

ANTICUERPOS BIESPECÍFICOS CONTRA EL CD20 HUMANO Y EL RECEPTOR DE TRANSFERRINA HUMANO Y MÉTODOS DE USO

Ámbito de la invención

La presente invención se refiere a anticuerpos biespecíficos contra el CD20 humano y el receptor de transferrina humano, a métodos para su producción, a composiciones farmacéuticas que contienen estos anticuerpos y a usos de los mismos.

Antecedentes de la invención

Los linfocitos son una de las diversas poblaciones de leucocitos. Reconocen específicamente y responde a los antígenos externos. Las tres clases principales de linfocitos son los linfocitos B (células B), los linfocitos T (células T) y las células asesinas naturales (natural killer = NK). Los linfocitos B son células que intervienen en la producción de anticuerpos y proporcionan inmunidad humoral. Las células B maduran dentro la médula ósea y permiten que la médula se exprese un anticuerpo que se une a un antígeno en su superficie celular. Cuando una célula B nativa entra en contacto por primera vez con el antígeno, con respecto al cual es específico el anticuerpo unido a su membrana, entonces la célula empieza a dividirse rápidamente y su progenie se diferencia en células B de memoria y células efectoras, también llamadas "células plasmáticas". Las células B de memoria tienen una mayor duración de vida y continúan expresándose en los anticuerpos unidos a la membrana con la misma especificidad que la célula original. Las células plasmáticas no producen anticuerpos unidos a la membrana, sino que en su lugar producen las formas secretadas de los anticuerpos. Los anticuerpos secretados son las principales moléculas efectoras de inmunidad humoral.

El antígeno CD20 (también llamado antígeno humano de diferenciación restringida de linfocitos B, Bp35) es una proteína transmembrana hidrófoba que tiene un peso molecular aproximadamente de 35 kDa y está ubicada en los pre-linfocitos B y los linfocitos B maduros (Valentine y col., J. Biol. Chem. 264, 11282-11287, 1989; y Einfeld y col., EMBO J. 7, 711-717, 1988). El antígeno se expresa también en un grado superior al 90 % en los linfomas no de Hodgkin de células B (NHL) (Anderson y col., Blood 63, 1424-1433, 1984), pero no se encuentra en las células germinales hematopoyéticas, las células pro-B, las células plasmáticas normales ni otros tejidos normales (Tedder y col., J. Immunol. 135, 973-979, 1985). Se cree que el CD20 regular el o los paso(s) tempranos del proceso de activación de la iniciación

del ciclo celular y de la diferenciación (Tedder y col., lugar citado) y posiblemente las funciones como canal de iones calcio (Tedder y col., J. Cell. Biochem. 14D, 195, 1990).

Dada la expresión del CD20 en linfomas de células B, este antígeno ha sido una diana terapéutica útil para tratar tales linfomas. Dada la expresión del CD20 en linfomas de células B, este antígeno puede servir como candidato para “abordar” tales linfomas. En lo esencial, este abordar o centrarse en una diana puede generalizarse del modo siguiente: se administran a un paciente los anticuerpos específicos del antígeno de superficie CD20 de las células B. Estos anticuerpos anti-CD20 se unen específicamente al antígeno CD20 de células B (presumiblemente) tanto normales como malignas. El anticuerpo unido al antígeno de superficie CD20 puede conducir a la destrucción y eliminación de las células B neoplásicas. Además se pueden conjugar los agentes químicos o los marcadores radiactivos, que tienen el potencial de destruir el tumor, con el anticuerpo anti-CD20 de tal manera que el agente se “entregue” específicamente a las células B neoplásicas. Con independencia de esta estrategia, el objetivo primario consiste en destruir el tumor; la estrategia específica podrá determinarse para un anticuerpo anti-CD20 concreto, que se emplea y, de este modo, las estrategias disponibles de apuntar al antígeno CD20 pueden variar considerablemente. Por ejemplo, el anticuerpo rituximab (RITUXAN®), que es un anticuerpo monoclonal murino-humano quimérico de ingeniería genética, dirigido contra el antígeno CD20 humano (producto comercial de Genentech, Inc., South San Francisco, California, EE.UU.), se emplea para el tratamiento de pacientes con que sufren un linfoma no de Hodgkin de células B, positivo de CD20, recidivo o refractario de grado bajo o folicular. El rituximab es el anticuerpo también llamado “C2B8” en US 5,736,137 y en US 5,776,456. En los estudios de mecanismos de acción “in vitro” se ha demostrado que el RITUXAN® se une a las líneas humanas de células B linfoides de complemento y de lisis por una citotoxicidad dependiente de complemento (CDC) (Reff y col., Blood 83, 435-445, 1994). Tiene además una actividad significativa en los ensayos de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC). Los estudios preclínicos “in vivo” han demostrado que el RITUXAN® reduce las células B de la sangre periférica, los nodos linfáticos y la médula ósea de los simios cinomolgos, presumiblemente por procesos de complemento y mediados por células (Reff y col., Blood 83, 435-445, 1994). Otros anticuerpos anti-CD20 indicados para el tratamiento de la NHL incluyen al anticuerpo murino Zevalin™ que está unido a un radioisótopo, el itrio-90 (IDEC

Pharmaceuticals, San Diego, CA, EE.UU.), el Bexxar™ que es otro anticuerpo totalmente murino conjugado con el I-131 (Corixa, WA, EE.UU.).

El CD20 es también un antígeno diana útil para tratar enfermedades autoinmunes. El rituximab se ha estudiado también en un gran número de trastornos autoinmunes no malignos, en los que las células B y los autoanticuerpos parecen desempeñar su papel en la patofisiología de la enfermedad (ver p. ej. Edwards y col., *Biochem. Soc. Trans.* 30, 824-828, 2002). Se ha publicado que el rituximab potencialmente mitiga los signos y los síntomas por ejemplo de la artritis reumatoide (RA) (Leandro y col., *Ann. Rheum. Dis.* 61, 883-888, 2002; Edwards y col., *Arthritis Rheum.* 46, (supl. 9), S46, 2002; Stahl y col., *Ann. Rheum. Dis.* 62, (supl. 1), OP004, 2003; Emery y col., *Arthritis Rheum.* 48, S439, 2003), del lupus (Eisenberg, *Arthritis. Res. Ther.* 5, 157-159, 2003; Leandro y col., *Arthritis Rheum.* 46, 2673-2677, 2002; Gorman y col., *Lupus* 13, 312-316, 2004), la púrpura trombocitopénica inmune (D'Arena y col., *Leuk. Lymphoma* 44, 561-562, 2003; Stasi y col., *Blood* 98, 952-957, 2001; Saleh y col., *Semin. Oncol.* 27, (supl. 12), 99-103, 2000; Zaja y col., *Haematologica* 87, 189-195, 2002; Ratanatharathorn y col., *Ann. Int. Med.* 133, 275-279, 2000), aplasia de eritrocitos puros (Auner y col., *Br. J. Hematol.* 116, 725-728, 2002); la anemia autoinmune (Zaja y col., *Haematologica* 87, 189-195, 2002 (error: aparece en *Haematologica* 87, 336, 2002), la enfermedad de la aglutinina fría (Layios y col., *Leukemia* 15, 187-188, 2001; Berentsen y col., *Blood* 103, 2925-2928, 2004; Berentsen y col., *Br. J. Hematol.* 115, 79-83, 2001; Bauduer, *Br. J. Hematol.* 112, 1083-1090, 2001; Damiani y col., *Br. J. Hematol.* 114, 229-234, 2001), el síndrome de tipo B de la resistencia severa a la insulina (Coll y col., *N. Engl. J. Med.* 350, 310-311, 2004, la crioglobulinemia mixta (De Vita y col., *Arthritis Rheum.* 46, supl. 9, S206/S469, 2002), la miastenia grave (Zaja y col., *Neurology* 55, 1062-1063, 2000; Wylam y col., *J. Pediatr.* 143, 674-677, 2003), la granulomatosis de Wegener (Specks y col., *Arthritis & Rheumatism* 44, 2836-2840, 2001), el pénfigo vulgar refractario (Dupuy y col., *Arch. Dermatol.* 140, 91-96, 2004), la dermatomiositis (Levine, *Arthritis Rheum.* 46, (supl. 9), S1299, 2002), el síndrome de Sjogren (Somer y col., *Arthritis & Rheumatism* 49 (2003) 394-398), la crioglobulinemia mixta activa de tipo II (Zaja y col., *Blood* 101, 3827-3834, 2003), el pénfigo vulgar (Dupay y col., *Arch. Dermatol.* 140, 91-95, 2004), la neuropatía autoinmune (Pestronk y col., *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 74, 485-489, 2003), el síndrome opsoclono-mioclono paraneoplásico (Pranzatelli y col., *Neurology* 60, (supl. 1) PO5.128:A395, 2003) y la esclerosis múltiple recidiva-remitente (RRMS) (Cross y col., (resumen) "Resultados preliminares de los ensayos de fase II del rituximab en esclerosis múltiple", Octava

Convención Anual del Comité Americano de Investigación y Tratamiento de la Esclerosis Múltiple, 20-21, 2003).

Las publicaciones relativas a la terapia con rituximab incluyen: Perotta y Abuel, *Blood* 10, (partes 1-2), 88B, 1998; Perotta y col., *Blood* 94, 49, 1999 (resumen); Matthews, R., *Ann. Rheum. Dis.*, lugar citado; Leandro y col., *Arthritis and Rheumatism* 44(9), S370, 2001; Leandro y col., *Arthritis and Rheumatism* 46, 2673-2677, 2002; Weide y col., *Lupus* 12, 779-782, 2003; Edwards y Cambridge, *Rheumatology* 40, 205-211, 2001; Cambridge y col., *Arthritis Rheum.* 46, (supl. 9), S1350, 2002; Edwards y col., *Arthritis and Rheumatism* 46, S197, 2002; Levine y Pestronk, *Neurology* 52, 1701-1704, 1999; De Vita y col., *Arthritis & Rheum.* 46, 2029-2033, 2002; Hidashida y col., *Annual Scientific Meeting of the American College of Rheumatology*; 24-29 de octubre de 2002; Nueva Orleans, LA; Tuscano, J., *Annual Scientific Meeting of the American College of Rheumatology*; 24-29 de octubre de 2002; Nueva Orleans, LA; Martin y Chan, *Immunity* 20, 517-527, 2004; Silverman y Weisman, *Arthritis and Rheumatism* 48, 1484-1492, 2003; Kazkaz y Isenberg, *Current opinion in pharmacology* 4, 398-402, 2004; Virgolini y Vanda, *Biomedicine & pharmaco-therapy* 58, 299-309, 2004; Klemmer y col., *Arthritis and Rheumatism* 48, 9,S (SEP), S624-S624, 2003; Kneitz y col., *Immunobiology* 206, 519-527, 2002; Arzoo y col., *Annals of the Rheumatic Diseases* 61, p922-924, 2002; Comment in *Ann. Rheum. Dis.* 61, 863-866, 2002; "Future Strategies in Immunotherapy" por Lake y Dionne, en *Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery* (2003, editorial John Wiley & Sons, Inc.); Liang y Tedder, *Wiley Encyclopedia of Molecular Medicine*, sección: CD20 as an Immunotherapy Target, 2002, titulada "CD20"; apéndice 4A titulado "Anticuerpos Monoclonales contra Antígenos de Superficie de Células Humanas" por Stockinger y col., coord: Coligan y col., en *Current Protocols in Immunology* (2003, editorial John Wiley & Sons, Inc.); Penichet y Morrison, "Anticuerpos/moléculas CD: Definición; Ingeniería de Anticuerpos" en *Wiley Encyclopedia of Molecular Medicine*, sección: Anticuerpos Quiméricos, Humanizados y Humanos; accesibles online desde el 15 de enero de 2002; Specks y col., *Arthritis & Rheumatism* 44, 2836-2840, 2001; Koegh y col., "Rituximab for Remission Induction in Severe ANCA-Associated Vasculitis: Report of a Prospective Open-Label Pilot Trial in 10 Patients", *American College of Rheumatology*, número de sesión: 28-100, título de la sesión: Vasculitis, tipo de sesión: ACR Concurrent Session, categoría primaria: 28 Vasculitis, sesión 10/18/2004 (<http://www.abstractsonline.com/viewer/SearchResults.asp>); Eriksson, *Kidney and Blood Pressure Research* 26, 294, 2003; Jayne y col., *Kidney and Blood*

Pressure Research, 26, 294, 2003; Jayne, poster 88 (11^o Taller Internacional de vasculitis y ANCA), 2003, American Society of Nephrology; Stone y Specks en: The Clinical Trial Research Summary de the 2002-2003 Immune Tolerance Network, <http://www.immunetolerance.org/reseaTclT/autoimmune/trials/stone.html>; Leandro y col., Arthritis Rheum. 48, (supl. 9) SI 160, 2003.

Las patentes y publicaciones de patente relativas a los anticuerpos CD20 incluyen: US 5,776,456, US 5,736,137, US 5,843,439, US 6,399,061, US 6,682,734, US 2002/0197255 A1, US 2003/0021781 A1, US 2003/0082172 A1, US 2003/0095963 A1, US 2003/0147885 A1; US 6,455,043; WO 00/09160; WO 00/27428; WO 00/27433; WO 00/44788; WO 01/10462; WO 01/10461; WO 01/10460; US 2001/0018041 A1, US 2003/0180292 A1, WO 01/34194; US 2002/0006404; WO 02/04021; US 2002/0012665 A1; WO 01/74388; US 2002/0058029 A1; US 2003/0103971 A1; US 2002/0009444 A1; WO 01/80884; WO 01/97858; US 2002/0128488 A1; WO 02/34790; WO 02/060955; WO 02/096948; WO 02/079255; US 6,171,586 B1; WO 98/56418; WO 98/58964; WO 99/22764; WO 99/51642; US 6,194,551 B1; US 6,242,195 B1; US 6,528,624 B1; US 6,538,124; WO 00/42072; WO 00/67796; WO 01/03734; US 2002/0004587 A1; WO 01/77342; US 2002/0197256; US 2003/0157108 A1; US 6,565,827 B1; US 6,090,365 B1; US 6,287,537 B1; US 6,015,542; US 5,843,398; US 5,595,721; US 5,500,362; US 5,677,180; US 5,721,108; US 6,120,767; US 6,652,852 B1; US 6,410,391 B1; US 6,224,866 B1; WO 00/20864; WO 01/13945; WO 00/67795; US 2003/0133930 A1; WO 00/74718; WO 00/76542; WO 01/72333; US 6,368,596 B1; US 6,306,393; US 2002/0041847 A1; US 2003/0026801 A1; WO 02/102312; US 2003/0068664; WO 03/002607; WO 03/049694; US 2002/0009427 A1; US 2003/0185796 A1; WO 03/061694; US 2003/0219818 A1; US 2003/0219433 A1; WO 03/068821; US 2002/0136719 A1; WO 2004/032828; WO 2004/035607; US 2004/0093621; US 5,849,898; EP 0,330,191; US 4,861,579; EP 0,332,865; WO 95/03770; US 2001/0056066; WO 2004/035607; WO 2004/056312; US 2004/0093621; WO 2004/103404. Las publicaciones relativas al anticuerpo CD20 incluyen: Teeling, J. y col., Blood 10, 1182, 2004.

