la mezcla de 47 µg del vector de ADN plásmido total dividido equitativamente entre los vectores de expresión de la cadena ligera y pesada, 235 µl de una solución 1M de CaCl₂, y adicionando agua hasta un volumen final de 469 µl. A esta solución, se adicionaron 469 µl de una solución de HEPES 50mM, NaCl 280 mM, Na₂HPO₄ 1.5 mM a pH 7.05, mezclados inmediatamente durante 10 seg y dejados a temperatura ambiente durante 20 seg. La suspensión se diluyó con 12 ml de DMEM complementado con FCS al 2%, y se añadió al T75 en lugar del medio existente. Las células se incubaron a 37° C, 5% CO₂ durante aproximadamente 17 a 20 horas, posteriormente se reemplazó el medio con 12 ml de DMEM, FCS al 10%. Para la producción de anticuerpo "chB-Ly1" no modificado, las células se transfectaron únicamente con vectores de expresión de anticuerpo pETR1808 y pETR1813 en una proporción 1:1. Para la producción del anticuerpo "chB-Ly1-ge" glicodiseñado, las células se co-transfectaron con cuatro plásmidos, dos para la expresión del anticuerpo (pETR1808 y pETR1813), uno para la expresión de un polipéptido GnTIII de fusión (pETR1519), y uno para la expresión de manosidasa II (pCLF9) en una proporción de 4:4:1:1, respectivamente. En el día 5 post-transfección, se cosechó el sobrenadante,

se centrifugó durante 5 min a 1200 rpm, seguido por una segunda centrifugación durante 10 min a 4000 rpm y se mantuvo a 4° C.

[0208] Se purificaron chB-Ly1 y chB-Ly1-ge a partir del sobrenadante del cultivo utilizando tres pasos cromatográficos secuenciales, cromatografía de Proteína A, cromatografía de intercambio catiónico, un paso de cromatografía por exclusión de tamaño sobre una columna Superdex 200 (Amersham Pharmacia) intercambiando la solución amortiguadora por una solución amortiguadora salina de fosfato y recolectando el pico del anticuerpo monomérico a partir de este último paso. Se estimó la concentración del anticuerpo utilizando un espectrofotómetro desde la absorbancia a 280 nm.

Análisis de Oligosacárido

[0209] Los oligosacáridos se liberaron enzimáticamente a partir de los anticuerpos mediante digestión de PNGasaF, con los anticuerpos siendo bien sea inmovilizados sobre una membrana PVDF o en solución.

[0210] La solución resultante digerida que contienen los oligosacáridos liberados se preparó bien sea directamente por análisis MALDI/TOF-MS o se digirió adicionalmente con EndoH glicosidasa antes de la preparación de la muestra para análisis MALDI/TOF-MS.

Método de liberación de oligosacárido para anticuerpos inmovilizados en membrana PVDF

[0211] Los pozos de una placa de 96 pozos hecha con una membrana de PVDF (Immobilon P, Millipore, Bedford, Massachusetts) se humedecieron con 100 µl de metanol y el líquido se dirigió a través de la membrana de PVDF utilizando vacío aplicado al Multitamiz de vacío múltiple (Millipore, Bedford, Massachusetts). Las membranas de PVDF se lavaron tres veces con 300 µl de agua. Los pozos se lavaron posteriormente con 50 µl de solución amortiguadora de RCM (Urea 8M, Tris 360 mM, EDTA 3.2mM, pH 8.6). Se cargaron entre 30-40 µg de anticuerpo en un pozo que contiene 10 µl de solución amortiguadora de RCM. Se dirigió el líquido en el pozo a

través de la membrana mediante la aplicación de vacío, y la membrana se lavó subsecuentemente dos veces con 50 µl de solución amortiguadora de RCM. La reducción de los puentes disulfuro se desarrolló mediante la adición de 50 µl de ditioneitol 0.1M en RCM e incubación a 37° C durante 1 h.

[0212] Después de la reducción, se aplicó vacío para remover la solución de ditioneitol del pozo. Los pozos se lavaron tres veces con 300 µl de agua antes de desarrollar la carboximetilación de los residuos de cisteína mediante la adición de 50 µl de ácido yodoacético 0.1M en solución amortiguadora de RCM e incubación a temperatura ambiente en la oscuridad durante 30 min.

[0213] Después de la carboximetilación, los pozos se aspiraron con vacío y se lavaron subsecuentemente tres veces con 300 µl de agua. La membrana PVDF se bloqueó posteriormente, para prevenir la adsorción de la endoglicosidasa, mediante la incubación de 100 µl de una solución acuosa al 1% de polivinilpirrolidona 360 a temperatura ambiente durante 1 hora. El reactivo de bloqueo se removió posteriormente mediante vacío suave seguido por tres lavados con 300 µl de agua.

[0214] Los oligosacáridos N-enlazados se liberaron mediante la adición de 2.5 mU de péptido-N-glicosidasa F (N-Glicanasa recombinante, GLYKO, Novato, CA) y 0.1 mU de Sialidasa (GLYKO, Novato, CA), para remover cualquier residuo potencial de monosacárido cargado, en un volumen final de 25 µl en NaHCO₃ 20mM, pH7.0). La digestión se desarrolló durante 3 horas a 37° C.

Método de liberación de oligosacárido para anticuerpos en solución

[0215] Se mezclaron entre 40 y 50 µg de anticuerpo con 2.5 mU de PNGasaF (Glyko, U.S.A.) en Tris 2 mM, pH 7.0 en un volumen final de 25 microlitros, y la mezcla se incubó durante 3 horas a 37° C.

Uso de digestión de Endoglicosidasa H de oligosacáridos PNGasaF-liberados para la asignación de estructuras de oligosacárido bisecado híbrido para picos de oligosacárido neutro MALDI/TOF-MS

[0216] Los oligosacáridos PNGasaF liberados se digirieron subsecuentemente con endoglicosidasa H (EC 3.2. 1.96). Para la digestión de EndoH, se añadieron 15 mU de EndoH (Roche, Suiza) a la digestión de PNGasaF (método anterior de anticuerpo en solución) para dar un volumen final de 30 microlitros, y la mezcla se incubó durante 3 horas a 37° C. La EndoH se divide entre los residuos de N-acetilglucosamina del núcleo quitobiosa de los oligosacáridos N-enlazados. La enzima únicamente puede digerir oligomanosa y la mayoría de glicanos de tipo híbrido, mientras que los oligosacáridos de tipo complejo no se hidrolizan.

Preparación de la muestra para MALDI/TOF-MS

[0217] Las digestiones enzimáticas que contienen los oligosacáridos liberados se incubaron durante 3 h adicionales al ambiente durante la adición de ácido acético hasta una concentración final de 150 mM, y se pasaron subsecuentemente a través de 0.6 ml de resina de intercambio catiónico (resina AG50W-X8, forma hidrógeno, malla 100-200, BioRad, Suiza) empacada dentro de una columna cromatográfica micro-bio-giro (BioRad, Suiza) para remover los cationes y proteínas. Se aplicó un microlitro de la muestra resultante a una placa objetivo de acero inoxidable, y se mezcló sobre la placa con 1 µl de matriz de sDHB. La matriz de sDHB se preparó disolviendo 2 mg de ácido 2,5-dihidroxibenzoico más 0.1 mg de ácido 5-metoxisalicílico en 1 ml de etanol/cloruro de sodio acuoso 10 mM 1:1 (v/v). Las muestras se secaron con aire, se aplicaron 0.2 µl de etanol, y se permitió finalmente que las muestras se re-cristalizaran bajo aire.

MALDI/TOF-MS

[0218] El espectrómetro de masas MALDI-TOF utilizado para adquirir los espectros de masas era un Voyager Elite (Perspective Biosystems). El instrumento se operó en la configuración lineal, con una aceleración de 20kV

y retraso de 80 ns. Se empleó la calibración externa utilizando estándares de oligosacárido para la asignación de masas de los iones. Los espectros de 200 disparos láser se sumaron para obtener el espectro final.

Depleción de células B en sangre entera

[0219] Se alicuotaron 495 μ l de sangre heparinizada a partir de un donador saludable en tubos de 5 ml de poliestireno, se añadieron únicamente 5 μ l de muestras de anticuerpo concentrado 100 veces (concentración final 1-1000 ng/ml) o PBS y los tubos se incubaron a 37°. Después de 24h se transfirieron 50 μ l de sangre a un tubo fresco y se tiñeron con anti-CD3-FITC, anti-CD19-PE y anti-CD45-CyChrome (Becton-Dickinson) durante 15 min a temperatura ambiente en la oscuridad. Antes del análisis, se añadieron 500 μ l de solución amortiguadora FACS (PBS que contiene FCS 2% y EDTA 5mM) a los tubos. La fluorescencia CD3-FITC y CD19-PE de las muestras de sangre se analizaron flujocitométricamente ajustando un umbral sobre CD45-CyChrome. La depleción de células B se determinó por medio de la graficación de la proporción de células CD19⁺B a células CD3⁺T.

Enlace de Anticuerpos anti-CD20 a Células Raji

[0220] Se transfirieron 500.000 en 180 μ l de solución amortiguadora FACS (PBS que contiene FCS 2% y EDTA 5mM) a tubos de 5 ml de poliestireno y se añadieron únicamente 20 μ l de muestras de anticuerpo anti-CD20 concentradas 10 veces (concentración final 1-5000 ng/ml) o PBS y se incubaron los tubos a 4° C durante 30 min. Subsecuentemente, las muestras se lavaron dos veces con solución amortiguadora FACS y se peletizaron a 300 x g durante 3min. El sobrenadante se aspiró y las células se recogieron en 100 μ l de solución amortiguadora FACS y se adicionó 1 μ l de fragmentos F(ab')₂-FITC anti-Fc-específico (Jackson Immune Research Laboratories, USA) y los tubos se incubaron a 4° C durante 30 min. Las muestras se lavaron dos veces con solución amortiguadora FACS y se recogieron en 500 μ l de solución amortiguadora FACS que contiene 0.5 μ g/ml de PI para análisis mediante Citometría de Flujo. El enlace se determinó por medio de la graficación de la media geométrica de la fluorescencia contra las concentraciones de anticuerpo.

EJEMPLO 2

Criterio de Aceptor de Alta Homología

[0221] Se desarrolló la búsqueda del marco aceptor de anticuerpo de alta homología mediante la alineación de la secuencia de proteína B-ly1 de ratón a una colección de secuencias humanas de línea germinal y seleccionando la secuencia humana que mostró la más alta identidad de secuencia. Aquí, la secuencia VH1_10 de la base de datos VBase se escogió como la secuencia de marco aceptor de cadena pesada, y se escogió que la secuencia VK240 fuera el marco aceptor para la cadena ligera. Sobre estos dos marcos aceptores, se injertaron las tres regiones determinantes de complementariedad (CDRs) de los dominios variables pesados y ligeros de ratón. Dado que la región 4 del marco no es parte de la región variable de la línea germinal del gen V, la alineación para esa posición se hizo individualmente. La región JH4 se escogió para la cadena pesada, y la región JK4 se escogió para la cadena ligera. El modelamiento molecular del dominio de inmunoglobulina diseñado reveló una mancha que requiere potencialmente de los residuos aminoácidos murino en lugar de los humanos fuera de la CDR. La re-introducción de los residuos aminoácidos murino dentro del marco humano podría generar las así denominadas mutaciones de vuelta. Por ejemplo, el residuo aminoácido del aceptor humano en la posición Kabat 27 mutó de vuelta a un residuo tirosina. Se designó que los variantes de anticuerpo humanizado bien sea incluyeran u omitieran las mutaciones de vuelta. La cadena ligera de anticuerpo humanizado no requiere de ninguna mutación de vuelta. Después de haber diseñado las secuencias de proteína, se sintetizaron las secuencias de ADN que codifican estas proteínas tal como se detalla a continuación.

Criterio del Marco Mezclado

[0222] Con el fin de evitar la introducción de mutaciones de vuelta en posiciones críticas de residuo de aminoácido (críticas para retener buena afinidad de enlace de antígeno o funciones del anticuerpo) del marco aceptor humano, se investigó si bien la región 1 de marco completa (FR1), o las regiones 1 (FR1) y 2 (FR2) de marco juntas, podrían ser reemplazadas por secuencias de anticuerpo humano que ya tuvieran residuos donadores, o

aquellos funcionalmente equivalentes, en aquellas posiciones importantes en la secuencia natural de línea germinal humana. Para este propósito, los marcos 1 y 2 VH de la secuencia Bly1 de ratón se alinearon individualmente para secuencias de línea germinal humana. Aquí, la más alta identidad de secuencia no era importante, y no se utilizó, para la elección de los marcos aceptores, sino que en su lugar se asumió que era más importante el emparejamiento de diversos residuos críticos. Aquellos residuos críticos comprenden los residuos 24, 71, y 94 (numeración Kabat), y también aquellos residuos en la posición 27, 28, y 30 (numeración Kabat), que yacen fuera de la definición de la CDR1 por Kabat, pero que a menudo están involucrados en el enlace de antígeno. Se escogió a la secuencia IMGT V_H_3_15 como la más adecuada. Después de haber diseñado las secuencias de proteína, se sintetizaron las secuencias de ADN que codifican estas proteínas tal como se detalla más abajo. Utilizando esta aproximación no se requirieron mutaciones de vuelta bien sea para la cadena ligera o pesada, con el fin de retener buenos niveles de enlace a antígeno.

Síntesis de los genes de anticuerpo

[0223] Después de haber diseñado la secuencia de aminoácido de la región de anticuerpo V humanizado, tiene que generarse la secuencia de ADN. Se encontraron los datos de la secuencia ADN de las regiones individuales de marco en la bases de datos para secuencias de línea germinal humana. La secuencia ADN de las regiones CDR se tomó de los datos correspondientes de cADN murino. Con estas secuencias, se ensambló virtualmente la secuencia ADN completa. Teniendo estos datos de la secuencia ADN, se introdujeron los diagnósticos de los sitios de restricción en la secuencia virtual, por medio de la introducción de las mutaciones silenciosas, creando sitios de reconocimiento para las endonucleasas de restricción. Para obtener la cadena física de ADN, se desarrolló la síntesis del gen (por ejemplo, Wheeler et al. 1995). En este método, los oligonucleótidos se diseñaron a partir de los genes de interés, de tal forma, que una serie de oligonucleótidos se deriva de la hebra codificante, y otra serie proviene de la hebra no codificante. Los extremos 3' y 5' de cada oligonucleótido (excepto el primero y el último en la fila) siempre muestran secuencias complementarias para dos promotores derivados de la hebra opuesta. Cuando se colocan estos oligonucleótidos dentro de una solución

amortiguadora de reacción adecuada para cualquier polimerasa estable al calor, y se adicionaron Mg^{2+} , dNTPs y una polimerasa ADN, cada oligonucleótido se extendió desde su extremo 3'. El extremo 3' nuevamente formado de un promotor se refuerza posteriormente con el siguiente promotor de la hebra opuesta, y extiende su secuencia adicionalmente bajo condiciones adecuadas para la elongación de la cadena de ADN dependiente del template. El producto final se clonó dentro de un vector convencional para propagación en *E. coli*.