En WO 2014/033074 se describen lanzaderas (shuttles) que atraviesan la barrera hematoencefálica para unirse a los receptores de dicha barrera y métodos de uso de las mismas. Los anticuerpos contra receptores de baja afinidad de la barrera hematoencefálica y los usos de los mismos se describen en WO 2012/075037. En WO 2014/189973 se describen anticuerpos anti-receptor de

transferrina y métodos de uso de los mismos. Un módulo lanzadera de barrera hematoencefálica que contiene una entidad efectora del cerebro, un engarce y una entidad monovalente que se une al receptor de la barrera hematoencefálica se ha descrito en WO 2015/101588. En WO 2010/033587 se describen métodos para tratar la esclerosis múltiple progresiva de un paciente y un artículo de fabricación industrial con las instrucciones de uso. En WO 2012/096924A se describe un método para tratar, detener o prevenir una enfermedad que responda a un tratamiento con un anticuerpo anti-CD20 en un paciente que sufra dicha enfermedad, que consiste en administrar a dicho paciente por lo menos una subdosis disminuidora del anticuerpo anti-CD20. Hawker, K. y col. (Ann. Neurol. 66, 460-471, 2009) publican los resultados de un ensayo aleatorio multicentros controlado con placebo y doble ciego del rituximab en pacientes con la esclerosis múltiple primaria progresiva.

Resumen

Un aspecto aquí descrito es un anticuerpo biespecífico que contiene:

- a) un anticuerpo (de longitud completa) que contiene dos parejas, cada una de una cadena corta de anticuerpo (de longitud completa) y una cadena larga de anticuerpo (de longitud completa), en el que los sitios de unión formados por cada una de las parejas de la cadena larga (de longitud completa) y la cadena corta (de longitud completa) se unen específicamente al primer antígeno y
- b) un fragmento Fab adicional, dicho fragmento Fab adicional está fusionado con cualquier extremo C de una cadena larga del anticuerpo (de longitud completa), en el que el sitio de unión del fragmento Fab adicional se une específicamente al segundo antígeno,

en el que cada una de las cadenas cortas del anticuerpo (de longitud completa) contiene en el dominio constante de cadena corta (CL) en la posición 123 el resto aminoácido arginina (en lugar del resto ácido glutámico de tipo salvaje; mutación E123R) y en la posición 124 el resto aminoácido lisina (en lugar del resto glutamina de tipo salvaje; mutación Q124K) (numeración con arreglo a Kabat),

en el que cada una de las cadenas largas de anticuerpo (de longitud completa) contiene en el primer dominio constante de cadena larga (CH1) en la posición 147 un resto ácido glutámico (en lugar del resto lisina de tipo salvaje; mutación K147E) y

en la posición 213 un resto ácido glutámico (en lugar del resto aminoácido lisina de tipo salvaje; mutación K213E) (numeración con arreglo al índice EU de Kabat), en el que el fragmento Fab adicional, que se une específicamente al segundo antígeno, contiene un dominio entrecruzado, de tal manera que el dominio constante de cadena corta (CL) y el dominio constante 1 de cadena larga (CH1) se reemplazan entre sí y

en el que el primer antígeno es el CD20 humano y el segundo antígeno es el receptor de transferrina humano.

En una forma de ejecución, el fragmento Fab adicional está fusionado con el extremo C de la cadena larga mediante un engarce peptídico.

En una forma de ejecución, el extremo N del dominio variable de cadena larga del fragmento Fab está fusionado con el extremo C de la cadena larga (de longitud completa) o el extremo C del engarce peptídico.

En una forma de ejecución:

- a) la cadena larga (de longitud completa) que está fusionada con los fragmentos Fab adicionales tiene como restos aminoácido (de cadena larga) del extremo C el tripéptido LSP, cuyo resto prolina está fusionado directamente con el primer resto aminoácido del fragmento Fab adicional o del engarce peptídico mediante un enlace peptídico y
- b) la cadena larga (de longitud completa) que no está fusionada con los fragmentos Fab adicionales tiene como restos aminoácido (de cadena larga) del extremo C el tripéptido LSP o SPG o PGK.

En una forma de ejecución, el anticuerpo (de longitud completa) es:

- a) un anticuerpo de longitud completa de la subclase humana IgG1,
- b) un anticuerpo de longitud completa de la subclase humana IgG4,
- c) un anticuerpo de longitud completa de la subclase humana IgG1 con las mutaciones L234A, L235A y P329G,

- d) un anticuerpo de longitud completa de la subclase humana IgG4 con las mutaciones S228P, L235E y P329G,
- e) un anticuerpo de longitud completa de la subclase humana IgG1 con las mutaciones L234A, L235A y P329G en ambas cadenas largas y las mutaciones i) T366W y ii) S354C o Y349C, en una cadena larga y las mutaciones i) T366S, L368A e Y407V y ii) Y349C o S354C, en la otra cadena larga correspondiente,
- f) un anticuerpo de longitud completa de la subclase humana IgG4 con las mutaciones S228P, L235E y P329G en ambas cadenas largas y las mutaciones i) T366W y ii) S354C o Y349C, en una cadena larga y las mutaciones i) T366S, L368A e Y407V y ii) Y349C o S354C, en la otra cadena larga correspondiente,
- g) un anticuerpo de longitud completa de la subclase humana IgG1 con las mutaciones L234A, L235A, P329G, I253A, H310A y H435A en ambas cadenas largas y las mutaciones i) T366W y ii) S354C o Y349C, en una cadena larga y las mutaciones i) T366S, L368A e Y407V y ii) Y349C o S354C, en la otra cadena larga correspondiente o
- h) un anticuerpo de longitud completa de la subclase humana IgG1 con las mutaciones L234A, L235A, P329G, M252Y, S254T y T256E en ambas cadenas largas y las mutaciones i) T366W y ii) S354C o Y349C, en una cadena larga y las mutaciones i) T366S, L368A e Y407V y ii) Y349C o S354C, en la otra cadena larga correspondiente o
- i) un anticuerpo de longitud completa de la subclase humana IgG1 con las mutaciones L234A, L235A, P329G, H310A, H433A e Y436A en ambas cadenas largas y las mutaciones i) T366W y ii) S354C o Y349C, en una cadena larga y las mutaciones i) T366S, L368A e Y407V y ii) Y349C o S354C, en la otra cadena larga correspondiente.

En una forma de ejecución, el fragmento Fab adicional está fusionado con el extremo C de la cadena larga que contiene la mutación T366W, o con el extremo C de la cadena larga, que contiene las mutaciones T366S, L368A e Y407V.

En una forma de ejecución, el anticuerpo (de longitud completa) es de la subclase IgG1 humana con las mutaciones L234A, L235A y P329G en ambas cadenas largas y las mutaciones T366W y S354C en una cadena larga y las mutaciones T366S, L368A, Y407V e Y349C en la otra cadena larga correspondiente y el fragmento Fab adicional está fusionado con el extremo C de la cadena larga que contiene la mutación T366W o con el extremo C de la cadena larga, que contiene las mutaciones T366S, L368A e Y407V.

En una forma de ejecución, el anticuerpo biespecífico contiene:

- i) una cadena corta que tiene una identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 01 del 70 % o más,
- ii) una cadena larga que tiene una identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 02 del 70 % o más,
- iii) una cadena corta que tiene una identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 03 del 70 % o más y
- iv) un fragmento Fab de cadena larga que tiene una identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 04 del 70 % o más,

en el que

la SEQ ID NO: 01 tiene una secuencia de aminoácidos
DIVMTQTPLSLPVTGPGEPAISCRSSKSLHNSGITYLYWYLQKPGQSPQLLIYQMS
NLVSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQNLELPYTFGGGTKVEIKR
TVAAPSVFIFPPSDRKLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVT
EQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC,

la SEQ ID NO: 02 tiene una secuencia de aminoácidos
QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGYAFSYSWINWVRQAPGQGLEWMGRIFPG
DGD TDYNGKFKGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARNVFDGYWLVYW
GQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVTVSWNSGAL
TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDEKVEPKSC
DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFN
WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAP

IEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPE
NNYKTTTPVLDSGDSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL
SPG,

la SEQ ID NO: 03 tiene una secuencia de aminoácidos
AIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLAWYQQKPGKAPKLLIYRASTLASGV
PSRFGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQNYASSNVDNTFGGGTKVEIKSSAS
TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ
SSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC y

la SEQ ID NO: 04 tiene una secuencia de aminoácidos
QSMQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGFSLSSYAMSWIRQHPGKGLEWIGYIWSGGS
TDYASWAKSRVTISKSTTTVSLKLSSVTAADTAVYYCARRYGTSYPDYGDASGFDP
WGQGTLLTVSSASVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDN
ALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKS
FNRGEC.

Un aspecto aquí descrito es un anticuerpo biespecífico que contiene una cadena corta (de longitud completa), que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 01, una cadena larga (de longitud completa) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 02, una cadena corta (de longitud completa) que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 03 y un fragmento Fab de anticuerpo que contiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 04.

En una forma de ejecución, el anticuerpo biespecífico es monoclonal.

Un aspecto aquí descrito es un anticuerpo biespecífico que contiene:

- a) un primer y un segundo fragmentos Fab, en el que cada sitio de unión del primer y del segundo fragmentos Fab se unen específicamente al primer antígeno,
- b) un tercer fragmento Fab, en el que el sitio de unión de dicho tercer fragmento Fab se une específicamente al segundo antígeno y dicho tercer fragmento Fab contiene un dominio entrecruzado, de tal manera que el dominio variable de cadena corta (VL) y el dominio variable de cadena larga (VH) se reemplazan entre sí y

- c) un región Fc que contiene un primer polipéptido de región Fc y un segundo polipéptido de región Fc,

dichos fragmentos Fab primero y segundo contienen en cada caso un fragmento de cadena larga y una cadena corta de longitud completa,

en el que el extremo C del fragmento de cadena larga del primer fragmento Fab está fusionado con el extremo N del primer polipéptido de la región Fc,

en el que el extremo C del fragmento de cadena larga del segundo fragmento Fab está fusionado con el extremo N del dominio variable de cadena corta del tercer fragmento Fab y el extremo C del dominio constante 1 de cadena larga del tercer fragmento Fab está fusionado con el extremo N del segundo polipéptido de la región Fc,

en el que cada una de las cadenas cortas de anticuerpo de longitud completa de los fragmentos Fab primero y segundo contiene en el dominio constante de cadena corta (CL) en la posición 123 el resto aminoácido arginina (en lugar del resto ácido glutámico de tipo salvaje; mutación E123R) y en la posición 124 el resto aminoácido lisina (en lugar del resto glutamina de tipo salvaje; mutación Q124K) (numeración con arreglo a Kabat),

en el que cada uno de los fragmentos Fab primero y segundo de cadena larga contiene en el primer dominio constante de cadena larga (CH1) en la posición 147 un resto ácido glutámico (en lugar del resto lisina de tipo salvaje; mutación K147E) y en la posición 213 un resto ácido glutámico (en lugar del resto aminoácido lisina de tipo salvaje; mutación K213E) (numeración con arreglo al índice EU de Kabat),

en el que el primer antígeno es el CD20 humano y el segundo antígeno es el receptor de transferrina humano.

En una forma de ejecución, el primero y el segundo polipéptidos de la región Fc es:

- a) de la subclase IgG1 humana,
- b) de la subclase IgG4 humana,

- c) de la subclase IgG1 humana con las mutaciones L234A, L235A y P329G,
- d) de la subclase IgG4 humana con las mutaciones S228P, L235E y P329G,
- e) de la subclase IgG1 humana con las mutaciones L234A, L235A y P329G en ambos polipéptidos de la región Fc y las mutaciones T366W y S354C en un polipéptido de la región Fc y las mutaciones T366S, L368A, Y407V e Y349C en el otro polipéptido correspondiente de la región Fc,
- f) de la subclase IgG4 humana con las mutaciones S228P, L235E y P329G en ambos polipéptidos de la región Fc y las mutaciones T366W y S354C en un polipéptido de la región Fc y las mutaciones T366S, L368A, Y407V e Y349C en el otro polipéptido correspondiente de la región Fc,
- g) de la subclase IgG1 humana con las mutaciones L234A, L235A, P329G, I253A, H310A y H435A en ambos polipéptidos de la región Fc y las mutaciones T366W y S354C en un polipéptido de la región Fc y las mutaciones T366S, L368A, Y407V e Y349C en el otro polipéptido correspondiente de la región Fc o
- h) de la subclase IgG1 humana con las mutaciones L234A, L235A, P329G, M252Y, S254T y T256E en ambos polipéptidos de la región Fc y las mutaciones T366W y S354C en un polipéptido de la región Fc y las mutaciones T366S, L368A, Y407V e Y349C en el otro polipéptido correspondiente de la región Fc o
- i) de la subclase IgG1 humana con las mutaciones L234A, L235A, P329G, H310A, H433A e Y436A en ambos polipéptidos de la región Fc y las mutaciones T366W y S354C en un polipéptido de la región Fc y las mutaciones T366S, L368A, Y407V e Y349C en el otro polipéptido correspondiente de la región Fc.

En una forma de ejecución una de las cadenas del tercer fragmento Fab está fusionada con el polipéptido de la región Fc que contiene la mutación T366W o con el polipéptido de la región Fc que contiene las mutaciones T366S, L368A e Y407V.

En una forma de ejecución el anticuerpo biespecífico contiene:

- i) una cadena corta que tiene una identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 14 de por lo menos el 70 %, o por lo menos del 80 %, o por lo menos del 90 % o 95 % o más,
- ii) una cadena larga que tiene una identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 15 de por lo menos el 70 %, o por lo menos del 80 %, o por lo menos del 90 % o 95 % o más,
- iii) una cadena cruzada de anticuerpo que tiene una identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 16 de por lo menos el 70 %, o por lo menos del 80 %, o por lo menos del 90 % o 95 % o más y
- iv) una cadena larga modificada que tiene una identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 17 de por lo menos el 70 %, o por lo menos del 80 %, o por lo menos del 90 %, o del 95 % o más,

en el que:

la SEQ ID NO: 14 tiene una secuencia de aminoácidos
DIVMTQTPLSLPVTGPGEPAISCRSSKSLHNSGITYLYWYLQKPGQSPQLLIYQMS
NLVSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQNLELPYTFGGGTKVEIKR
TVAAPSVFIFPPSDRKLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVT
EQDSKDSTYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC,

la SEQ ID NO: 15 tiene una secuencia de aminoácidos
QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGYAFSYSWINWVRQAPGQGLEWMGRIFPG
DGD TDYNGKFKGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARNVFDGYWLVIYW
GQGT LVT VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVT VSWNSGAL
TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDEKVEPKSC
DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFN
WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAP

IEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPE
NNYKTTTPVLDSGDSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL
SPG,

la SEQ ID NO: 16 tiene una secuencia de aminoácidos
QSMQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGFSLSSYAMSWIRQHPGKGLEWIGYIWSGGS
TDYASWAKSRVTISKSTTTVSLKLSSVTAADTAVYYCARRYGTSYPDYGDASGFDP
WGQGLTLTVSSASVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDN
ALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKS
FNRGEC y

la SEQ ID NO: 17 tiene una secuencia de aminoácidos
QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYAFSYSWINWVRQAPGQGLEWMGRIFPG
DGD TDYNGKFKGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARNVFDGYWL VYW
GQGLTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVTVSWNSGAL
TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDEKVEPKSC
DGGGGSGGGGSAIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLAWYQQKPGKAP
KLLIYRASTLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQNYASSNVDNTF
GGG TKVEIKSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA
LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKS
CDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF
N WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALG
APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNG
QPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS
LSLSPG.