Producción de anticuerpo

[0224] Se adicionaron secuencias líder de cadena pesada y ligera humanas (para secreción) hacia arriba de las secuencias de región variable anteriores y estas se unieron posteriormente hacia arriba de secuencias de cadena pesada y ligera constantes de IgG1 kappa humano, respectivamente, utilizando técnicas de biología molecular estándar. Las secuencias de ADN de cadena pesada y ligera de anticuerpo total resultantes se subclonaron dentro de vectores de expresión mamífera (uno para la cadena ligera y uno para la cadena pesada) bajo el control del promotor MPSV y hacia arriba de un sitio de poliA sintético, portando cada vector una secuencia EBV OriP, tal como se describió en el Ejemplo 1 anterior. Los anticuerpos se produjeron como se describió en el Ejemplo 1 anterior, especialmente por medio de co- transfección de HEK293-EBNA con los vectores de expresión de cadena pesada y ligera del anticuerpo mamífero, cosechando el medio de cultivo condicionado 5 a 7 días después de la transfección, y purificando los anticuerpos secretados mediante cromatografía de afinidad de Proteína A, seguida por cromatografía de intercambio catiónico y un paso cromatográfico final de exclusión por tamaño para aislar los anticuerpos IgG1 monoméricos puros. Los anticuerpos se formularon en una solución 25 mM de fosfato de potasio, 125 mM de cloruro de sodio, 100 mM de glicina de pH 6.7. Los variantes glicodiseñados de los variantes de anticuerpo humanizado se produjeron por medio de co- transfección de los vectores de expresión de anticuerpo junto con unos vectores de expresión de GnT-III glicosiltransferasa, o junto con un vector de expresión de GnT-111 más un vector de expresión de Golgi manosidasa II, tal como se describió para el anticuerpo quimérico en el Ejemplo 1 anterior. Los anticuerpos glicodiseñados se purificaron y formularon tal como se

describió anteriormente para los anticuerpos no glicodiseñados. Los oligosacáridos unidos a la región Fc de los anticuerpos se analizó por medio de MALDI/TOF-MS tal como se describe a continuación.

Análisis de oligosacárido

[0225] Método de liberación de oligosacárido para anticuerpos en solución

Se mezclaron entre 40 y 50 µg de anticuerpo con 2.5 mU de PNGasaF (Glyko, U.S.A.) en Tris 2 mM, pH 7.0 en un volumen final de 25 microlitros, y la mezcla se incubó durante 3 horas a 37° C.

Preparación de la muestra para MALDI/TOF-MS

[0226] Los digestos enzimáticos que contienen los oligosacáridos liberados se incubaron durante 3 h adicionales a temperatura ambiente después de la adición de ácido acético hasta una concentración final de 150 mM, y se pasaron subsecuentemente a través de 0.6 ml de resina de intercambio catiónico (resina AG50W-X8, forma hidrógeno, malla 100-200, BioRad, Suiza) empacada dentro de una columna de cromatografía micro-bio-spin (BioRad, Suiza) para remover los cationes y proteínas. Se aplicó un microlitro de la muestra resultante a una placa objetivo de acero inoxidable, y se mezcló sobre la placa con 1 µl de matriz de sDHB. La matriz de sDHB se preparó disolviendo 2 mg de ácido 2,5-dihidroxibenzoico más 0.1 mg de ácido 5-metoxisalicílico en 1 ml de etanol/cloruro de sodio acuoso 10 mM 1:1 (v/v). Las muestras se secaron con aire, se aplicaron 0.2 µl de etanol, y se permitió finalmente que las muestras se re-cristalizaran bajo aire.

MALDI/TOF-MS

[0227] El espectrómetro de masas MALDI-TOF utilizado para adquirir los espectros de masas era un Voyager Elite (Perspective Biosystems). El instrumento se operó en la configuración lineal, con una aceleración de 20kV y retraso de 80 ns. Se empleó la calibración externa utilizando estándares de

oligosacárido para la asignación de masas de los iones. Los espectros de 200 disparos láser se sumaron para obtener el espectro final.

Ensayo de Enlace a antígeno

[0228] Se evaluaron los variantes anticuerpo humanizado monomérico, purificadas para enlace a CD20 humano sobre células objetivo de linfoma de célula B de Raji utilizando un ensayo basado en citometría de flujo, tal como se describió para el anticuerpo quimérico B-ly1 en el Ejemplo 1 anterior.

Enlace de glicovariantes de IgG1 monomérico a células NK y a línea celular CHO que expresa Fc RIIIA

[0229] Se aislaron células NK humanas a partir de células mononucleares de sangre periférica recientemente aisladas (PBMC) aplicando un enriquecimiento de selección negativo para células CD16 y CD56 positivas (sistema MACS, Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach/Alemania). La pureza determinada mediante la expresión de CD56 estuvo entre 88-95%. Se incubaron células NK recientemente aisladas en PBS sin iones calcio y magnesio (3×10^5 células/ml) durante 20 minutos a 37°C para remover IgG asociado a célula NK cell. Las células se incubaron a 10^6 células/ml en diferentes concentraciones de anticuerpo anti-CD20 (0, 0.1, 0.3, 1, 3, 10 $\mu\text{g/ml}$) en PBS, BSA 0.1 %. Después de varios lavados se detectó el anticuerpo de enlace mediante la incubación con 1: 200 de FITC-conjugado F(ab')_2 cabra anti-humano, IgG F(ab')_2 específico (JacksonImmunoResearch, West Grove, PA/USA) y CD56-PE anti-humano (BD Biosciences, Allschwil/Suiza). Los fragmentos anti-Fc gamma RIIIA 3G8 F(ab')_2 (Ancell, Bayport, MN/USA) se adicionaron a una concentración de 10 $\mu\text{g/ml}$ hasta completar el enlace de los glicovariantes de anticuerpo (3 $\mu\text{g/ml}$). Se determinó la intensidad de fluorescencia referida a los variantes de anticuerpo unidos para células positivas CD56 en un FACSCalibur (BD Biosciences, Allschwil /Suiza). Las células CHO se transfectaron por medio de electroporación (280 V, 950 μF , 0.4 cm) con un vector de expresión codificante para la cadena α y la cadena γ de Fc gamma RIIIA-Val158. Los transfectantes se seleccionaron mediante la adición de 6 $\mu\text{g/ml}$ de

puromicina y los clones estables se analizaron por medio de FACS utilizando 10 μ l de anticuerpo monoclonal FITC-conjugado-anti-Fc γ RIII 3G8 (BD Biosciences, Allschwil/Suiza) para 10^6 células. El enlace de IgG1 a células CHO que expresan Fc γ RIIIA-V α 158 se desarrolló de manera análoga al enlace de célula NK descrito anteriormente.

Ensayo ADCC

[0230] Se utilizaron células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC) como células efectoras y se prepararon utilizando Histopaque-1077 (Sigma Diagnostics Inc., St. Louis, M063178 USA) y siguiendo esencialmente las instrucciones del fabricante. En breve, se tomó sangre venosa de voluntarios con jeringas heparinizadas. La sangre se diluyó 1:0.75-1.3 con PBS (que no contiene Ca^{++} or Mg^{++}) y se acodó sobre Histopaque-1077. El gradiente se centrifugó a 400 x g durante 30 min a temperatura ambiente (RT) sin freno. La interfase que contiene la PBMC se recolectó y se lavó con PBS (50 ml por células de dos gradientes) y se cosechó mediante centrifugación a 300 x g durante 10 minutos a RT. Después de la resuspensión del pellet con PBS, se contaron las PBMC y se lavaron una segunda vez mediante centrifugación a 200 x g durante 10 minutos a RT. Las células se resuspendieron posteriormente en el medio apropiado para los procedimientos subsecuentes.

[0231] La proporción de efector a objetivo utilizada para los ensayos de ADCC fue de 25:1 y 10:1 para PBMC y células NK, respectivamente. Las células efectoras se prepararon en medio AIM-V a la concentración apropiada con el fin de añadir 50 μ l por pozo de placas de 96 pozos de fondo redondo. Las células objetivo eran células de linfoma B humano (por ejemplo, células de Raji) que crecieron en DMEM que contiene FCS10%. Las células objetivo se lavaron en PBS, se contaron y se resuspendieron en AIM-V a 0.3 millones por ml con el fin de añadir 30'000 células en 100 μ l por micropozo. Los anticuerpos se diluyeron en AIM-V, añadido en 50 μ l a las células objetivo pre-plaqueadas y se permitió que se unieran a los objetivos durante 10 minutos a RT. Posteriormente se adicionaron las células efectoras y la placa se incubó durante 4 horas a 37° C en una atmósfera humectada que contiene CO_2 5%. Se evaluó la muerte de las células

objetivo mediante la medición de liberación de lactato deshidrogenasa (LDH) a partir de las células dañadas utilizando el kit de Detección de Citotoxicidad (Roche Diagnostics, Rotkreuz, Suiza). Después de la incubación de 4 horas se centrifugaron las placas a 800 x g. Se transfirieron 100 µl de sobrenadante de cada pozo a una nueva placa transparente de 96 pozos de fondo plano. Se adicionaron 100 µl de solución amortiguadora de sustrato de color del kit por pozo. Se determinaron los valores de Vmax de la reacción de color en un lector de ELISA a 490nm durante la menos 10 min utilizando un software SOFTmax PRO (Molecular Devices, Sunnyvale, CA94089, USA). Se midió la liberación espontánea de LDH a partir de los pozos que contienen únicamente células objetivo y efectoras pero no anticuerpos. Se determinó la liberación máxima de los pozos que contienen únicamente células objetivo y 1% de Triton X-100. Se calculó el porcentaje de muerte mediada por anticuerpo específico como sigue: $((x-SR)/(MR-SR)*100$, donde x es la media de Vmax a una concentración específica de anticuerpo, SR es la media de Vmax de la liberación espontánea y MR es la media de Vmax de la liberación máxima.

Ensayo de citotoxicidad dependiente de complemento

[0232] Se contaron células objetivo, se lavaron con PBS, se resuspendieron en AIM-V (Invitrogen) a 1 millón de células por ml. Se plaquearon 50 µl de células por pozo en una placa de 96 pozos de fondo plano. Se prepararon las diluciones de anticuerpo en AIM-V y se añadieron en 50 µl a las células. Se permitió que los anticuerpos se enlazaran a las células durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se descongeló recientemente complemento de suero humano (Quidel), se diluyó 3 veces con AIM-V y se añadió en 50 µl a los pozos. Se preparó complemento de conejo (Cedarlane Laboratories) tal como se describe por el fabricante, se diluyó 3 veces con AIM-V y se añadió en 50 µl a los pozos. Como un control, se calentaron fuentes de complemento durante 30 min a 56° C antes de la adición al ensayo.

Las placas de ensayo se incubaron durante 2h a 37° C. Se determinó la muerte de las células mediante la medición de la liberación de LDH. Brevemente, las placas se centrifugaron a 300 x g durante 3 min. Se transfirieron 50 µl de sobrenadante por pozo a una nueva placa de 96 pozos

y se adicionaron 50 μ l del reactivo de ensayo del Kit de Citotoxicidad (Roche). Una medida cinética con el lector de ELISA determinó la V_{max} correspondiente con la concentración de LDH en el sobrenadante. Se determinó la liberación máxima mediante la incubación de las células en presencia de 1% de Triton X-100.

Ensayo de depleción de célula B de sangre entera

[0233] El agotamiento de célula B normal en sangre entera por los anticuerpos anti-CD20 se llevó a cabo tal como se describió en el Ejemplo 1 anterior.

Ensayo de apoptosis

[0234] Se ensayó la potencia apoptótica de los anticuerpos mediante la incubación del anticuerpo a 10 μ g/ml (condiciones de saturación con respecto al antígeno de enlace) con las células objetivo (a una concentración de célula objetivo de 5×10^5 células/ml) durante la noche (16-24 h). Las muestras se tiñeron con AnnV-FITC y se analizaron mediante FACS. El ensayo se hizo por triplicado.

[0235] Se realiza la detección mediante citometría de flujo al seguir la aparición de marcadores apoptóticos como anexina V y fosfatidil serina. El control negativo (sin apoptosis inducida) no contenía ningún anticuerpo, sino únicamente solución salina amortiguada de fosfato. El control positivo (apoptosis máxima) contenía 5 micromolar del inductor fuerte de apoptosis Camptotecina (CPT).

Resultados y Discusión

[0236] La comparación de los variantes de anticuerpo B-HH1, B-HH2, B-HH3, del antígeno de enlace a CD20 humano, bien sea acoplados con la cadena ligera de B-ly1 quimérico (mVL, tal como se describió en el Ejemplo 1 anterior) o con la cadena ligera de B-ly1 (KV1) humanizado, y el anticuerpo chB-ly1 quimérico, de origen (descrito en el Ejemplo 1 anterior) mostró que todos los anticuerpos tienen un valor EC_{50} similar, pero el constructo B-HH1 se une con una intensidad/estequiometría inferior que los

variantes B-HH2 y B-HH3 (Figura 11). Puede distinguirse el B-HH1 del B-HH2 y B-HH3 por sus regiones CDR1 y CDR2 parcialmente humanas (definición de Kabat), así como también por el polimorfismo Ala/Thr en la posición 28 (numeración de Kabat). Esto indica que bien sea la posición 28, la CDR1 completa, y/o la CDR2 completa son importantes para la interacción anticuerpo/antígeno.

[0237] La comparación del B-HL1, B-HH1, y el anticuerpo quimérico chB-ly1 de origen indicó la ausencia de cualquier actividad de enlace en el constructo B-HL1, y aproximadamente la mitad de la intensidad/estequiometría de enlace del B-HH1 comparado con el B-ly1 (Figura 12). Tanto el B-HL1 así como también B-HH1 se diseñaron con base en marcos aceptores derivados de la clase del VH1 humano. Entre otras diferencias, la posición 71 (Numeración de Kabat; la posición 71 de Kabat corresponde a la posición 72 de SEQ ID NO:48) del constructo B-HL1 es una diferencia significativa, que indica su importancia putativa para antígeno de enlace.

[0238] Cuando se comparan los datos de enlace de antígeno de las Figuras 9 a 13, los variantes BHH2-KV1, BHL8-KV1, y BHL11-KV1 muestran la mejor afinidad de enlace, entre los diferentes variantes de anticuerpo humanizados evaluados, para CD20 humana sobre la superficie de células humanas. Las diferencias entre B-HH2, por un lado, y B-HL8 y B-HL11 por el otro se localizan únicamente en las regiones FR1 y FR2, siendo las tres CDRs idénticas (comparar, por ejemplo, SEQ ID NOs: 32, 56, y 60, los cuales no están numerados de acuerdo con Kabat, pero cuyas numeraciones de Kabat pueden ser determinadas fácilmente por una persona versada en la materia. Los B-HL8 y B-HL11 tienen sus secuencias de FR1 y FR2 derivadas de la clase VH3 humana, mientras que el marco de B-HH2 completo se deriva de VH1 humana. El B-HL11 es un derivado de B-HL8 con la mutación simple Glu1Gln (la posición 1 es la misma tanto en la numeración de Kabat y en el sistema de numeración convencional utilizado en el listado de secuencias), con Gln siendo el residuo de aminoácido en el constructo B-HH2. Esto significa que el intercambio de Glu1Gln no altera la afinidad de enlace ni la intensidad. Las otras diferencias entre B-HH2 y B-HL8 son 14 residuos del marco, de los cuales uno o más influirán el comportamiento de antígeno de enlace de este anticuerpo.