Un aspecto aquí descrito es un anticuerpo biespecífico formado por dos cadenas cortas de longitud completa, cada una de ellas que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 14, una cadena larga de longitud completa que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 15, una cadena cruzada de anticuerpo, que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 16 y una cadena larga modificada que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 17.

En una forma de ejecución, el anticuerpo biespecífico es monoclonal.

Un aspecto aquí descrito es un ácido nucleico aislado que codifica al anticuerpo biespecífico aquí descrito.

Un aspecto aquí descrito es una célula hospedante que contiene el ácido nucleico aquí descrito, que codifica al anticuerpo biespecífico aquí descrito.

Un aspecto aquí descrito es un método para producir un anticuerpo biespecífico aquí descrito, que consta de los pasos siguientes:

- a) cultivar la célula hospedante aquí descrita de modo que produzca el anticuerpo biespecífico y
- b) recuperar el anticuerpo biespecífico de la célula o del medio de cultivo y, de este modo, producir el anticuerpo biespecífico aquí descrito.

Un aspecto aquí descrito es un inmunoconjugado formado por el anticuerpo biespecífico aquí descrito y un agente citotóxico.

Un aspecto aquí descrito es una formulación farmacéutica que contiene el anticuerpo biespecífico aquí descrito y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Un aspecto aquí descrito es el anticuerpo aquí descrito para el uso como medicamento.

Un aspecto aquí descrito es el anticuerpo aquí descrito para el tratamiento del cáncer.

Un aspecto aquí descrito es el anticuerpo biespecífico aquí descrito para el uso en el tratamiento de una enfermedad proliferativa de las células B.

Un aspecto aquí descrito es el anticuerpo biespecífico aquí descrito para el uso en la inhibición del crecimiento de células tumorales que expresa el CD20. En una forma de ejecución, la inhibición se realiza en el cerebro.

Un aspecto aquí descrito es el anticuerpo biespecífico aquí descrito para el uso en el tratamiento de un carcinoma. En una forma preferida de ejecución, el carcinoma es un carcinoma de o en el cerebro.

Un aspecto aquí descrito es el anticuerpo biespecífico aquí descrito para el uso en el tratamiento de un linfoma. En una forma preferida de ejecución, el linfoma es un linfoma primario del sistema nervioso central (PCNSL).

Un aspecto aquí descrito es el anticuerpo biespecífico aquí descrito para el uso en el tratamiento de una enfermedad autoinmune. En una forma de ejecución, la enfermedad autoinmune es la esclerosis múltiple. En una forma preferida de ejecución, la enfermedad autoinmune es la esclerosis múltiple progresiva secundaria.

Un aspecto aquí descrito es el anticuerpo biespecífico aquí descrito para el uso en la disminución de las células tumorales que expresan al CD20. En una forma de ejecución, la disminución tiene lugar en el cerebro.

Un aspecto aquí descrito es el anticuerpo biespecífico aquí descrito para la disminución de las células B en circulación que expresan al CD20. En una forma de ejecución, la disminución tiene lugar en el cerebro.

Un aspecto aquí descrito es el anticuerpo biespecífico aquí descrito para la disminución de las células B secuestradas en el cerebro, que expresan al CD20.

Un aspecto aquí descrito es el uso del anticuerpo biespecífico aquí descrito para la fabricación de un medicamento.

En una forma de ejecución, el medicamento está destinado al tratamiento de una enfermedad de tipo proliferativo. En una forma de ejecución, la enfermedad de tipo proliferativo es una enfermedad proliferativa de las células B. En una forma de ejecución, la enfermedad de tipo proliferativo es un linfoma de células B. En una forma preferida de ejecución, la enfermedad de tipo proliferativo es un linfoma primario del sistema nervioso central.

En una forma de ejecución, el medicamento está destinado al tratamiento de un tumor.

En una forma de ejecución, el medicamento está destinado al tratamiento de un carcinoma humano.

En una forma de ejecución, el medicamento está destinado al tratamiento de una enfermedad autoinmune. En una forma de ejecución, la enfermedad autoinmune se elige entre el grupo formado por las respuestas inflamatorias, por ejemplo las enfermedades inflamatorias de la piel incluidas la psoriasis y la dermatitis (p. ej. la dermatitis atópica); el escleroderma sistémico y la esclerosis; las respuestas asociadas a la enfermedad del intestino inflamatorio (por ejemplo la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa); el síndrome del distrés respiratorio (incluido el síndrome del distrés respiratorio del adulto o ARDS); la dermatitis; la meningitis; la encefalitis; la uveítis; la colitis; la glomerulonefritis; los estados patológicos alérgicos, por ejemplo el eccema y el asma y otros estados patológicos en los que interviene la infiltración de células T y las respuestas inflamatorias crónicas; la aterosclerosis; la deficiencia de adhesión de leucocitos; la artritis reumatoide; el lupus eritematoso sistémico (SLE); la diabetes mellitus (p. ej. la diabetes mellitus de tipo I o la diabetes mellitus dependiente de la insulina); la esclerosis múltiple; el síndrome de Reynaud; la tiroiditis autoinmune; la encefalomiелitis alérgica; el síndrome de Sjogren; la diabetes de inicio juvenil; las respuestas inmunes asociadas con la hipersensibilidad aguda y retardada mediadas por citoquinas y linfocitos T, presentes normalmente en caso de tuberculosis, la sarcoidosis, la polimiositis, la granulomatosis y la vasculitis; la anemia perniciosa (enfermedad de Addison); las enfermedades en las que interviene la diapedesis de leucocitos; los trastornos inflamatorios del sistema nervioso central (SNC); el síndrome de la lesión de múltiples órganos; la anemia hemolítica (incluidas, pero sin limitarse a ellas: la crioglobulinemia o anemia positiva de Coombs); la miastenia grave; las enfermedades mediadas por complejos de antígeno-anticuerpo; las enfermedades de membrana basal anti-glomerular; el síndrome de anti-fosfolípidos; la neuritis alérgica; la enfermedad de Graves; el síndrome miasténico de Lambert-Eaton; el pénfigoide bulloso; el pénfigo; las poliendocrinopatías autoinmunes; la enfermedad de Reiter; el síndrome del hombre rígido; la enfermedad de Bechet; la arteritis de células gigantes; la nefritis de complejo inmune; la nefropatía de IgA; las polineuropatías de IgM; la púrpura trombocitopénica inmune (ITP) o la trombocitopenia autoinmune. En una forma de ejecución, el medicamento se destina al tratamiento de la esclerosis múltiple. En una forma preferida de ejecución, el medicamento se destina al tratamiento de la esclerosis múltiple progresiva secundaria.

En una forma de ejecución, el medicamento se destina a disminuir las células tumorales que expresan al CD20. En una forma de ejecución, la disminución tiene lugar en el cerebro.

En una forma de ejecución, el medicamento se destina a la disminución de las células B en circulación que expresan al CD20. En una forma de ejecución, la disminución tiene lugar en el cerebro.

En una forma de ejecución, el medicamento se destina a disminuir las células B secuestradas en el cerebro que expresan al CD20.

Un aspecto aquí descrito es un método para tratar un individuo que sufra una enfermedad de tipo proliferativo, que consiste en administrar a dicho individuo una cantidad eficaz del anticuerpo biespecífico aquí descrito. En una forma de ejecución, la enfermedad de tipo proliferativo es una enfermedad proliferativa de las células B.

Un aspecto aquí descrito es un método para tratar un individuo que sufra un carcinoma, que consiste en administrar a dicho individuo una cantidad eficaz del anticuerpo biespecífico aquí descrito. En una forma preferida de ejecución, el carcinoma es un carcinoma del o en el cerebro.

Un aspecto aquí descrito es un método para tratar un individuo que sufra un linfoma, que consiste en administrar a dicho individuo una cantidad eficaz del anticuerpo biespecífico aquí descrito. En una forma preferida de ejecución, el linfoma es un linfoma primario del sistema nervioso central (PCNSL).

Un aspecto aquí descrito es un método para tratar un individuo que sufra una enfermedad autoinmune, que consiste en administrar a dicho individuo una cantidad eficaz del anticuerpo biespecífico aquí descrito. En una forma de ejecución, la enfermedad autoinmune es la esclerosis múltiple. En una forma preferida de ejecución, la enfermedad autoinmune es la esclerosis múltiple progresiva secundaria.

Un aspecto aquí descrito es un método para inhibir el crecimiento de las células tumorales que expresan al CD20 en un individuo, que consiste en administrar a dicho individuo una cantidad eficaz del anticuerpo biespecífico aquí descrito para inhibir el crecimiento de las células tumorales que expresan al CD20. En una forma de ejecución, la inhibición tiene lugar en el cerebro.

Un aspecto aquí descrito es un método para disminuir las células tumorales que expresan al CD20 en un individuo, que consiste en administrar a dicho individuo una

cantidad eficaz del anticuerpo biespecífico aquí descrito para disminuir las células tumorales que expresan al CD20. En una forma de ejecución, la inhibición tiene lugar en el cerebro.

Un aspecto aquí descrito es un método para disminuir las células B en circulación que expresan al CD20 en un individuo, que consiste en administrar a dicho individuo una cantidad eficaz del anticuerpo biespecífico aquí descrito para disminuir las células B en circulación que expresan al CD20. En una forma de ejecución, la inhibición tiene lugar en el cerebro.

Un aspecto aquí descrito es un método para disminuir las células B secuestradas en el cerebro que expresan al CD20 en un individuo, que consiste en administrar a dicho individuo una cantidad eficaz del anticuerpo biespecífico aquí descrito para disminuir las células B secuestradas en el cerebro que expresan al CD20.

Un aspecto aquí descrito es un método para tratar la esclerosis múltiple en un ser humano, que consiste en administrar a dicho humano una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo aquí descrito, que se une al CD20 humano y disminuye las células B y dicho anticuerpo no está conjugado con un agente citotóxico.

Descripción detallada de las formas de ejecución de la invención

Los módulos de dimerización de botones en huecos y su uso para la ingeniería de anticuerpos se han descrito en Carter, P., Ridgway, J.B.B., Presta, L.G.: Immunotechnology, volumen 2, número 1, febrero de 1996, pp. 73-73. El puente disulfuro adicional del dominio CH3 se ha publicado en Merchant, A.M. y col., Nat. Biotechnol. 16, 677-681, 1998.

Se encontrará información general acerca de las secuencias de nucleótidos de las cadenas largas y cortas de las inmunoglobulinas humanas en: Kabat, E.A. y col., Sequencies of Proteins of Immunological Interest, 5ª ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991).

Tal como se emplean aquí, las posiciones de los aminoácidos de todas las regiones y dominios constantes de las cadenas largas y cortas se numeran con arreglo al sistema de numeración Kabat, descrito en Kabat y col., Sequencies of Proteins of Immunological Interest, 5ª ed., Public Health Service, National Institutes of Health,

Bethesda, MD (1991) y que en la presente recibe la denominación de “numeración con arreglo a Kabat”. De forma específica, el sistema de numeración de Kabat [ver páginas 647-660 de Kabat y col., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ª ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)] se emplea para el dominio constante de cadena corta CL de los isótopos kappa y lambda y se emplea el sistema de numeración por el índice EU de Kabat (ver páginas 661-723) para los dominios constantes de cadena larga (CH1, bisagra (hinge), CH2 y CH3, lo cual se clarifica también en la presente empleando la denominación “numeración con arreglo al índice EU de Kabat” en este caso).

I. Definiciones

La “barrera hematoencefálica” o “BBB” (blood-brain-barrier) indica la barrera fisiológica entre la circulación periférica y el cerebro y la médula espinal, que está formada por uniones firmes dentro de las membranas plasmáticas del endotelio capilar del cerebro, que crean una barrera hermética que restringe el transporte de moléculas al cerebro, incluso cuando las moléculas son muy pequeñas, por ejemplo las de urea (60 daltones). La BBB dentro del cerebro, la barrera entre la sangre y la médula espinal y la barrera entre la sangre y la retina son barreras capilares contiguas dentro del SNC y aquí se nombran en sentido colectivo con el nombre de barrera hematoencefálica o BBB. La BB abarca también la barrera entre la sangre y el CSF (plexo coroide), en este caso la barrera está formada por células de epéndice y no por células endoteliales de los capilares.

Los términos “anticuerpo anti-CD20 humano” y “un anticuerpo que se une específicamente al CD20 humano” indica un anticuerpo que es capaz de unirse al CD20 humano con afinidad suficiente para que el anticuerpo sea útil como agente de diagnóstico y/o de terapia dirigida contra el CD20.

Por lo tanto, el término abarca también a los anticuerpos que se unen a un fragmento más corto del CD20 humano.

Los ejemplos de anticuerpos que se unen al antígeno CD20 incluyen: el “C2B8”, que también se llama “rituximab” (“RITUXAN[®]”) (US 5,736,137); el anticuerpo murino 2B8 marcado con itrio-[90], también llamado “Y2B8” (US 5,736,137); la IgG2a murina “B1” marcada opcionalmente con I¹³¹ para generar el anticuerpo “¹³¹I-B1” (BEXXAR[™]) (US 5,595,721); el anticuerpo monoclonal murino “1F5” (Press y col.,

Blood 69, 584-591, 1987); el anticuerpo “quimérico 2H7” (US 5,677,180); los anticuerpos monoclonales L27, G28-2, 93-1B3, B-C1 o NU-B2 suministrados por el International Leucocyte Typing Workshop (Valentine y col., en: Leucocyte Typing III (McMichael, coord.) p. 440, 1987, Oxford University Press); y el anticuerpo monoclonal descrito en US 8,883,980.

El antígeno “CD20” es una fosfoproteína no glicosilada, que tiene una longitud aprox. de 35 kDa y se encuentra en la superficie de más del 90 % de las células B de la sangre periférica o órganos linfoides. El CD20 se expresa durante el desarrollo temprano de las pre-células B y permanece hasta la diferenciación de las células plasmáticas. El CD20 está presente no solo en las células B normales, sino también en las células B malignas. Otros nombres del CD20 que aparecen en la bibliografía técnica influyen el de “antígeno restringido de linfocito B” y “Bp35”. El antígeno CD20 se ha descrito por ejemplo en Clark y col., Proc. Natl. Acad. Sci USA 82, 1766, 1985. Véase también la SEQ ID NO: 05.