[0239] El constructo B-HL4 se deriva del anticuerpo B-HH2 mediante el reemplazo de FR1 del B-HH2 con aquel de la secuencia VH1_45 de la línea germinal humana. Este constructo enseña una capacidad de antígeno de enlace considerablemente disminuida, a pesar de tener aminoácidos diferentes en únicamente tres posiciones dentro de FR1. Estos residuos se localizan en las posiciones 2, 14, y 30 (Numeración de Kabat). De estas, la posición 30 puede ser una posición influyente, dado que hace parte de la definición de Chothia de la CDR1. Un análisis completo de todas las curvas de enlaces de las Figuras 9 a 13 indican que los siguientes residuos de cadena pesada de B-ly1 (Numeración de Kabat) son importantes para enlazar a CD20: N35 (extremo de CDR1 de Kabat), CDR1 de Kabat completa, CDR2 de Kabat completa y CDR3 de Kabat completa, residuos A71 y R94 (en este caso R94 no puede ser reemplazado por una treonina) y Y27. A28 y S30 también contribuyen en una medida menor. Adicionalmente la CDR3 de Kabat y todos los residuos canónicos son importantes para el antígeno de enlace. No se introdujeron mutaciones de vuelta en la cadena ligera humanizada, que tenía las CDR1, CDR2 y CDR3 de Kabat completas injertadas. En la inducción de apoptosis (Figuras 14, 15 y 21), el variante más potente fue el variante BHH2-KV1 de B-ly1 humanizado (aún más potente que el chB-ly1 original y mucho más potente que un anticuerpo con una secuencia idéntica a rituximab, C2B8). Otros variantes humanizados (derivados de BHL8) que pueden recuperar la apoptosis aumentada son: B-HL12 a B-HL17 (ver Tabla) y BHH8 (armazones mezclados) y BHH9 ("armazones mezclados" con una mutación de vuelta, S30T). Las posiciones 9 y 48 (Numeración de Kabat) pueden contactar al antígeno. Los variantes BHH4 a BHH7 son otros variantes de B-ly1 humanizado que no introducen secuencias no-humanas adicionales.

[0240] Son propiedades importantes del anticuerpo B-ly1 humanizado que este es un anticuerpo anti-CD20 tipo II tal como se definió en Cragg, M. S. y Glennie, M. J., *Blood* 103 (7):2738-2743 (Abril 2004);. Por lo tanto no induce, después del enlace a CD20, ninguna resistencia significativa para la extracción por detergente no-iónico de CD20 a partir de la superficie de células humanas CD20+, empleando el ensayo descrito para este propósito en Polyak, M. J. y Deans, J. P., *Blood* 99(9): 3256-3262 (2002). Ciertamente induce significativamente menos resistencia a la extracción por detergente

no-iónico de CD20 de lo que lo hace en anticuerpo C2B8 (otro anticuerpo anti-CD20 con secuencia idéntica a rituximab, (ver Pat. Pub. U.S. No. 2003 0003097 para Ref). Tal como se espera de un anticuerpo anti-CD20, el B-ly1 inmunizado no tuvo ninguna actividad mediada por lisis complementaria significativa y ciertamente más actividad mediada por lisis complementaria que el anticuerpo C2B8 anti-CD20 (IgG1 quimérico con secuencia idéntica a rituximab). Otra propiedad importante del anticuerpo B-ly1 humanizado fue que el mismo fue muy potente en el ensayo de agregación homotípica. En este ensayo, se incubaron células humanas CD20-positivas, células de Daudi, en medio de cultivo celular durante hasta 24 horas a 37° C en una atmósfera al 5% de CO₂ en un incubador de célula mamífera tal como se describe en detalle en (referencia de Deans), con el anticuerpo a una concentración de 1 microgramo por ml y en paralelo a una concentración de 5 microgramos por ml. Como una comparación, se hizo una incubación paralela, de control de las células bajo condiciones idénticas pero utilizando el anticuerpo C2B8 anti-CD20. Las células se inspeccionaron visualmente en diferentes puntos de tiempo, incluyendo 8 horas y 24 horas de incubación, utilizando un microscopio. Se encontró que el anticuerpo B-ly1 humanizado conduce a una fuerte agregación homotípica, con agregados que son significativamente más grandes que aquellos inducidos por la adición del anticuerpo en control C2B8. Adicionalmente, y consistente con que el anticuerpo sea un anti-CD20 tipo II, indujo niveles más altos de apoptosis cuando se incubaron las células CD20-positivas con el anticuerpo B-ly1 humanizado, con respecto al control bajo condiciones idénticas utilizando el anticuerpo IgG1 quimérico C2B8 con secuencia idéntica a rituximab.

[0241] Las variantes glicodiseñadas de los anticuerpos humanizados se produjeron mediante co-expresión de GnTIII glicosiltransferasa, junto con los genes de anticuerpo, en células de mamífero. Esto condujo a un incremento en la fracción de oligosacáridos no-fucosilados unidos a la región Fc de los anticuerpos, incluyendo los oligosacáridos no-fucosilados bisecados, tal como han sido descritos en WO 2004/065540 (Figuras 17-19). Los anticuerpos glicodiseñados tienen niveles significativamente más altos de enlace a receptores FcγRIII humanos (Figura 20) y como también actividad ADCC actividad (Figura 16), con respecto al anticuerpo no-glicodiseñado y con respecto al anticuerpo C2B8. El anticuerpo humanizado

B-ly1 también fue más potente en la inducción del agotamiento de célula B humana en un ensayo de sangre entera (Figura 16) que el anticuerpo de control C2B8. Esto fue cierto tanto para el anticuerpo B-ly1 no-glicodiseñado y para la versión glicodiseñada del mismo. El anticuerpo glicodiseñado fue aproximadamente 1000 veces más potente que el anticuerpo de control C2B8 anti-CD20 en el agotamiento de las células B en el ensayo de sangre entera. Esta comparación es importante tanto para las formas del anticuerpo B-ly1 no-glicodiseñadas y para las glicodiseñadas humanizadas, porque mostró en ensayos que las actividades combinadas dependientes del receptor Fc, tales como ADCC, más lisis mediada por complemento más inducción de apoptosis, que ambas formas de B-ly1 fueron significativamente más potentes que C2B8, aunque ambas formas de B-ly1 tienen actividad de lisis mediada por complemento dramáticamente inferiores. El ADCC, las actividades de muerte celular dependientes de receptor Fc y la inducción de apoptosis se presentaron en esta actividad superior de los variantes del anticuerpo B-ly1 humanizado. Adicionalmente, en el ensayo de apoptosis, tanto las formas glicodiseñadas y no-glicodiseñadas de este anticuerpo anti-CD20 tipo II fueron potentes, con los variantes Fc-diseñados con afinidad de enlace aumentada para los receptores Fc γ siendo aún más potente en la inducción de apoptosis que el variante no-Fc-diseñado, y con todos los variantes siendo significativamente más potentes que el anticuerpo C2B8 de control. No se conoce el mecanismo exacto para la agregación homotípica mejorada y la inducción de apoptosis mediada por anticuerpos anti-CD20 tipo II y el enlace concomitante a otras moléculas sobre la superficie de células CD20-positivas, tales como los receptores Fc γ , puede influir en esta importante propiedad. Por lo tanto, fue importante demostrar que los anticuerpos anti-CD20 de tipo II que han sido diseñados en su región Fc para afinidad de enlace aumentada a receptores Fc γ , que incluyen Fc γ RIII y con un incremento asociado en la actividad ADCC, seguirán siendo capaces de inducir apoptosis fuerte, incluso mayor que los no Fc-diseñados, y agregación homotípica. La inducción de apoptosis es importante como in vivo, ya que existen localizaciones en el cuerpo donde las células CD20-positivas objetivo pueden encontrarse, pero en donde el acceso a las células Fc γ RIII-positivas es más difícil que en la sangre, tales localizaciones son, por ejemplo, nodos linfáticos. En aquellas localizaciones, la inducción de apoptosis mediante el anticuerpo anti-CD20

en sí mismo puede ser crucial para la buena eficacia de la terapia de anticuerpo anti-CD20 en humanos, tanto para el tratamiento de malignidades hematológicas tales como los linfomas de no-Hodgkins y la leucemia linfocítica de células B crónica, y para el tratamiento de enfermedades autoinmunes tales como la artritis reumatoide y el lupus a través de una aproximación de agotamiento de células B. La afinidad de enlace aumentada para FcγRIII y ADCC más alta del anticuerpo anti-CD20 tipo II humanizado, Fc-diseñado también puede ser un atributo muy importante para tales terapias. Finalmente, la actividad de lisis mediada por complemento reducida o despreciable de estos anticuerpos anti-CD20 de tipo II, que incluyen variantes humanizadas y Fc-diseñadas, también puede ser una activación por complemento importante más alta mediante los anticuerpos anti-CD20 que ha sido correlacionada con efectos laterales aumentados, no deseables.