Una “enfermedad autoinmune” es una enfermedad o trastorno no malignos surgidos en y dirigidos contra los tejidos propios del individuo. El término “enfermedades autoinmunes” aquí empleado específicamente excluye a las enfermedades o estados patológicos malignos o cancerosos, excluyen en especial al Linfoma de células B, la leucemia linfoblástica aguda (ALL), la leucemia linfocítica crónica (CLL), la leucemia de células pilosas y la leucemia mieloblástica crónica. Los ejemplos de enfermedades o trastornos autoinmunes incluyen, pero no se limitan a: las respuestas inflamatorias, por ejemplo las enfermedades inflamatorias de la piel, incluidas la psoriasis y la dermatitis (p. ej. la dermatitis atópica); el escleroderma sistémico y la esclerosis; las respuestas asociadas a la enfermedad del intestino inflamatorio (por ejemplo la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa); el síndrome del distrés respiratorio (incluido el síndrome del distrés respiratorio del adulto o ARDS); la dermatitis; la meningitis; la encefalitis; la uveítis; la colitis; la glomerulonefritis; los estados patológicos alérgicos, por ejemplo el eccema y el asma y otros estados patológicos causados por la infiltración de células T y las respuestas inflamatorias crónicas; la aterosclerosis; la deficiencia de adhesión de leucocitos; la artritis reumatoide; el lupus eritematoso sistémico (SLE); la diabetes mellitus (p. ej. la diabetes mellitus de tipo I o la diabetes mellitus dependiente de la insulina); la esclerosis múltiple; el síndrome de Reynaud; la tiroiditis autoinmune; la encefalomielitis alérgica; el síndrome de Sjogren; la diabetes de inicio juvenil; y las respuestas inmunes asociadas a la hipersensibilidad aguda y retardada mediadas

por citoquinas y linfocitos T, presentes normalmente en caso de tuberculosis, la sarcoidosis, la polimiositis, la granulomatosis y la vasculitis; la anemia perniciosa (enfermedad de Addison); las enfermedades en las que interviene la diapédesis de leucocitos; los trastornos inflamatorios del sistema nervioso central (SNC); el síndrome de la lesión de múltiples órganos; la anemia hemolítica (incluidas, pero sin limitarse a ellas: la crioglobulinemia o anemia positiva de Coombs); la miastenia grave; las enfermedades mediadas por complejos de antígeno-anticuerpo; las enfermedades de membrana basal anti-glomerular; el síndrome de los anti-fosfolípidos; la neuritis alérgica; la enfermedad de Graves; el síndrome miasténico de Lambert-Eaton; el penfigoide bulloso; el pénfigo; las poliendocrinopatías autoinmunes; la enfermedad de Reiter; el síndrome del hombre rígido; la enfermedad de Bechet; la arteritis de células gigantes; la nefritis de complejo inmune; la nefropatía de IgA; las polineuropatías de IgM; la púrpura trombocitopénica inmune (ITP) o la trombocitopenia autoinmune, etc.

Un “antagonista” es una molécula, que, después de unirse a un marcador de superficie de célula B, destruye, mata o disminuye a las células B de un mamífero y/o interfiere en una o más funciones de las células B, p. ej. reduciendo o anticipándose a la respuesta humoral emitida por las células B. El antagonista es capaz de disminuir o agotar a las células B (es decir, reducir los niveles de células B en circulación) de un mamífero tratado con dicho antagonista. Dicha reducción puede lograrse por varios mecanismos, por ejemplo la citotoxicidad mediada por células y dependiente de anticuerpo (ADCC) y/o la citotoxicidad dependiente de complemento (CDC), la inhibición de la proliferación de las células B y/o la inducción de la muerte de las células B (p. ej. por apoptosis). Los antagonistas incluyen a los anticuerpos, los péptidos de secuencia sintética o nativa y las moléculas pequeñas que se unen a los marcadores de células B, opcionalmente conjugadas o fusionadas con un agente citotóxico.

Los antagonistas “inhibidores del crecimiento” son aquellos que previenen o reducen la proliferación de una célula que expresa un antígeno, al que se une el antagonista. Por ejemplo, el antagonista puede prevenir o reducir la proliferación de células B “in vitro” y/o “in vivo”.

Los antagonistas que “inducen la apoptosis” son los que inducen la muerte celular programada, p. ej. de una célula B, determinada por ensayos estándar de apoptosis, por ejemplo la unión a la anexina V, la fragmentación del DNA, la contracción celular,

la dilatación del retículo endoplasmático, la fragmentación celular y/o la formación de vesículas en la membrana (llamadas cuerpos apoptóticos).

Un antagonista “que se une” a un antígeno de interés, p. ej. un marcador de superficie de células B, es aquel que es capaz de unirse a dicho antígeno con una afinidad y/o aidez suficiente para que el antagonista sea útil como agente terapéutico y se dirija contra una célula que se expresa en el antígeno.

El “sistema nervioso central” o “SNC” indica el complejo de tejidos nerviosos, que controlan las funciones del organismo e incluye al cerebro y la médula espinal.

Un “receptor de la barrera hematoencefálica” (abreviado aquí con “BBBR”) es una proteína de receptor fijados sobre la membrana extracelular, expresado en las células endoteliales del cerebro, que es capaz de transportar las moléculas a través de la BBB o de emplearse para el transporte de moléculas administradas en modo exógeno. Los ejemplos de BBBR incluyen en este caso: el receptor de transferrina (TfR), el receptor de insulina, el receptor del factor de crecimiento de tipo insulina (IGF-R), los receptores de lipoproteínas de baja densidad, que incluyen sin limitación la proteína 1 afín al receptor de lipoproteínas de baja densidad (LRP1) y la proteína 8 afín al receptor de lipoproteínas de baja densidad (LRP8) y el factor de crecimiento similar al factor de crecimiento epidérmico que se une a la heparina (HB-EGF). Un BBBR preferido es el receptor de transferrina (TfR).

El “receptor de transferrina” (“TfR”) es una glicoproteína transmembrana (de un peso molecular aproximado de 180.000 Da), formada por dos subunidades enlazadas mediante puente disulfuro (cada una de ellas de un peso molecular aparente aproximado de 90.000 Da), que interviene en la absorción de hierro por parte de los vertebrados. En una forma de ejecución, la TfR aquí mencionada es la TfR humana que contiene la secuencia de aminoácidos descrita por ejemplo por Schneider y col. (Nature 311, 675-678, 1984).

Un “anticuerpo multiespecífico” indica un anticuerpo que tiene especificidades de unión al menos con dos epítopes diferentes de un mismo antígeno o de dos antígenos diferentes. Los anticuerpos multiespecíficos ilustrativos pueden unirse no solo a un BBBR sino también a un antígeno del cerebro. Los anticuerpos multiespecíficos pueden obtenerse en forma de anticuerpos de longitud completa o fragmentos de anticuerpo (p. ej. F(ab')₂ de anticuerpos biespecíficos) o

combinaciones de los mismos (p. ej. anticuerpo de longitud completa más los fragmentos scFv o Fab adicionales). Ya se han publicado anticuerpos de ingeniería con dos, tres o más (p. ej. cuatro) sitios funcionales de unión con un antígeno (ver, p. ej. US 2002/0004587 A1).

Un “armazón de aceptor humano” para los fines presentes es un armazón que contiene la secuencia de aminoácidos de un armazón de un dominio variable de cadena corta (VL) o un armazón de un dominio variable de cadena larga (VH), derivados de un armazón de inmunoglobulina humana o un armazón de consenso humano, definidos a continuación. Un armazón de aceptor humano “derivado de” un armazón de inmunoglobulina humana o de un armazón de consenso humano puede contener la misma secuencia de aminoácidos de los mismos o puede contener cambios en la secuencia de aminoácidos. En algunas formas de ejecución, el número de cambios de aminoácidos son 10 o menos, 9 o menos, 8 o menos, 7 o menos, 6 o menos, 5 o menos, 4 o menos, 3 o menos, o 2 o menos. En algunas formas de ejecución, el armazón de aceptor humano VL es idéntico en su secuencia a la secuencia de armazón de la inmunoglobulina VL humana o a la secuencia de armazón de consenso humano.

“Afinidad” indica la fuerza de la suma total de las interacciones no covalentes entre un sitio de unión individual de una molécula (p. ej. un anticuerpo) y su reactivo opuesto (p. ej. un antígeno). A menos que se indique lo contrario, tal como se emplea aquí, la “afinidad de unión” se refiere a la afinidad de unión intrínseca que refleja una interacción 1:1 entre los miembros de una pareja de unión (p. ej. anticuerpo y antígeno). La afinidad de una molécula X para su reactivo opuesto Y puede representarse en general mediante la constante de disociación (k_d). La afinidad puede determinarse por métodos habituales ya conocidos de la técnica, por ejemplo la resonancia de plasmones de superficie e incluidos los aquí descritos.

Un anticuerpo “madurado en afinidad” indica un anticuerpo con una o más alteraciones en una o más regiones hipervariables (HVR), si se compara con un anticuerpo original, que no presenta tales alteraciones, dichas alteraciones se traducen en una mejora de la afinidad del anticuerpo con su o sus antígenos.

El término “anticuerpo” se emplea aquí en el sentido más amplio y abarca varias estructuras de anticuerpo, incluidos, pero sin limitarse a ellos, los anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales y anticuerpos multiespecíficos (p. ej.

anticuerpos biespecíficos), en el supuesto de que desplieguen la actividad deseada de unión al antígeno.

La expresión “citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC)” es un función mediada por la unión al receptor de Fc e indica la lisis de células diana por acción de un anticuerpo aquí descrito en presencia de células efectoras. La ADCC se determina en una forma de ejecución por el tratamiento de una preparación de CD19 que se expresa en células eritroides (p. ej. células K562 que expresan el CD19 humano recombinante) con un anticuerpo aquí descrito en presencia de células efectoras, por ejemplo las PBMC (células mononucleadas de la sangre periférica) recién aisladas o células efectoras purificadas a partir de la capa leucocitaria (buffy coats), por ejemplo los monocitos o células asesinas naturales NK (natural killer). Se marcan las células diana con Cr^{51} y a continuación se incuban con el anticuerpo. Se incuban las células marcadas con células efectoras y se analiza el Cr^{51} liberado en el líquido sobrenadante. Los controles incluyen la incubación de las células endoteliales diana con células efectoras, pero sin el anticuerpo. La capacidad del anticuerpo para inducir la ADCC que media en los pasos iniciales se investiga determinando su unión con las células que expresan a los receptores de Fc γ , por ejemplo las células, que expresan de modo recombinante al Fc γ RI y/o Fc γ RIIA o a las células NK (que expresan esencialmente al Fc γ RIIA). En una forma preferida de ejecución se determina la unión del Fc γ R con las células NK.

Un “fragmento de anticuerpo” indica una molécula distinta de un anticuerpo intacto, que contiene una porción de un anticuerpo intacto que se une con el antígeno, al que se une dicho anticuerpo intacto. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen, pero no se limitan al Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂; diacuerpos; anticuerpos lineales; moléculas de anticuerpo de cadena simple (p. ej. scFv); y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpo.

El término “anticuerpo quimérico” indica un anticuerpo, en el que una porción de la cadena larga y/o corta deriva de una fuente o especie particular, mientras que el resto de la cadena larga y/o corta deriva de otra fuente o especie diferente.

La “clase” de un anticuerpo indica el tipo de dominio constante o región constante que presenta su cadena larga. Hay cinco clases principales de anticuerpos: IgA, IgD, IgE, IgG y IgM y varios de ellos pueden dividirse además en subclases (isotipos), p. ej. IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ y IgA₂. Los dominios constantes de cadena larga que

corresponden a las diferentes clases de inmunoglobulinas se denominan α , δ , ϵ , γ y μ , respectivamente.

El término “agente citotóxico” se emplea aquí para indicar una sustancia que inhibe o previene una función celular y/o provoca la muerte o destrucción de la célula. Los agentes citotóxicos incluyen, pero no se limitan a los isótopos radiactivos (p. ej. At^{211} , I^{131} , I^{125} , Y^{90} , Re^{186} , Re^{188} , Sm^{153} , Bi^{212} , P^{32} , Pb^{212} y los isótopos radiactivos del Lu); los agentes o fármacos quimioterapéuticos (p. ej. metotrexato, adriamicina, alcaloides de la vinca (vincristina, vinblastina, etopósido), doxorubicina, melfalan, mitomicina C, clorambucilo, daunorrubicina y otros agentes de inserción o intercalados); agentes inhibidores del crecimiento; enzimas y fragmentos de las mismas, por ejemplo las enzimas nucleolíticas; antibióticos; toxinas, por ejemplo las toxinas de molécula pequeña o las toxinas de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal que despliegan actividad enzimática, incluidos los fragmentos y/o variantes de las mismas; y los diversos agentes antitumorales o anticancerosos descritos a continuación.

La expresión “citotoxicidad dependiente de complemento (CDC)” indica la lisis de las células inducida por el anticuerpo aquí descrito en presencia de un complemento. La CDC se determina en una forma de ejecución mediante el tratamiento de células endoteliales humanas que expresan el CD19 con un anticuerpo aquí descrito en presencia de complemento. En una forma de ejecución se marcan las células con calceína. Existe CDC si el anticuerpo induce la lisis del 20 % o más de las células diana en una concentración de 30 $\mu\text{g/ml}$. La unión con el factor de complemento C1q puede determinarse mediante un ensayo ELISA. En este ensayo se recubre en principio una placa ELISA con intervalos de concentración del anticuerpo, al que se añaden el C1q humano purificado o suero humano. La unión del C1q se detecta con un anticuerpo dirigido contra el C1q y después con un conjugado marcado con peroxidasa. La detección de la unión (unión máxima = $B_{\text{máx}}$) puede medirse en forma de densidad óptica a 405 nm (OD405) para el sustrato de peroxidasa ABTS® (2,2'-azino-di-[3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato (6)]).

Las “funciones efectoras” indican aquellas actividades biológicas atribuibles a la región Fc de un anticuerpo, que varían con la clase de anticuerpo. Los ejemplos de funciones efectoras de anticuerpo incluyen: la unión al C1q y la citotoxicidad dependiente de complemento (CDC); la unión al receptor de Fc; citotoxicidad

mediada por células y dependiente de anticuerpo (ADCC); la fagocitosis; la regulación decreciente de los receptores de superficie celular (p. ej. receptor de células B); y activación de las células B.

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

El entrecruzamiento de receptores de la región Fc de los anticuerpos IgG (FcγR) desencadena una gran variedad de funciones efectoras, incluidas la fagocitosis, la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo y la liberación de mediadores inflamatorios, así como la eliminación de complejos inmunes y la regulación de la producción de anticuerpos. En los seres humanos, se han caracterizado tres clases de FcγR, que son las siguientes:

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

- El FcγRII (CD32) se une a los complejos de IgG con una afinidad entre media y baja y se expresa ampliamente. Este receptor puede dividirse en dos subtipos: el FcγRIIA y el FcγRIIB. El FcγRIIA se ha encontrado en muchas células que participan en la destrucción (muerte) (p. ej. macrófagos, monocitos, neutrófilos) y parece capaz de activar el proceso de destrucción. El FcγRIIB parece desempeñar un papel en los procesos de inhibición y se encuentra en las células B, macrófagos, mastocitos y eosinófilos. En las células B parece funcionar para suprimir todavía más la producción de la inmunoglobulina y la desviación de los isotipos por ejemplo hacia la clase IgE. En los macrófagos, el FcγRIIB actúa inhibiendo la fagocitosis mediada por el FcγRIIA. En los eosinófilos y mastocitos, la forma B puede ayudar a suprimir la activación de estas células mediante la unión de la IgE con su receptor separado. Una menor unión con el FcγRIIA se ha encontrado p. ej. en el caso de los anticuerpos que tienen una región Fc de IgG con mutaciones al menos en uno de los restos aminoácido E233-G236, P238, D265, N297, A327, P329, D270, Q295, A327, R292 y K414 (numeración con arreglo al índice EU de Kabat).
- El FcγRIII (CD16) se une a la IgG con una afinidad entre media y baja y se presenta en dos tipos. El FcγRIIIA se ha encontrado en las células NK, macrófagos, eosinófilos y algunos monocitos y células T y media la ADCC. El FcγRIIIB se expresa en gran manera en los neutrófilos. Se ha encontrado una unión reducida con el FcγRIIIA p. ej. en el caso de los anticuerpos que contienen una región Fc de IgG con mutación al menos en uno de los restos aminoácido E233-G236, P238, D265, N297, A327, P329, D270, Q295, A327, S239, E269, E293, Y296, V303, A327, K338 y D376 (numeración con arreglo al índice EU de Kabat).

El mapeo de los sitios de unión de la IgG1 humana para los receptores de Fc, los sitios de mutación recién mencionados y los métodos para medir la unión con el FcγRI y el FcγRIIA se han descrito en Shields, R.L. y col., J. Biol. Chem. 276, 6591-6604, 2001.

Una “cantidad eficaz” de un agente, p. ej. de una formulación farmacéutica, indica una cantidad eficaz en las dosis y períodos de tiempo, necesaria para lograr el resultado terapéutico o profiláctico deseado.

El término “receptor de Fc” se emplea aquí para indicar los receptores de activación caracterizados por la presencia de una secuencia ITAM citoplasmática asociada con el receptor (ver p. ej. Ravetch, J.V. y Bolland, S., *Annu. Rev. Immunol.* 19, 275-290, 2001). Tales receptores son el FcγRI, el FcγRIIA y el FcγRIIIA. El término “sin unión de FcγR” indica que, en una concentración de anticuerpo de 10 µg/ml, la unión de un anticuerpo aquí descrito con las células NK es del 10 % o menos de la unión que se encuentra para el anticuerpo LC.001 anti-OX40L descrito en el documento WO 2006/029879.

La IgG4 presenta una unión reducida con el FcR, mientras que los anticuerpos de otras subclases de IgG presentan uniones fuertes. Sin embargo, el Pro238, Asp265, Asp270, Asn297 (pérdida del hidrato de carbono de Fc), Pro329 y 234, 235, 236 y 237 Ile253, Ser254, Lys288, Thr307, Gln311, Asn434 y His435 son restos que proporcionan una unión con el FcR alterada pero reducida (Shields, R.L. y col., *J. Biol. Chem.* 276, 6591-6604, 2001; Lund, J. y col., *FASEB J.* 9, 115-119, 1995; Morgan, A. y col., *Immunology* 86, 319-324, 1995; y EP 0 307 434). En una forma de ejecución, el anticuerpo aquí descrito es de la subclase IgG1 o IgG2 y contiene la mutación PVA236, GLPSS331 y/o L234A/L235A. En una forma de ejecución, el anticuerpo aquí descrito es de la subclase IgG4 y contiene la mutación L235E. En una forma de ejecución, el anticuerpo contiene además la mutación S228P.

El término “región Fc” se emplea aquí para definir una región del extremo C de una cadena larga de inmunoglobulina, que contiene al menos una porción de la región constante. El término incluye las regiones Fc de la secuencia nativa y las regiones Fc variantes. En una forma de ejecución, una región Fc de cadena larga de IgG humana se extiende desde el Cys226 o desde el Pro230 hasta el extremo carboxilo de la cadena larga. No obstante, la lisina del extremo C (Lys447) de la región Fc puede estar presente o no.

En una forma de ejecución, los anticuerpos aquí descritos contienen como región Fc una región Fc derivada de origen humano. En una forma de ejecución, la región Fc contiene todas las partes de la región constante humana. La región Fc de un anticuerpo participa directamente en la activación de complemento, la unión con el C1q, la activación de C3 y la unión con el receptor de Fc. La influencia de un anticuerpo en el sistema de complemento depende de ciertas condiciones, mientras que la unión con el C1q viene provocada por sitios de unión definidos de la región Fc. Tales sitios de unión ya son conocidos en el estado de la técnica y se han

descrito p. ej. en Lukas, T.J. y col., J. Immunol. 127, 2555-2560, 1981; Brunhouse, R. y Cebra, J.J., Mol. Immunol. 16, 907-917, 1979; Burton, D.R. y col., Nature 288, 338-344, 1980; Thommesen, J.E. y col., Mol. Immunol. 37, 995-1004, 2000; Idusogie, E.E. y col., J. Immunol. 164, 4178-4184, 2000; Hezareh, M. y col., J. Virol. 75, 12161-12168, 2001; Morgan, A. y col., Immunology 86, 319-324, 1995; y EP 0 307 434. Tales sitios de unión son p. ej. el L234, L235, D270, N297, E318, K320, K322, P331 y P329 (numeración con arreglo al índice EU de Kabat). A menos que aquí se especifique otra cosa, la numeración de los restos aminoácido de la región Fc o de la región constante se efectúa con arreglo al sistema de numeración también llamado índice EU descrito por Kabat, E.A. y col., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991), publicación NIH 91-3242). Los anticuerpos de las subclases IgG1, IgG2 e IgG3 normalmente presentan la activación de complemento, la unión al C1q y la activación de C3, mientras que la IgG4 no activa el sistema de complemento, no se une al C1q y no activa el C3.

Una “región Fc de un anticuerpo” es una expresión bien conocida por los expertos y se define en base de la descomposición de los anticuerpos causada por la papaína. En una forma de ejecución, la región Fc es una región Fc humana. En una forma de ejecución, la región Fc es de la subclase IgG4 humana, que contiene las mutaciones S228P y/o L235E (numeración con arreglo al índice EU de Kabat). En una forma de ejecución, la región Fc es de la subclase IgG1 humana, que contiene las mutaciones L234A y L235A (numeración con arreglo al índice EU de Kabat).

El “armazón” o “FR” indica los restos del dominio variable que son diferentes de los restos de la región hipervariable (HVR). El FR de un dominio variable está formado en general por cuatro dominios FR: el FR1, FR2, FR3 y FR4. Por consiguiente, las secuencias de la HVR y del FR aparecen por lo general en la secuencia siguiente de la VH (o VL): FR1-H1(L1)-FR2-H2(L2)-FR3-H3(L3)-FR4.

Los términos “anticuerpo de longitud completa”, “anticuerpo intacto” y “anticuerpo entero” se emplean aquí indistintamente para indicar un anticuerpo que tiene una estructura sustancialmente similar a una estructura de anticuerpo nativo o que tiene cadenas largas que contienen una región Fc aquí definida. Un “anticuerpo de longitud completa” es un anticuerpo que contiene una región variable de unión al antígeno de cadena corta y de cadena larga (VL, VH) así como un dominio constante de cadena corta (CL) y dominios constantes de cadena larga, CH1, CH2 y

CH3. Los dominios constantes pueden ser dominios constantes de la secuencia nativa (p. ej. dominios constantes de la secuencia nativa humana) o variantes de las secuencias de aminoácidos de los mismos. Con mayor detalle, un anticuerpo de longitud completa contiene dos cadenas cortas de anticuerpo (cada una de ellas contiene un dominio variable de una cadena corta y un dominio constante de cadena corta) y dos cadenas largas de anticuerpo (cada una de ellas contiene un dominio variable de una cadena larga, una región de bisagra y los dominios constantes de cadena larga CH1, CH2 y CH3). Los restos aminoácido K o GK del extremo C pueden estar presentes o no, con independencia entre sí, en las dos cadenas largas de un anticuerpo de longitud completa.

Los términos “célula hospedante”, “línea de células hospedantes” y “cultivo de célula hospedante” se emplean indistintamente e indican las células, en las que puede introducirse un ácido nucleico exógeno, incluida la progenie de dichas células. Las células hospedantes incluyen a las células “transformantes” y “transformadas”, que incluyen a la célula transformada primaria y la progenie derivada de la misma, con independencia del número de pasos. La progenie puede que no sea completamente idéntica en contenido de ácido nucleico con la célula original, pero puede contener mutaciones. Se incluye aquí la progenie mutante que tiene la misma función o actividad biológica que la explorada o seleccionada para la célula transformada originalmente.

Un “armazón humano de consenso” es un armazón que representa los restos aminoácido presentes con mayor frecuencia en una selección de las secuencias de armazón VL o VH de las inmunoglobulinas humanas. En general, la selección de las secuencias VL o VH de inmunoglobulina humana se efectúa a partir de un subgrupo de secuencias de dominio variable. En general, el subgrupo de secuencias es un subgrupo definido en Kabat, E.A. y col., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ª ed., Bethesda MD (1991), publicación NIH 91-3242, vols. 1-3. En una forma de ejecución, para la VL, el subgrupo es el subgrupo kappa I definido en Kabat y col., lugar citado. En una forma de ejecución, para la VH, el subgrupo es el subgrupo III definido en Kabat y col., lugar citado.

Un “anticuerpo humanizado” indica un anticuerpo quimérico que contiene restos aminoácido de las HVR no humanas y restos aminoácido de FR humanos. En ciertas formas de ejecución, un anticuerpo humanizado contendrá sustancialmente todos los, o al menos uno y normalmente dos, dominios variables, en los que todos o

sustancialmente todos las HVR (p. ej. las CDR) corresponden a los que un anticuerpo no humano y todos o sustancialmente todos los FR corresponden a los que un anticuerpo humano. Un anticuerpo humanizado puede contener opcionalmente al menos una porción de una región constante de anticuerpo derivada de un anticuerpo humano. Una “forma humanizada” de un anticuerpo, p. ej. un anticuerpo no humano, indica un anticuerpo que ha sufrido una humanización.

El término “región hipervariable” o “HVR” se emplea aquí para indicar cada una de las regiones de un dominio variable de anticuerpo que contiene tramos del resto aminoácido, que son de secuencia hipervariable (“regiones determinantes de complementariedad” o “CDR”) y/o forman bucles estructuralmente definidos (“bucles hipervariables”) y/o contienen los restos de contacto con el antígeno (“contactos con el antígeno”). En general, los anticuerpos contienen seis HVR; tres en la VH (H1, H2, H3) y tres en la VL (L1, L2, L3).

Las HVR incluyen:

- (a) los bucles hipervariables que aparecen en los restos aminoácido 26-32 (L1), 50-52 (L2), 91-96 (L3), 26-32 (H1), 53-55 (H2) y 96-101 (H3) (Chothia, C. y Lesk, A.M., J. Mol. Biol. 196, 901-917, 1987);
- (b) los CDR que aparecen en los restos aminoácido 24-34 (L1), 50-56 (L2), 89-97 (L3), 31-35b(H1), 50-65 (H2) y 95-102 (H3) (Kabat, E.A. y col., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD(1991), publicación NIH 91-3242);
- (c) los contactos con el antígeno que aparecen en los restos aminoácido 27c-36 (L1), 46-55 (L2), 89-96 (L3), 30-35b (H1), 47-58 (H2) y 93-101 (H3) (MacCallum y col., J. Mol. Biol. 262, 732-745, 1996); y
- (d) las combinaciones de (a), (b) y/o (c), incluidos los restos aminoácido 46-56 (L2), 47-56 (L2), 48-56 (L2), 49-56 (L2), 26-35 (H1), 26-35b (H1), 49-65 (H2), 93-102 (H3) y 94-102 (H3).

A menos que se indique otra cosa, los restos de las HVR y otros restos del dominio variable (p. ej. los restos FR) se numeran con arreglo a Kabat y col., lugar citado.

Un “inmunokonjugado” es un anticuerpo conjugado con una o más moléculas heterólogas, incluido, pero sin limitarse a él, un agente citotóxico.

Un “individuo” o “sujeto” es un mamífero. Los mamíferos incluyen, pero no se limitan a: los animales domesticados (p. ej. vacas, ovejas, gatos, perros y caballos), los primates (p. ej. los humanos y los primates no humanos, por ejemplo los monos), conejos y roedores (p. ej. ratones y ratas). En ciertas formas de ejecución, el individuo o sujeto es un ser humano.

Un “anticuerpo aislado” es aquel que se ha separado de un componente de su entorno natural. En algunas formas de ejecución, un anticuerpo se purifica hasta un grado superior al 95 % o 99 % de pureza, determinada por ejemplo por métodos electroforéticos (p. ej. SDS-PAGE, enfoque isoelectrico (IEF), electroforesis capilar) o cromatográficos (p. ej. intercambio iónico o HPLC en fase inversa). Una revisión de los métodos de evaluación de la pureza de los anticuerpos se encontrará p. ej. en Flatman, S. y col., J. Chromatogr. B 848, 79-87, 2007.

Un ácido nucleico “aislado” indica una molécula de ácido nucleico molécula que se ha separado de un componente de su entorno natural. Un ácido nucleico aislado incluye una molécula de ácido nucleico contenida en células que normalmente contienen dicha molécula de ácido nucleico, pero la molécula de ácido nucleico está presente en el exterior del cromosoma o en una posición del cromosoma que es diferente de su posición natural en el cromosoma.

Un “ácido nucleico aislado que codifica a un anticuerpo anti-CD20 humano/receptor de transferrina humano” indica una o más moléculas de ácido nucleico que codifican a las cadenas largas y/o cortas (o fragmentos de las mismas) del anticuerpo, incluidas la o las moléculas de ácido nucleico de un vector individual o de vectores separados y dicha o dichas moléculas de ácido nucleico están presentes en una o más ubicaciones de una célula hospedante.