REIVINDICACIONES

1. Una molécula que se enlaza a antígeno glicodiseñada anti-CD20 Tipo II que comprende una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera, donde dicha molécula que se enlaza a antígeno induce una citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC) incrementada como un resultado de dicho diseño sin perder sustancialmente la habilidad de inducir apoptosis en células objetivo, y donde dicha molécula que se enlaza a antígeno comprende al menos una región determinante de complementariedad (CDR) del anticuerpo murino B-Ly1 seleccionado del grupo consistente de: el CDR1 de cadena pesada de SEQ ID NO : 15, SEQ ID NO : 16 o SEQ ID NO : 17; el CDR2 de cadena pesada de SEQ ID NO : 25, SEQ ID NO : 26 o SEQ ID NO : 27; y el CDR3 de cadena pesada de SEQ ID NO : 28; el CDR1 de cadena ligera de SEQ ID NO : 18; el CDR2 de cadena ligera de SEQ ID NO : 19; y el CDR3 de cadena ligera de SEQ ID NO : 20.
2. La molécula que se enlaza a antígeno de la reivindicación 1, donde dicha región variable de cadena pesada comprende el CDR1 de cadena pesada de B-Ly1 de SEQ ID NO : 15, SEQ ID NO : 16 o SEQ ID NO : 17; el CDR2 de cadena pesada de SEQ ID NO : 25, SEQ ID NO : 26, o SEQ ID NO : 27; y el CDR3 de cadena pesada de SEQ ID NO : 28.
3. La molécula que se enlaza a antígeno de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, donde dicha región variable de cadena ligera comprende el CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena ligera de B-Ly1, representadas por SEQ ID NO : 18, SEQ ID NO : 19 y SEQ ID NO : 20, respectivamente.
4. La molécula que se enlaza a antígeno de la reivindicación 1, donde dicha molécula que se enlaza a antígeno comprende una región Fc que ha sido glicodiseñada para tener un incremento en la cantidad de oligosacáridos bisecados complejos.
5. La molécula que se enlaza a antígeno de la reivindicación 1, donde dicha molécula que se enlaza a antígeno comprende una región Fc que ha sido glicodiseñada para tener una disminución en la cantidad de residuos de fucosa.

6. La molécula que se enlaza a antígeno de la reivindicación 1, donde dicha región variable de cadena pesada tiene una secuencia de aminoácidos que es seleccionada del grupo que consiste de: SEQ ID NO : 30; SEQ ID No : 32; SEQ ID No : 34; SEQ ID No : 36; SEQ ID No : 38; SEQ ID No : 40; SEQ ID No : 42; SEQ ID No : 44; SEQ ID No : 46; SEQ ID No : 48; SEQ ID No : 50; SEQ ID No : 52; SEQ ID No : 54; SEQ ID No : 56; SEQ ID No : 58; SEQ ID No: 60; SEQ ID No: 62; SEQ ID No: 64; SEQ ID No : 66; SEQ ID No : 68; SEQ ID No: 70; y SEQ ID No: 72.

7. La molécula que se enlaza a antígeno de la reivindicación 3, donde dicha región variable de cadena ligera tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No: 76.

8. La molécula que se enlaza a antígeno de la reivindicación 1, donde dicha molécula que se enlaza a antígeno es una molécula que se enlaza a antígeno humanizada que comprende un polipéptido que comprende:

a. una secuencia de CDR1 de cadena pesada seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO : 15, SEQ ID NO : 16 o SEQ ID NO : 17;

b. una secuencia de CDR2 de cadena pesada seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO : 25, SEQ ID NO : 26 o SEQ ID NO : 27;

c. el CDR3 de cadena pesada de SEQ ID NO : 28.

9. La molécula que se enlaza a antígeno de la reivindicación 1, donde dicha molécula que se enlaza a antígeno es una molécula que se enlaza a antígeno humanizada que comprende un polipéptido que comprende: el CDR1 de cadena ligera de SEQ ID NO : 18, el CDR2 de cadena ligera de SEQ ID NO : 19, y el CDR3 de cadena ligera de SEQ ID NO : 20.

10. La molécula que se enlaza a antígeno de la reivindicación 1, donde dicha molécula que se enlaza a antígeno comprende un primer polipéptido aislado que comprende una secuencia de región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 40 y un segundo polipéptido aislado que comprende una secuencia de región variable de cadena ligera de SEQ ID NO:76.

11. La molécula que se enlaza a antígeno de la reivindicación 1, donde dicha molécula que se enlaza a antígeno es un anticuerpo humanizado que tiene una habilidad incrementada para inducir apoptosis de células objetivo luego de dicha humanización, donde:

- a. el CDR1 de cadena pesada es SEQ ID NO:16;
- b. el CDR2 de cadena pesada es SEQ ID NO:26; y
- c. el CDR3 de cadena pesada es SEQ ID NO:28;

donde las regiones de marco (FRs) de las regiones variables de cadena pesada, FR1, FR2 y FR3 de dicho anticuerpo son secuencias FR humanas codificadas por la secuencia VH1_10 de la línea germinal humana y la región variable de cadena pesada FR4 de dicho anticuerpo es una secuencia humana FR codificada por la secuencia JH4 de la línea germinal humana;

donde:

- d. el CDR1 de cadena ligera es SEQ ID NO:18;
- e. el CDR2 de cadena ligera es SEQ ID NO:19; y
- f. el CDR3 de cadena ligera es SEQ ID NO:20;

donde las regiones variables de cadena ligera FRs, FR1, FR2 y FR3 de dicho anticuerpo son secuencias FR humanas codificadas por la secuencia VK2_40 de la línea germinal humana y la región variable de cadena ligera FR4 de dicho anticuerpo es una secuencia humana FR codificada por la secuencia JK4 de la línea germinal humana.

12. La molécula que se enlaza a antígeno de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, donde dicha molécula que se enlaza a antígeno tiene una región Fc con oligosacáridos modificados.

13. La molécula que se enlaza a antígeno de la reivindicación 12, donde al menos el 20% de los oligosacáridos de la región Fc de dicha molécula que se enlaza a antígeno son bisecados, no fucosilados.

14. La molécula que se enlaza a antígeno de la reivindicación 12, donde al menos el 50% de los oligosacáridos de la región Fc de dicha molécula que se enlaza a antígeno son no fucosilados.

15. La molécula que se enlaza a antígeno de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, donde dicha molécula que se enlaza a antígeno exhibe una afinidad de unión aumentada Fc como resultado de dicho glicodiseño.

16. La molécula que se enlaza a antígeno de la reivindicación 15, donde dicho receptor Fc es el receptor Fc γ RIIIA.

17. La molécula que se enlaza a antígeno de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, donde dicha molécula que se enlaza a antígeno exhibe una función efectora aumentada como resultado de dicho glicodiseño.

18. La molécula que se enlaza a antígeno de la reivindicación 17, donde dicha función efectora aumentada es señalización directa aumentada que induce apoptosis.

19. Una célula huésped que expresa al menos un ácido nucleico que codifica un polipéptido que tiene actividad $\beta(1,4)$ -N-acetilglucosaminiltransferasa III en una cantidad suficiente para glicodiseñar la región Fc de una molécula que se enlaza a antígeno producida por dicha célula huésped, donde dicho polipéptido es una molécula que se enlaza a antígeno de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18.

20. La célula huésped de la reivindicación 19, que además comprende al menos un polinucleótido transfectado que codifica la molécula que se enlaza a antígeno de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18, donde dicho ácido nucleico comprende una secuencia que codifica a una región equivalente a la región Fc de una inmunoglobulina humana.