El término “anticuerpo monoclonal” se emplea aquí para indicar un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que forman la población son idénticos y/o se unen al mismo epítipo, excepto en el caso de posibles variantes de anticuerpos, p. ej. los que contienen mutaciones de origen natural o que aparecen durante la producción de un anticuerpo monoclonal, tales variantes estarán presentes por lo general en

cantidades menores. A diferencia de las obtenciones de anticuerpos policlonales, que normalmente incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítopes), cada anticuerpo monoclonal de una obtención de anticuerpos monoclonales está dirigido contra un determinante individual de un antígeno. Por tanto, el modificador “monoclonal” indica el carácter del anticuerpo obtenido a partir de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos y no se debe construir como producción de anticuerpo que requiera un método concreto especial. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales que pueden emplearse según la presente invención pueden obtenerse por un gran número de técnicas, incluidos pero sin limitarse a ellos: el método del hibridoma, los métodos de DNA recombinante, los métodos de presentación de fago (phage-display) y los métodos, en los que se emplean animales transgénicos que contienen todos o una parte de los lugares (loci) de la inmunoglobulina humana, aquí se describen estos métodos y otros métodos ilustrativos de obtención de anticuerpos monoclonales.

Un “anticuerpo desnudo” indica un anticuerpo que no está conjugado con un resto heterólogo (p. ej. un resto citotóxico) ni con una etiqueta radiactiva. El anticuerpo desnudo puede estar presente en una formulación farmacéutica.

Los “anticuerpos nativos” indican moléculas de inmunoglobulina de origen natural con estructuras variables. Por ejemplo, los anticuerpos IgG nativos son glicoproteínas heterotetraméricas de aprox. 150.000 daltones, compuestas por dos cadenas cortas y dos cadenas largas idénticas, que están unidas mediante puentes disulfuro. Del extremo N al C, cada cadena larga tiene una región variable (VH), también llamada dominio largo variable o dominio variable de cadena larga, seguida por tres dominios constantes (CH1, CH2 y CH3), y entre el primer dominio constante y el segundo está situada una región de bisagra. De modo similar, del extremo N al C, cada cadena corta tiene una región variable (VL), también llamada dominio corto variable o dominio variable de cadena corta, seguido por un dominio corto constante (CL). La cadena corta de un anticuerpo puede asignarse a uno de dos tipos, llamados kappa (κ) y lambda (λ), en base a la secuencia de aminoácidos de su dominio constante.

El término “prospecto” se emplea para indicar las instrucciones incluidas habitualmente en los envases comerciales de los productos terapéuticos, que contienen información sobre las indicaciones, uso, dosificación, administración,

terapia de combinación, contraindicaciones y/o avisos relativos al uso de tales productos terapéuticos.

El “porcentaje (%) de identidad de secuencias de aminoácidos” con respecto a una secuencia de polipéptido de referencia se define como el porcentaje de restos aminoácido de una secuencia candidata que son idénticos con los restos aminoácido de la secuencia de polipéptido de referencia, después de haber alineado las secuencias e introducido ranuras (brechas), si fuera necesario, para lograr el porcentaje máximo de identidad de secuencias y sin considerar ninguna sustitución conservadora como parte de la identidad de secuencias. El alineado con fines de determinar el porcentaje de identidad de secuencias de aminoácidos puede llevarse a cabo por varios métodos, que ya son conocidos en la técnica, por ejemplo, el uso de programas informáticos de dominio público, como son los programas BLAST, BLAST-2, ALIGN o Megalign (DNASTAR). Los expertos pueden determinar los parámetros apropiados para alinear las secuencias, incluidos los algoritmos requeridos para conseguir el alineado máximo a lo largo de la longitud completa de las secuencias a comparar. Sin embargo, para los fines presentes, el % de los valores de la identidad de las secuencias de aminoácidos se generan empleando el programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2. El programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2 es propiedad de la empresa Genentech, Inc. y el código de fuente tiene que rellenarse con la documentación de usuario en la oficina de propiedad intelectual de EE.UU. (= U.S. Copyright Office), Washington D.C., 20559, donde se halla registrado con el número de U.S. Copyright Registration No. TXU510087. El programa ALIGN-2 es accesible públicamente, suministrado por Genentech, Inc., South San Francisco, California, o puede compilarse a partir del código de fuente. El programa ALIGN-2 debería compilarse para el uso en un sistema operativo UNIX, incluido el UNIX digital V4.0D. Todos los parámetros de comparación de secuencias se han establecidos en el programa ALIGN-2 y no varían.

En las situaciones, en las que se emplea el ALIGN-2 para la comparación de las secuencias de aminoácidos, el % de identidad de secuencias de aminoácidos de una secuencia determinada de aminoácidos A con respecto, frente o contra una secuencia determinada de aminoácidos B (que como alternativa puede expresarse como una secuencia determinada de aminoácidos A que tiene o contiene un cierto % de identidad de secuencia de aminoácidos con respecto, frente o contra una secuencia determinada de aminoácidos B) se calcula del modo siguiente:

100 veces la fracción X/Y

en la que X es el numero de restos aminoácido puntuados como encajes idénticos por el programa de alineado de secuencias ALIGN-2 en el alineado de A y B realizado por el programa y en la que Y es el número total de restos aminoácido de B. Se apreciará que cuando la longitud de secuencia de aminoácidos de A no es igual a la longitud de secuencia de aminoácidos B, el % de identidad de secuencias de aminoácidos entre A y B no será igual al % de identidad de secuencias de aminoácidos entre B y A. A menos que se especifique explícitamente otra cosa, todos los % de valores de identidad de secuencias de aminoácidos aquí empleados se obtienen del modo descrito en el párrafo inmediatamente anterior empleando el programa informático ALIGN-2.

El término “formulación farmacéutica” indica una preparación que se presenta en una forma tal que permite la actividad biológica de un ingrediente activo contenido en ella para ser eficaz y que no contiene otros componentes adicionales que tengan una toxicidad inaceptable para el sujeto al que se pretende administrar dicha formulación.

Un “vehículo farmacéuticamente aceptable” indica un ingrediente de una formulación farmacéutica, diferente del ingrediente activo, que no es tóxico para el sujeto. Un vehículo farmacéuticamente aceptable incluye, pero no se limita a: un tampón, excipiente, estabilizante o conservante.

Tal como se emplea aquí, “tratamiento” (y las variantes gramaticales del mismo, como son “tratar” o “tratando”) indica una intervención clínica con el fin de alterar el curso natural del individuo a tratar y que puede llevarse a cabo como profilaxis o durante el curso de la patología clínica. Los efectos deseables del tratamiento incluyen, pero no se limitan a: prevenir la aparición o la recurrencia de una enfermedad, el alivio de los síntomas, la disminución de cualquier consecuencia patológica directa o indirecta de una enfermedad, la prevención de las metástasis, la disminución de la velocidad de progreso de la enfermedad, la mejora o la paliación del estado patológico y la remisión o mejora del pronóstico. En algunas formas de ejecución, los anticuerpos aquí descritos se emplean para retrasar el desarrollo de una enfermedad o para frenar el progreso de una enfermedad.

El término “región variable” o “dominio variable” indica el dominio de una cadena larga o corta de un anticuerpo que interviene en la unión del anticuerpo con el antígeno. Los dominios variables de la cadena larga y de la cadena corta (VH y VL, respectivamente) de un anticuerpo nativo tienen por lo general estructuras similares, cada dominio tiene cuatro regiones de armazón (FR) conservadas y tres regiones hipervariables (HVR) (ver, p. ej. Kindt, T.J. y col., Kuby Immunology, página 91, 2007, 6ª ed., W.H. Freeman y Co., N.Y.). Un solo dominio VH o VL puede ser suficiente para conferir la especificidad de unión con un antígeno. Además, los anticuerpos que se unen a un antígeno concreto pueden aislarse empleando un dominio VH o VL de un anticuerpo que se une al antígeno para explorar una biblioteca de dominios VL o VH complementarios, respectivamente (ver, p. ej. Portolano, S. y col., J. Immunol. 150, 880-887, 1993; Clackson, T. y col., Nature 352, 624-628, 1991).

El término “vector” se emplea aquí para indicar una molécula de ácido nucleico capaz de propagar otro ácido nucleico al que está unido. El término incluye al vector como estructura de ácido nucleico autorreplicante así como al vector incorporado al genoma de una célula hospedante, en la que tiene que introducirse. Ciertos vectores son capaces de dirigir la expresión de los ácidos nucleicos, a los que están operativamente unidos. Tales vectores se denominan aquí “vectores de expresión”.

El término “agente inmunosupresor” aquí empleado para la terapia de combinación indica las sustancias que actúan para suprimir o enmascarar el sistema inmune de un mamífero que se trata con dichas sustancias. Podría incluir aquellas sustancias que suprimen la producción de citoquinas, regulan en sentido decreciente o suprimen la expresión del auto-antígeno o enmascaran a los antígenos MHC. Los ejemplos de tales agentes incluyen a las 2-amino-6-aryl-pirimidinas sustituidas en posición 5 (ver US 4,665,077); la azatioprina; la ciclofosfamida; la bromocriptina; el danazol; la dapsona; el glutaraldehído (que enmascara a los antígenos MHC, tal como se ha descrito en US 4,120,649); los anticuerpos anti-idiotípicos de los antígenos MHC y fragmentos de MHC; la ciclosporina A; los esteroides, por ejemplo los glucocorticosteroides, p. ej., prednisona, metilprednisolona y dexametasona; las citoquinas y los antagonistas de receptores de citoquinas, incluidos los anticuerpos anti-interferona- γ , - β o - α , los anticuerpos anti-factor de necrosis tumoral α , los anticuerpos anti-factor de necrosis tumoral β , los anticuerpos anti-interleucina-2 y los anticuerpos anti-receptor de IL-2; los anticuerpos anti-LFA-1, incluidos los anticuerpos anti-CD11a y anti-CD18; los anticuerpos anti-L3T4; la globulina heteróloga anti-linfocito; los anticuerpos pan-T, con preferencia los anticuerpos anti-

CD3 o anti-CD4/CD4a; los péptidos solubles que contienen el dominio de unión al LFA-3 (WO 90/08187); la estreptoquinasa; el TGF- β ; la estreptodornasa; el RNA o el DNA del hospedante; el FK506; el RS-61443; la desoxiespergualina; la rapamicina; el receptor de células T (US 5,114,721); los fragmentos de receptores de células T (Offner y col., Science 251, 430-432, 1991; WO 90/11294; Ianeway, Nature 341, 482, 1989; y WO 91/01133); y los anticuerpos de receptor de células T (EP 0,340,109), por ejemplo el T10B9.

Un “agente quimioterapéutico” es un compuesto químico útil para el tratamiento del cáncer. Los ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluyen a los agentes alquilantes, por ejemplo la tiotepa y la ciclofosfamida (CITOXAN™); los sulfonatos de alquilo, por ejemplo busulfano, improsulfano y piposulfano; las aziridinas, por ejemplo benzodopa, carboquona, meturedopa y uredopa; las etileniminas y metilamelaminas, incluidas la altretamina, trietilenomelamina, trietilenofosforamida, trietilenotiofosforamida y trimetilolomelamina; las mostazas nitrogenadas, por ejemplo clorambucilo, clornafazina, colofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, clorhidrato del óxido de mecloretamina, melfalano, novembiquina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, mostaza de uracilo; las nitrosureas, por ejemplo la carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina, ranimustina; los antibióticos, por ejemplo las aclacinomisinas, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, caliqueamicina, carabicina, carminomicina, carzinofilina, cromomicinas, dactinomicina, daunorrubicina, detorrubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, doxorubicina, epirubicina, esorrubicina, idarrubicina, marcelomicina, mitomicinas, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomicina, potfiromicina, puromicina, quelamicina, rodotrubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorrubicina; los anti-metabolitos, por ejemplo metotrexato y 5-fluoruracilo (5-FU); los análogos de ácido fólico, por ejemplo denopterina, metotrexato, pteropterina, trimetrexato; los análogos de purina, por ejemplo fludarabina, 6-mercaptopurina, tiamiprina, tioguanina; los análogos de pirimidina, por ejemplo ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, didesoxiuridina, doxifluridina, enocitabina, floxuridina, 5-FU; los andrógenos, por ejemplo calusterona, propionato de dromostanolona, epitioestano, mepitioestano, testolactona; los anti-adrenérgicos, por ejemplo aminoglutetimida, mitotano, trilostano; los rellenantes (replenisher) de ácido fólico, por ejemplo ácido frolínico; aceglatona; aldofosfamida glicódiso; ácido aminolevulínico; amsacrina; bestrabucilo; bisantreno; edatraxato; defofamina; demecolcina; diaziquona; elfornitina; acetato de eliptinio; etoglúcido; nitrato de galio; hidroxiiurea; lentinano; lonidamina; mitoguazona;

mitoxantrona; mopidamol; nitracrina; pentostatina; fenamet; pirarrubicina; ácido podofilínico; 2-etilhidrazida; procarbazona; PSK®; razoxano; sizofirano; espirogermanio; ácido tenuazónico; triaziquona; 2,2',2''-triclorotrietilamina; uretano; vindesina; dacarbazina; manomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobromano; gacitosina; arabinósido ("Ara-C"); ciclofosfamida; tiotepa; taxoides, p. ej. paclitaxel (TAXOL®, Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.) y doxetaxel (TAXOTERE®, Rhône-Poulenc Rorer, Antony, Francia); clorambucilo; gemcitabina; 6-tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; los análogos de platino, por ejemplo cisplatino y carboplatino; vinblastina; platino; etopósido (VP-16); ifosfamida; mitomicina C; mitoxantrona; vincristina; vinorelbina; navelbina; novantrona; tenipósido; daunomicina; aminopterina; xeloda; ibandronato; CPT-11; inhibidor de topoisomerasa RFS 2000; difluormetilornitina (DMFO); ácido retinoico; esperamicinas; capecitabina; y las sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores. Se incluyen también en esta definición los agentes antihormonales que actúan regulando o inhibiendo la acción de las hormonas en los tumores, por ejemplo los anti-estrógenos, que incluyen por ejemplo al tamoxifeno, raloxifeno, los 4(5)-imidazoles que inhiben las aromatasas, 4-hidroxitamoxifeno, trioxifeno, keoxifeno, LY117018, onapristona y toremifeno (Fareston); y los anti-andrógenos, por ejemplo flutamida, nilutamida, bicalutamida, leuprolida y goserelina; y las sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores.

II. Composiciones y métodos

En un aspecto, la invención se basa, en parte, en el hallazgo de que el anticuerpo biespecífico anti-CD20 humano/ receptor de transferrina humano aquí descrito tiene propiedades mejoradas. En ciertas formas de ejecución se proporcionan anticuerpos biespecíficos anti-CD20 humano/ receptor de transferrina humano. Los anticuerpos aquí descritos son útiles p. ej. para el diagnóstico o el tratamiento de la enfermedad de Parkinson o de la esclerosis múltiple.

A. Anticuerpos biespecíficos ilustrativos anti-CD20 humano/receptor de transferrina humano

En un aspecto, la invención proporciona anticuerpos biespecíficos aislados que se unen al CD20 humano y al receptor de transferrina humano. Los anticuerpos son anticuerpos biespecíficos formados por un anticuerpo de núcleo (de longitud

completa) y un fragmento Fab fusionado, en el que ciertos dominios se han reemplazado de forma cruzada. Por lo tanto, los anticuerpos biespecíficos resultantes son asimétricos. Por consiguiente, los anticuerpos biespecíficos se producen empleando la tecnología de heterodimerización llamada botones-en-huecos (knobs-into-holes), en la que intervienen una primera cadena larga con las mutaciones llamadas de botón (HC-botón) y una segunda cadena larga con las llamadas mutaciones de hueco (HC-hueco).

El anticuerpo 0039, que es también un aspecto de la presente invención, está compuesto por cuatro polipéptidos que tienen la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 06 a la 09.

El anticuerpo 0039 es un anticuerpo biespecífico formado por:

- a) un anticuerpo de longitud completa que contiene dos parejas, cada una de la cadena corta de anticuerpo de longitud completa y la cadena larga de anticuerpo de longitud completa, en el que los sitios de unión formados por cada una de las parejas de la cadena larga de longitud completa y la cadena corta de longitud completa se unen específicamente al primer antígeno y
- b) un fragmento Fab adicional, dicho fragmento Fab adicional está fusionado con el extremo C de una cadena larga del anticuerpo de longitud completa, en el que el sitio de unión del fragmento Fab adicional se une específicamente al segundo antígeno,

en el que cada una de las cadenas cortas de anticuerpo de longitud completa contiene en el dominio constante de cadena corta (CL) en la posición 123 el resto aminoácido arginina (en lugar del resto de tipo salvaje ácido glutámico; mutación E123R) y en la posición 124 el resto aminoácido lisina (en lugar del resto de tipo salvaje glutamina; mutación Q124K) (numeración con arreglo a Kabat),

en el que cada una de las cadenas largas de anticuerpo de longitud completa contiene en el primer dominio constante de cadena larga (CH1) en la posición 147 un resto ácido glutámico (en lugar del resto de tipo salvaje lisina; mutación K147E) y en la posición 213 un resto ácido glutámico (en lugar del resto aminoácido de tipo salvaje lisina; mutación K213E) (numeración con arreglo al índice EU de Kabat),

en el que el fragmento Fab adicional, que se une específicamente al segundo antígeno, contiene un entecruzamiento de dominios de tal manera que el dominio variable de cadena corta (VL) y el dominio variable de cadena larga (VH) se reemplazan entre sí y

en el que el primer antígeno es el CD20 humano y el segundo antígeno es un receptor de transferrina humano.

El anticuerpo 0041, que es también un aspecto de la presente invención, está compuesto por cuatro polipéptidos que tienen la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 01 a la 03 y la SEQ ID NO: 10.

El anticuerpo 0041 es un anticuerpo biespecífico formado por:

- a) un anticuerpo de longitud completa que contiene dos parejas, cada una de una cadena corta de anticuerpo de longitud completa y una cadena larga de anticuerpo de longitud completa, en el que los sitios de unión formados por cada una de las parejas de la cadena larga de longitud completa y la cadena corta de longitud completa se unen específicamente al primer antígeno y
- b) un fragmento Fab adicional, dicho fragmento Fab adicional está fusionado con el extremo C de una cadena larga del anticuerpo de longitud completa, en el que el sitio de unión del fragmento Fab adicional se une específicamente al segundo antígeno,

en el que cada una de las cadenas cortas de anticuerpo de longitud completa contiene en el dominio constante de cadena corta (CL) en la posición 123 el resto aminoácido arginina (en lugar del resto de tipo salvaje ácido glutámico; mutación E123R) y en la posición 124 el resto aminoácido lisina (en lugar del resto de tipo salvaje glutamina; mutación Q124K) (numeración con arreglo a Kabat),

en el que cada una de las cadenas largas de anticuerpo de longitud completa contiene en el primer dominio constante de cadena larga (CH1) en la posición 147 un resto ácido glutámico (en lugar del resto de tipo salvaje lisina; mutación K147E) y en la posición 213 un resto ácido glutámico (en lugar del resto aminoácido de tipo salvaje lisina; mutación K213E) (numeración con arreglo al índice EU de Kabat),

en el que el fragmento Fab adicional, que se une específicamente al segundo antígeno, contiene un entecruzamiento de dominios, de tal manera que el dominio constante de cadena corta (CL) y el dominio constante de cadena larga 1 (CH1) se reemplazan entre sí y

en el que el primer antígeno es el CD20 humano y el segundo antígeno es un receptor de transferrina humano.

El anticuerpo 0040, que es también un aspecto de la presente invención, está formado por tres polipéptidos que tienen la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11 a la 13 y la SEQ ID NO: 22.

El anticuerpo 0040 es un anticuerpo biespecífico formado por:

- a) un anticuerpo de longitud completa que contiene dos parejas, cada una de una cadena corta de anticuerpo de longitud completa y una cadena larga de anticuerpo de longitud completa, en el que los sitios de unión formados por cada una de las parejas de la cadena larga de longitud completa y la cadena corta de longitud completa se unen específicamente al primer antígeno y
- b) un fragmento Fab adicional, dicho fragmento Fab adicional está fusionado con el extremo C de una cadena larga del anticuerpo de longitud completa, en el que el sitio de unión del fragmento Fab adicional se une específicamente al segundo antígeno,

en el que el fragmento Fab adicional que se une específicamente al segundo antígeno contiene un entrecruzamiento de dominios, de tal manera que el dominio constante de cadena corta (CL) y el dominio constante 1 de cadena larga (CH1) se reemplazan entre sí y

en el que el primer antígeno es el CD20 humano y el segundo antígeno es un receptor de transferrina humano.

El anticuerpo 0042, que es también un aspecto de la presente invención, está compuesto por cuatro polipéptidos que tienen la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 14 a la 17.

El anticuerpo 0042 es un anticuerpo biespecífico formado por:

- a) una primera cadena corta y una primera cadena larga derivadas de un primer anticuerpo que se une específicamente al primer antígeno y
- b) una segunda cadena corta y una segunda cadena larga derivadas de un segundo anticuerpo que se une específicamente al segundo antígeno,

en la segunda cadena corta, el dominio constante CL se reemplaza por el dominio constante CH1 de la segunda cadena larga; y

en la segunda cadena larga, el dominio constante CH1 se reemplaza por el dominio constante CL de la segunda cadena corta; y

- i) en el que el dominio constante CL de la primera cadena corta, los aminoácidos de las posiciones 124 y 123 (numeración con arreglo a Kabat) se sustituyen con independencia entre sí por otro aminoácido elegido entre K, R y H; y en el que el dominio constante CH1 de la primera cadena larga, los aminoácidos de las posiciones 147 y 213 (numeración con arreglo al índice EU de Kabat) se sustituyen con independencia entre sí por un aminoácido elegido entre E y D; o
- ii) en el que el dominio constante CL de la segunda cadena corta, los aminoácidos de las posiciones 124 y 123 (numeración con arreglo a Kabat) se sustituyen con independencia entre sí por otro aminoácido elegido entre K, R y H; y en el que el dominio constante CH1 de la segunda cadena larga, los aminoácidos de las posiciones 147 y 213 (numeración con arreglo al índice EU de Kabat) se sustituyen con independencia entre sí por un aminoácido elegido entre E y D.

Los anticuerpos biespecíficos aquí descritos se obtienen por expresión transitoria en células CHO. Los rendimientos se recogen en la tabla siguiente.

anticuerpo	0039	0040	0041	0042
c [µg/ml]	8,4	25,3	32	22,5
cantidad [mg]	29,4	88,6	112,0	78,8

Para la producción recombinante de anticuerpos biespecíficos se han empleado diferentes asignaciones o combinaciones de los polipéptidos correspondiente en diferentes plásmidos de expresión y en relaciones diferentes de los plásmidos resultantes. Los resultados obtenidos en células HEK 293 se recogen en la tabla siguiente.

anticuerpo	relación molar de plásmidos		área relativa de pico (no reducida) [%]		
			hueco 1/2 mAb	dímero de cadena hueco- hueco	anticuerpo monómero
0039	1:3	LC+HC-hueco : cruz	9	10	80
0039	1:4	LC+HC-botón	6	6	88
0039	1:3:2	LC+HC-hueco : cruz	17	9	74
0039	1:4:2	LC+HC-botón : cruz LC	10	5	85
0039	1:1:3	LC : LC+HC-hueco :	6	6	88
0039	1:1:4	cruz LC+HC-botón	3	4	93
0040	1:3	LC+HC-hueco : cruz	10	18	72
0040	1:4	LC+HC-botón	6	7	87
0040	1:3:2	LC+HC-hueco : cruz	5	7	89
0040	1:4:2	LC+HC-botón : cruz LC	3	5	92
0040	1:1:3	LC : LC+HC-hueco :	16	48	35
0040	1:1:4	cruz LC+HC-botón	6	23	69
0041	1:3	LC+HC-hueco : cruz	3	5	92
0041	1:4	LC+HC-botón	1	2	97
0041	1:3:2	LC+HC-hueco : cruz	-	2	98
0041	1:4:2	LC+HC-botón : cruz LC	-	1	99
0041	1:1:3	LC : LC+HC-hueco :	-	3	97
0041	1:1:4	cruz LC+HC-botón	-	2	97
0042	1:2	LC+HC-hueco : cruz LC+HC-botón	-	1	99

Los anticuerpos biespecíficos se producen en pequeña escala en células CHO y la distribución de subproductos se ha analizado después de un primer paso de purificación por cromatografía de afinidad con la proteína A y después del segundo paso de purificación por cromatografía preparativa de exclusión de tamaños. Los resultados se recogen en la tabla siguiente.

anticuerpo	relación molar de plásmidos	recogida, fermentación 3 litros después de preparativa con proteína A producto monómero (CE-SDS no red./rendimiento)	distribución de subproductos (CE-SDS no red.)			
			LC	HC-hueco	hueco 1/2 mAb	dímero hueco-hueco + 3/4 mAb
0039	1:3:2	55 % 26 mg	16	6	11	12
0040	1:3:2	44 % 74,5 mg	23	8	7	17
0041	1:3:2	82 % > 80 mg	11	0	0	7
0042	1:2	83 % 68,4 mg	9	0	0	8

anticuerpo	relación de plásmidos	recogida, fermentación 3 litros después de preparativa con proteína A y SEC preparativa producto monómero (CE-SDS no red./rendimiento)	distribución de subproductos (CE-SDS no red.)			
			LC	HC-hueco	hueco 1/2 mAb	dímero hueco-hueco + 3/4 mAb

0039	1:3:2	8,2 mg 73 %	10	0	2	15
0040	1:3:2	29,7 mg 77 %	10	0	0	14
0041	1:3:2	> 44 mg 79 %	8	0	0	13
0042	1:2	43,6 mg > 90 %	3	0	0	3

anticuerpo	relación de plásmido s	recogida 3 l después de la purificación con proteína A monómero por SEC	subproductos SEC [%]		product o final por SEC	subproducto s SEC [%]	
			HMW	LMW		HMW	LM W
0039	1:3:2	90 %	2	7	95 %	0	5
0040	1:3:2	89 %	5	6	96,5 %	1	2,5
0041	1:3:2	94 %	6	0	97,5 %	0,5	2
0042	1:2	95 %	2	3	97 %	1	2

Los anticuerpos biespecíficos se producen en diferentes líneas celulares. los resultados se recogen en la tabla siguiente.

anticuerpo	micropurificación con proteína A producto monómero (CE-SDS)		recogida 3 l después de la purificación con proteína A monómero (rendimiento / CE-SDS no red.)	producto final (purificación preparativa con proteína A y SEC) (rendimiento / CE-SDS no red.)
	CHO-K1	HEK293	CHO	CHO
0039	80 %	93 %	7,4 mg/l 55 %	8,2 mg 73 %
0040	83 %	92 %	21,3 mg/l 44 %	29,7 mg 77 %
0041	85 %	99 %	> 21 mg/l 82 %	> 44 mg 79 %
0042	91 %	99 %	19 mg/l 83 %	43,8 mg 94 %

Se determina la temperatura de agregación de los anticuerpos 0039, 0040, 0041 y 0042 que se sitúa aprox. en 54-56°C, aprox. en 50-53°C, aprox. en 51-53°C y aprox. en 55-57°C, respectivamente.

En conjunto, el anticuerpo 0041 presenta propiedades idóneas y por ello es el aspecto preferido de la invención. Este anticuerpo tiene además propiedades mejoradas, que estriban, entre otras, en el perfil mejorado de productos secundarios.

En un aspecto se proporciona un anticuerpo biespecífico formado por:

- a) un anticuerpo de longitud completa que contiene dos parejas, cada una de una cadena corta de anticuerpo de longitud completa y una cadena larga de anticuerpo de longitud completa, en el que los sitios de unión formados por cada una de las parejas de la cadena larga de longitud completa y la cadena corta de longitud completa se unen específicamente al primer antígeno y

- b) un fragmento Fab adicional, dicho fragmento Fab adicional está fusionado con el extremo C de una cadena larga del anticuerpo de longitud completa, en el que el sitio de unión del fragmento Fab adicional se une específicamente al segundo antígeno,

en el que cada una de las cadenas cortas de anticuerpo de longitud completa contiene en el dominio constante de cadena corta (CL) en la posición 123 el resto aminoácido arginina (en lugar del resto de tipo salvaje ácido glutámico; mutación E123R) y en la posición 124 el resto aminoácido lisina (en lugar del resto de tipo salvaje glutamina; mutación Q124K) (numeración con arreglo a Kabat),

en el que cada una de las cadenas largas de anticuerpo de longitud completa contiene en el primer dominio constante de cadena larga (CH1) en la posición 147 un resto ácido glutámico (en lugar del resto de tipo salvaje lisina; mutación K147E) y en la posición 213 un resto ácido glutámico (en lugar del resto aminoácido de tipo salvaje lisina; mutación K213E) (numeración con arreglo al índice EU de Kabat),

en el que el fragmento Fab adicional que se une específicamente al segundo antígeno contiene un entecruzamiento de dominios, de tal manera que el dominio constante de cadena corta (CL) y el dominio constante de cadena larga 1 (CH1) se reemplazan entre sí y

en el que el primer antígeno es el CD20 humano y el segundo antígeno es un receptor de transferrina humano.