21. Un polinucleótido aislado que comprende una secuencia que codifica una región variable de cadena pesada de la reivindicación 6, donde dicho polinucleótido comprende una secuencia que tiene al menos un 80% de identidad a una secuencia seleccionada del grupo que consiste de: SEQ ID NO : 29; SEQ ID No : 31; SEQ ID No : 33; SEQ ID No : 35; SEQ ID No : 37; SEQ ID No : 39; SEQ ID No : 41; SEQ ID No : 43; SEQ ID No : 45; SEQ ID No : 47; SEQ ID No : 49; SEQ ID No : 51; SEQ ID No : 53; SEQ ID No : 55; SEQ ID No : 57; SEQ ID No: 59; SEQ ID No: 61; SEQ ID No: 63; SEQ ID No : 65; SEQ ID No : 67; SEQ ID No: 69; y SEQ ID No: 71.

22. El polinucleótido de la reivindicación 21, donde dicho polinucleótido comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste de: SEQ ID NO : 29; SEQ ID No : 31; SEQ ID No : 33; SEQ ID No : 35; SEQ ID No : 37; SEQ ID No : 39; SEQ ID No : 41; SEQ ID No : 43; SEQ ID No : 45; SEQ ID No : 47; SEQ ID No : 49; SEQ ID No : 51; SEQ ID No : 53; SEQ ID No : 55; SEQ ID No : 57; SEQ ID No: 59; SEQ ID No: 61; SEQ ID No: 63; SEQ ID No : 65; SEQ ID No : 67; SEQ ID No: 69; y SEQ ID No: 71.

23. El polinucleótido de la reivindicación 21, donde dicho polinucleótido comprende una secuencia que codifica un polipéptido teniendo una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de: SEQ ID NO : 30; SEQ ID No : 32; SEQ ID No : 34; SEQ ID No : 36; SEQ ID No : 38; SEQ ID No : 40; SEQ ID No : 42; SEQ ID No : 44; SEQ ID No : 46; SEQ ID No : 48; SEQ ID No : 50; SEQ ID No : 52; SEQ ID No : 54; SEQ ID No : 56; SEQ ID No : 58; SEQ ID No: 60; SEQ ID No: 62; SEQ ID No: 64; SEQ ID No : 66; SEQ ID No : 68; SEQ ID No: 70; y SEQ ID No: 72, donde dicho polipéptido tiene sustituciones conservativas de aminoácidos.

24. Un polinucleótido aislado que comprende una secuencia que codifica una región variable de cadena ligera de la reivindicación 7, donde dicho polinucleótido comprende la secuencia teniendo al menos un 80% de identidad a SEQ ID NO:75.

25. El polinucleótido de la reivindicación 24, donde dicho polinucleótido comprende SEQ ID NO:75.

26. El polinucleótido de la reivindicación 25, donde dicho polinucleótido comprende una secuencia que codifica un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:76, donde dicho polipéptido tiene sustituciones conservativas de aminoácidos.

27. Una molécula que se enlaza a antígeno anti-CD20 tipo II humanizada que comprende una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera, donde dicha molécula que se enlaza a antígeno comprende al menos un CDR B-Ly1 seleccionado del grupo que consiste de: el CDR1 de cadena pesada de SEQ ID NO : 15, SEQ ID NO : 16 o SEQ ID NO : 17; el CDR2 de cadena pesada de SEQ ID NO : 25, SEQ ID NO : 26 o SEQ ID NO : 27; y el CDR3 de cadena pesada de SEQ ID NO : 28; el CDR1 de cadena

ligera de SEQ ID NO : 18; el CDR2 de cadena ligera de SEQ ID NO : 19; y el CDR3 de cadena ligera de SEQ ID NO : 20, donde dicha molécula que se enlaza a antígeno induce mayores niveles de apoptosis cuando se incuba con células humanas CD-20 positivas relativo a un control bajo condiciones idénticas usando el anticuerpo IgG1 quimérico C2B8 con una secuencia idéntica a rituximab.

28. La molécula que se enlaza a antígeno de la reivindicación 27, donde dicha molécula que se enlaza a antígeno comprende una región variable de cadena pesada que comprende un CDR1 de cadena pesada de B-Ly1, un CDR2 y un CDR3 representados por SEQ ID NO : 16, SEQ ID NO : 26, y SEQ ID NO : 28, respectivamente.

29. La molécula que se enlaza a antígeno de la reivindicación 27 o 28, donde dicha molécula que enlaza a antígeno comprende una región variable de cadena ligera que comprende el CDR1, CDR2, y CDR3 de cadena ligera de B-Ly1, representadas por SEQ ID NO : 18, SEQ ID NO : 19 y SEQ ID NO : 20, respectivamente.

30. La molécula que se enlaza a antígeno de la reivindicación 27, donde dicha molécula que se enlaza a antígeno comprende la región variable de cadena pesada que es seleccionada del grupo que consiste de: SEQ ID NO : 30; SEQ ID No : 32; SEQ ID No : 34; SEQ ID No : 36; SEQ ID No : 38; SEQ ID No : 40; SEQ ID No : 42; SEQ ID No : 44; SEQ ID No : 46; SEQ ID No : 48; SEQ ID No : 50; SEQ ID No : 52; SEQ ID No : 54; SEQ ID No : 56; SEQ ID No : 58; SEQ ID No: 60; SEQ ID No: 62; SEQ ID No: 64; SEQ ID No : 66; SEQ ID No : 68; SEQ ID No: 70; y SEQ ID No: 72.

31. La molécula que se enlaza a antígeno de la reivindicación 27, donde dicha molécula que se enlaza a antígeno comprende una región variable de cadena pesada de SEQ ID NO:40.

32. La molécula que se enlaza a antígeno de la reivindicación 29, donde dicha molécula que se enlaza a antígeno comprende la región variable de cadena ligera KV1 de SEQ ID NO:76.

33. La molécula que enlaza a antígeno de la reivindicación 27, donde dicha molécula que enlaza antígeno comprende un primer polipéptido aislado que

comprende una secuencia de región variable de cadena pesada de SEQ ID NO:40 y un segundo polipéptido aislado que comprende una secuencia de región variable de cadena ligera de SEQ ID NO:76.

34. La molécula que se enlaza a antígeno de la reivindicación 27, donde

i) dicha región variable de cadena pesada comprende el CDR1 de cadena pesada de B-Ly1 de SEQ ID NO : 16, el CDR2 de cadena pesada de B-Ly1 de SEQ ID NO : 26, o SEQ ID NO : 27; y el CDR3 de cadena pesada de B-Ly1 de SEQ ID NO : 28; las regiones de marco (FRs) de cadena pesada, FR1, FR2 y FR3, codificadas por la secuencia VH1_10 de la línea germinal humana y la región de cadena pesada FR4 codificada por la secuencia JH4 de la línea germinal humana; y

ii) dicha región variable de cadena ligera comprende el CDR1, CDR2, y CDR3 de cadena ligera de B-Ly1, representadas por SEQ ID NO : 18, SEQ ID NO : 19 y SEQ ID NO : 20, respectivamente, las regiones FR1, FR2 y FR3 de cadena ligera, codificadas por la secuencia VK2_40 de la línea germinal humana y la región FR4 de cadena ligera codificada por la secuencia JK4 de la línea germinal humana.

35. Un polinucleótido aislado que comprende una secuencia que codifica una región variable de cadena pesada de la reivindicación 30 donde el polinucleótido comprende una secuencia teniendo al menos 80% de identidad a una secuencia seleccionada del grupo que consiste de: SEQ ID NO : 29; SEQ ID No : 31; SEQ ID No : 33; SEQ ID No : 35; SEQ ID No : 37; SEQ ID No : 39; SEQ ID No : 41; SEQ ID No : 43; SEQ ID No : 45; SEQ ID No : 47; SEQ ID No : 49; SEQ ID No : 51; SEQ ID No : 53; SEQ ID No : 55; SEQ ID No : 57; SEQ ID No: 59; SEQ ID No: 61; SEQ ID No: 63; SEQ ID No : 65; SEQ ID No : 67; SEQ ID No: 69; y SEQ ID No: 71.

36. El polinucleótido de la reivindicación 35, donde dicho polinucleótido comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste de: SEQ ID NO : 29; SEQ ID No : 31; SEQ ID No : 33; SEQ ID No : 35; SEQ ID No : 37; SEQ ID No : 39; SEQ ID No : 41; SEQ ID No : 43; SEQ ID No : 45; SEQ ID No : 47; SEQ ID No : 49; SEQ ID No : 51; SEQ ID No : 53; SEQ ID No : 55; SEQ ID No : 57; SEQ ID No: 59; SEQ ID No: 61; SEQ ID No: 63; SEQ ID No : 65; SEQ ID No : 67; SEQ ID No: 69; y SEQ ID No: 71.

37. El polinucleótido de la reivindicación 35, donde dicho polinucleótido comprende una secuencia que codifica un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionado del grupo que consiste de: SEQ ID NO : 30; SEQ ID No : 32; SEQ ID No : 34; SEQ ID No : 36; SEQ ID No : 38; SEQ ID No : 40; SEQ ID No : 42; SEQ ID No : 44; SEQ ID No : 46; SEQ ID No : 48; SEQ ID No : 50; SEQ ID No : 52; SEQ ID No : 54; SEQ ID No : 56; SEQ ID No : 58; SEQ ID No: 60; SEQ ID No: 62; SEQ ID No: 64; SEQ ID No : 66; SEQ ID No : 68; SEQ ID No: 70; y SEQ ID No: 72, donde dicho polipéptido tiene sustituciones conservativas de aminoácidos.

38. Un polinucleótido aislado que comprende una secuencia que codifica una región variable de cadena ligera de la reivindicación 32, donde dicho polinucleótido comprende una secuencia que tiene al menos un 80% de identidad a SEQ ID NO: 75.

39. El polinucleótido de la reivindicación 38, donde dicho polinucleótido comprende SEQ ID NO:75.

40. El polinucleótido de la reivindicación 38, donde dicho polinucleótido comprende una secuencia que codifica un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:76, donde dicho polipéptido tiene sustituciones conservativas de aminoácidos.

41. La molécula que se enlaza a antígeno de cualquiera de las reivindicaciones 27 a 34, donde dicha molécula que se enlaza a antígeno comprende una región Fc glicodiseñada.

42. La molécula que se enlaza a antígeno de la reivindicación 41, donde dicha molécula que se enlaza a antígeno tiene un aumento en la fracción de oligosacáridos no fucosilados unidos a dicha región Fc glicodiseñada.

43. La molécula que se enlaza de antígeno de la reivindicación 41, donde dicha molécula que se enlaza a antígeno tiene un aumento en la fracción de oligosacáridos bisecados, no fucosilados unidos a dicha región Fc glicodiseñada.

44. La molécula que se enlaza a antígeno de la reivindicación 41, donde dicha molécula que se enlaza a antígeno tiene niveles significativamente más altos de unión a los receptores humanos FcγRIII relativo a la molécula que se enlaza a antígeno no glicodiseñada.
45. La molécula que se enlaza a antígeno de la reivindicación 41, donde dicha molécula que se enlaza a antígeno tiene niveles significativamente mayores de actividad citotóxica celular dependiente de anticuerpo, ADCC, relativa a la molécula que se enlaza a antígeno no glicodiseñada.
46. Un vector de expresión que comprende el polinucleótido de cualquiera de las reivindicaciones 21 a 26 o 35 a 40.
47. Una célula huésped que comprende el vector de expresión de la reivindicación 46.
48. Una composición farmacéutica que comprende una molécula que se une a antígeno de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18, 27 a 34 o 41 a 45 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
49. Un método para producir una molécula que se enlaza a antígeno anti-CD20, dicho método comprende:
- a. cultivar una célula huésped de cualquiera de las reivindicaciones 19, 20 o 47 bajo condiciones que permitan la producción de dicha molécula que se enlaza a antígeno; y
 - b. aislar dicha molécula que se enlaza a antígeno;
50. Un método para producir en una célula huésped una molécula que se enlaza a antígeno anti-CD20 que tiene una región Fc con oligosacáridos modificados y diseñada para tener una función efectora aumentada, dicho método comprende:
- a. cultivar una célula huésped diseñada para expresar al menos un ácido nucleico que codifica un polipéptido que tiene actividad $\beta(1,4)$ -N-acetilglucosaminiltransferasa III bajo condiciones que permitan la producción de dicha molécula que se enlaza a antígeno, y la cual permite la modificación de

los oligosacáridos presentes en la región Fc de dicha molécula que se une a antígeno; y

- b. aislar dicha molécula que se enlaza a antígeno;

donde dicha molécula que se enlaza a antígeno es una proteína de fusión que incluye un polipéptido que tiene una secuencia de región variable seleccionada del grupo que consiste de: SEQ ID NO : 30; SEQ ID No : 32; SEQ ID No : 34; SEQ ID No : 36; SEQ ID No : 38; SEQ ID No : 40; SEQ ID No : 42; SEQ ID No : 44; SEQ ID No : 46; SEQ ID No : 48; SEQ ID No : 50; SEQ ID No : 52; SEQ ID No : 54; SEQ ID No : 56; SEQ ID No : 58; SEQ ID No: 60; SEQ ID No: 62; SEQ ID No: 64; SEQ ID No : 66; SEQ ID No : 68; SEQ ID No: 70; SEQ ID No: 72, y SEQ ID No: 76, y una región equivalente a la región Fc de una inmunoglobulina.

51. Un método de acuerdo con la reivindicación 49, donde dichos oligosacáridos modificados tienen una fucosilación reducida comparado con los oligosacáridos no modificados.

52. Un método de acuerdo con la reivindicación 49, donde dicha molécula que se une a antígeno producida por dicha célula huésped tiene una proporción aumentada de oligosacáridos bisecados, no fucosilados en la región Fc de dicho polipéptido.

	HphI	Enlazante	Inicio de la SEQ ID NO:3 (aminoácido) y la SEQ ID NO: 4 (nucleótido)	MslI
1	GACATTGTGC TCACCCAAAC TACA	AATCCA	GTCACCTCTTG GAACATCAGC TTCCATCTCC TGCAGGTCTA GTAAGAGTCT CCTACATAGT AATGGCATCA	CTGTAAACACG AGTGGGTTTG ATGT
	D I V L T Q T T	N P	V T L G T S A S I S C R S S K S L L H S N G I	
	>>.....B-Ly1 v.1.....>			
		BseRI	MneI	
101	CTTATTTGTA TTGGTATCTG CAGAAGCCAG GCCAGTCTCC TCAGCTCCTG ATTTATCAGA TGTCCAACCT TGTCTCAGGA GTCCAGACA GGTTCAGTAG	GAATAAACAT AACCATAGAC GTCTTCGGTC CGGTCAGAGG AGTCGAGGAC TAAATAGTCT ACAGGTGGA ACAGAGTCCT CAGGCTCTGT CCAAGTCATC	T Y L Y W Y L Q K P G Q S P Q L L I Y Q M S N L V S G V P D R F S	
	>.....B-Ly1 v.1.....>			
	BtsI		AflIII	
201	CAGTGGGTCA GGAAGTATT TCACACTGAG AATCAGCAGA GTGGAGGCTG AGGATGTGGG TGTATTATAC TGTGCTCAAA ATCTAGAACT TCCGTACACG	GTCACCCAGT CCTTGACTAA AGTGTGACTC TTAGTCGTCT CACCTCCGAC TCCTACACCC ACAAATAATG ACACGAGTTT TAGATCTTGA AGGCATGTGC	S S G S G T D F T L R I S R V E A E D V G V Y Y C A Q N L E L P Y T	
	>.....B-Ly1 v.1.....>			
301	TTCGGAGGGG GGACCAAGCT GGAAATAAAA CGG	AAGCCTCCCC CCTGGTTCGA CCTTTATTTT GCC	F G G G T K L E I K R	
	>.....B-Ly1 v.1.....>			

FIG. 2

Alfart Biotecnology AG
Exp. 06-070.457