Un aspecto aquí descrito es un anticuerpo biespecífico que contiene:

- a) un anticuerpo de longitud completa que contiene dos parejas, cada una de una cadena corta de anticuerpo de longitud completa y una cadena larga de anticuerpo de longitud completa, en el que los sitios de unión formados por cada una de las parejas de la cadena larga de longitud completa y la cadena corta de longitud completa se unen específicamente al primer antígeno y

- b) un fragmento Fab adicional, dicho fragmento Fab adicional está fusionado con el extremo C de una cadena larga del anticuerpo de longitud completa, en el que el sitio de unión del fragmento Fab adicional se une específicamente al segundo antígeno,

en el que cada una de las cadenas cortas de anticuerpo de longitud completa contiene en el dominio constante de cadena corta (CL) en la posición 123 el resto aminoácido arginina (en lugar del resto de tipo salvaje ácido glutámico; mutación E123R) y en la posición 124 el resto aminoácido lisina (en lugar del resto de tipo salvaje glutamina; mutación Q124K) (numeración con arreglo a Kabat),

en el que cada una de las cadenas largas de anticuerpo de longitud completa contiene en el primer dominio constante de cadena larga (CH1) en la posición 147 un resto ácido glutámico (en lugar del resto de tipo salvaje lisina; mutación K147E) y en la posición 213 un resto ácido glutámico (en lugar del resto aminoácido de tipo salvaje lisina; mutación K213E) (numeración con arreglo al índice EU de Kabat),

en el que el fragmento Fab adicional que se une específicamente al segundo antígeno contiene un entecruzamiento de dominios, de tal manera que el dominio constante de cadena corta (CL) y el dominio constante de cadena larga 1 (CH1) se reemplazan entre sí,

en el que el primer antígeno es el CD20 humano y el segundo antígeno es un receptor de transferrina humano,

en el que el sitio de unión con el CD20 humano contiene una secuencia de dominio variable de cadena larga (VH) que tiene al menos un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 18 y una secuencia de dominio variable de cadena corta (VL) que tiene al menos un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 19 y

en el que el sitio de unión con el receptor de transferrina humano contiene una secuencia de dominio variable de cadena larga (VH) que tiene al menos

un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 20 y una secuencia de dominio variable de cadena corta (VL) que tiene al menos un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 21.

En ciertas formas de ejecución, una secuencia VH que tiene al menos un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad contiene sustituciones (p. ej. sustituciones conservadoras), inserciones o deleciones con respecto a la secuencia de referencia, pero un sitio de unión que contiene tal secuencia conserva la capacidad de unirse a su antígeno. En ciertas formas de ejecución, un total de 1 a 10 aminoácidos pueden haberse sustituido, insertado y/o suprimido en la SEQ ID NO: 18 ó 20. En ciertas formas de ejecución, las sustituciones, inserciones o deleciones tienen lugar en regiones externas a las HVR (es decir, en los FR).

En ciertas formas de ejecución, una secuencia VL que tiene al menos un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad contiene sustituciones (p. ej. sustituciones conservadoras), inserciones o deleciones con respecto a la secuencia de referencia, pero un sitio de unión que contiene tal secuencia conserva la capacidad de unirse a su antígeno. En ciertas formas de ejecución, un total de 1 a 10 aminoácidos pueden haberse sustituido, insertado y/o suprimido en la SEQ ID NO: 19 ó 21. En ciertas formas de ejecución, sustituciones, inserciones o deleciones tienen lugar en regiones externas a las HVR (es decir, en los FR).

En una forma de ejecución, el sitio de unión al CD20 humano contiene la secuencia VH como en la SEQ ID NO: 18, incluidas las modificaciones post-traslacionales de dicha secuencia y la secuencia VL como en la SEQ ID NO: 19, incluidas las modificaciones post-traslacionales de dicha secuencia.

En una forma de ejecución, el sitio de unión con el receptor de transferrina humano contiene la secuencia VH como en la SEQ ID NO: 20, incluidas las modificaciones post-traslacionales de dicha secuencia y la secuencia VL como en la SEQ ID NO: 21, incluidas las modificaciones post-traslacionales de dicha secuencia.

En una forma de ejecución, el anticuerpo biespecífico está formado por:

- i) una cadena corta que tiene una identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 01 al menos del 70 %, al menos del 80 %, al menos del 90 % o 95 % o más,
- ii) una cadena larga que tiene una identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 02 al menos del 70 %, al menos del 80 %, al menos del 90 % o 95 % o más,
- iii) una cadena corta que tiene una identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 03 al menos del 70 %, al menos del 80 %, al menos del 90 % o 95 % o más y
- iv) un fragmento Fab de cadena larga que tiene una identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 04 al menos del 70 %, al menos del 80 %, al menos del 90 % o 95 % o más,

en el que:

la SEQ ID NO: 01 tiene la secuencia de aminoácidos

DIVMTQTPLSLPVTGPGEPAISCRSSKSLHNSGITYLYWYLQKPGQSPQLLI
YQMSNLVSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQNLELPYTF
GGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDRKLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK
VDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSSLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQ
GLSSPVTKSFNRGEC,

la SEQ ID NO: 02 tiene la secuencia de aminoácidos

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYAFSYSWINWVRQAPGQGLEWM
GRIFPGDGDYNGKFKGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDYAVYYCARN
VFDGYWLWVGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVE
DYFPEPVTWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTY
ICNVNHKPSNTKVDEKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKD
TLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST
YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCT
LPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPDSIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD
GSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG,

la SEQ ID NO: 03 tiene la secuencia de aminoácidos

AIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLAWYQQKPGKAPKLLIYRAS
TLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQNYASSNVDNTFGG
GTKVEIKSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN
SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK
VDKKVEPKSC y

la SEQ ID NO: 04 tiene la secuencia de aminoácidos

QSMQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGFSLSSYAMSWIRQHPGKGLEWIGYI
WSGGSTDYASWAKSRVTISKSTTTVSLKLSSVTAADTAVYYCARRYGTSYP
DYGDASGFDPWGQGTLVTVSSASVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLN
NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYE
KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC.

Un aspecto aquí descrito es un anticuerpo biespecífico que contiene:

- a) un anticuerpo de longitud completa que contiene dos parejas, cada una de una cadena corta de anticuerpo de longitud completa y una cadena larga de anticuerpo de longitud completa, en el que los sitios de unión formados por cada una de las parejas de la cadena larga de longitud completa y la cadena corta de longitud completa se unen específicamente al primer antígeno y
- b) un fragmento Fab adicional, dicho fragmento Fab adicional está fusionado con el extremo C de una cadena larga del anticuerpo de longitud completa, en el que el sitio de unión del fragmento Fab adicional se une específicamente al segundo antígeno,

en el que cada una de las cadenas cortas de anticuerpo de longitud completa contiene en el dominio constante de cadena corta (CL) en la posición 123 el resto aminoácido arginina (en lugar del resto de tipo salvaje ácido glutámico; mutación E123R) y en la posición 124 el resto aminoácido lisina (en lugar del resto de tipo salvaje glutamina; mutación Q124K) (numeración con arreglo a Kabat),

en el que cada una de las cadenas largas de anticuerpo de longitud completa contiene en el primer dominio constante de cadena larga (CH1) en la posición 147 un resto ácido glutámico (en lugar del resto de tipo salvaje lisina; mutación K147E) y en la posición 213 un resto ácido glutámico (en lugar del resto aminoácido de tipo salvaje lisina; mutación K213E) (numeración con arreglo al índice EU de Kabat),

en el que el fragmento Fab adicional que se une específicamente al segundo antígeno contiene un entecruzamiento de dominios, de tal manera que el dominio constante de cadena corta (CL) y el dominio constante de cadena larga 1 (CH1) se reemplazan entre sí,

en el que el primer antígeno es el CD20 humano y el segundo antígeno es un receptor de transferrina humano,

en el que el sitio de unión con el CD20 humano contiene un dominio variable de cadena larga (VH) que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 18 y un dominio variable de cadena corta (VL) que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 19 y

en el que el sitio de unión con el receptor de transferrina humano contiene un dominio variable de cadena larga (VH) que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 20 y un dominio variable de cadena corta (VL) que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 21.

Un aspecto aquí descrito es un anticuerpo biespecífico que contiene:

- a) un anticuerpo de longitud completa que contiene dos parejas, cada una de una cadena corta de anticuerpo de longitud completa y una cadena larga de anticuerpo de longitud completa, en el que los sitios de unión formados por cada una de las parejas de la cadena larga de longitud completa y la cadena corta de longitud completa se unen específicamente al primer antígeno, en el que el anticuerpo de longitud completa contiene una región Fc que está formada por los polipéptidos de la región Fc, cada uno contiene el dominio CH1, CH2 y CH3, de las dos cadenas largas de longitud completa y

- b) un fragmento Fab adicional, dicho fragmento Fab adicional está fusionado con el extremo C de una cadena larga del anticuerpo de longitud completa, en el que el sitio de unión del fragmento Fab adicional se une específicamente al segundo antígeno,

en el que cada una de las cadenas cortas de anticuerpo de longitud completa contiene en el dominio constante de cadena corta (CL) en la posición 123 el resto aminoácido arginina (en lugar del resto de tipo salvaje ácido glutámico; mutación E123R) y en la posición 124 el resto aminoácido lisina (en lugar del resto de tipo salvaje glutamina; mutación Q124K) (numeración con arreglo a Kabat),

en el que cada una de las cadenas largas de anticuerpo de longitud completa contiene en el primer dominio constante de cadena larga (CH1) en la posición 147 un resto ácido glutámico (en lugar del resto de tipo salvaje lisina; mutación K147E) y en la posición 213 un resto ácido glutámico (en lugar del resto aminoácido de tipo salvaje lisina; mutación K213E) (numeración con arreglo al índice EU de Kabat),

en el que el fragmento Fab adicional que se une específicamente al segundo antígeno contiene un entecruzamiento de dominios, de tal manera que el dominio constante de cadena corta (CL) y el dominio constante de cadena larga 1 (CH1) se reemplazan entre sí,

en el que el primer antígeno es el CD20 humano y el segundo antígeno es un receptor de transferrina humano,

en el que el sitio de unión con el CD20 humano contiene un dominio variable de cadena larga (VH) que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 18 y un dominio variable de cadena corta (VL) que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 19,

en el que el sitio de unión con el receptor de transferrina humano contiene un dominio variable de cadena larga (VH) que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 20 y un dominio variable de cadena corta (VL) que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 21 y

en el que los polipéptidos de la región Fc son:

- a) de la subclase humana IgG1,
- b) de la subclase humana IgG4,
- c) de la subclase humana IgG1 con las mutaciones L234A, L235A y P329G,
- d) de la subclase humana IgG4 con las mutaciones S228P, L235E y P329G,
- e) de la subclase humana IgG1 con las mutaciones L234A, L235A y P329G en ambos polipéptidos de la región Fc y las mutaciones T366W y S354C en un polipéptido de la región Fc y las mutaciones T366S, L368A, Y407V e Y349C en el otro polipéptido correspondiente de la región Fc,
- f) de la subclase humana IgG4 con las mutaciones S228P y P329G en ambos polipéptidos de la región Fc y las mutaciones T366W y S354C en un polipéptido de la región Fc y las mutaciones T366S, L368A, Y407V e Y349C en el otro polipéptido correspondiente de la región Fc,
- g) de la subclase humana IgG1 con las mutaciones L234A, L235A, P329G, I253A, H310A y H435A en ambos polipéptidos de la región Fc y las mutaciones T366W y S354C en un polipéptido de la región Fc y las mutaciones T366S, L368A, Y407V e Y349C en el otro polipéptido correspondiente de la región Fc,
- h) de la subclase humana IgG1 con las mutaciones L234A, L235A, P329G, M252Y, S254T y T256E en ambos polipéptidos de la región Fc y las mutaciones T366W y S354C en un polipéptido de la región Fc y las mutaciones T366S, L368A, Y407V e Y349C en el otro polipéptido correspondiente de la región Fc o
- i) un anticuerpo de longitud completa de la subclase humana IgG1 con las mutaciones L234A, L235A, P329G, H310A, H433A y Y436A en

ambas cadenas largas y las mutaciones i) T366W y ii) S354C o Y349C, en una cadena larga y las mutaciones i) T366S, L368A e Y407V y ii) Y349C o S354C, en la otra cadena larga correspondiente.

En otro aspecto, en las secciones 1-3 siguientes un anticuerpo biespecífico anti-CD20 humano/receptor de transferrina humano según una cualquiera de las formas de ejecución anteriores puede incorporar una cualquiera de las características, a título individual o en combinación, que se describen a continuación en las secciones 1-3.

1. Anticuerpos quiméricos y humanizados

En ciertas formas de ejecución, un anticuerpo proporcionado en la presente es un anticuerpo quimérico. Ciertos anticuerpos quiméricos se han descrito, p. ej. en US 4,816,567; y Morrison, S.L. y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 6851-6855, 1984). En un ejemplo, un anticuerpo quimérico contiene una región variable no humana (p. ej. una región variable derivada de un ratón, una rata, un hámster, un conejo o un primate no humano, por ejemplo un mono) y una región constante humana. En otro ejemplo, un anticuerpo quimérico es un anticuerpo de clase cambiada ("class switched"), cuya clase o subclase se ha cambiado con respecto al anticuerpo original. Los anticuerpos quiméricos incluyen a los fragmentos de los mismos que se unen a un antígeno.

En ciertas formas de ejecución, un anticuerpo quimérico es un anticuerpo humanizado. Normalmente, un anticuerpo no humano se humaniza para reducir la inmunogenicidad a los humanos, al tiempo que se conserva la especificidad y la afinidad del anticuerpo no humano parental. En general, un anticuerpo humanizado contiene uno o más dominios variables en los que las HVR, p. ej. las CDR, (o porciones de las mismas) se derivan de un anticuerpo no humano y los FR (o porciones los mismos) se derivan de secuencias de anticuerpo humano. Un anticuerpo humanizado puede contener además opcionalmente al menos una porción de una región constante humana. En algunas formas de ejecución, algunos restos de FR de un anticuerpo humanizado se han sustituido por los restos correspondientes de un anticuerpo no humano (p. ej. el anticuerpo del que se derivan los restos de la HVR), p. ej. para restablecer o mejorar la especificidad o afinidad del anticuerpo.

Los anticuerpos humanizados y los métodos para obtenerlos se han revisado p. ej. en Almagro, J.C. y Fransson, J., *Front. Biosci.* 13, 1619-1633, 2008 y se han descrito con mayor detalle p. ej. en Riechmann, I. y col., *Nature* 332, 323-329, 1988; Queen, C. y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 10029-10033, 1989; US 5,821,337, US 7,527,791, US 6,982,321 y US 7,087,409; Kashmiri, S.V. y col., *Methods* 36, 25-34, 2005 (donde se describe el injerto de la región determinante de la especificidad (SDR)); Padlan, E.A., *Mol. Immunol.* 28, 489-498, 1991 (donde se describe el nuevo revestimiento o “resurfacing”); Dall’Acqua, W.F. y col., *Methods* 36, 43-60, 2005 (donde se describe el barajado de los FR o “FR shuffling”); y Osbourn, J. y col., *Methods* 36, 61-68, 2005 y Klimka, A. y col., *Br. J. Cancer* 83, 252-260, 2000 (donde se describe la estrategia de la “selección guiada” para el barajado de los FR).

Las regiones de armazón humanas que pueden emplearse para la humanización incluyen, pero no se limitan a: se eligen las regiones de armazón aplicando el método del mejor encaje (“best-fit”) (ver p. ej. Sims, M.J. y col., *J. Immunol.* 151, 2296-2308, 1993); las regiones de armazón derivadas de la secuencia de consenso de anticuerpos humanos de un subgrupo particular de regiones variables de cadena corta o larga (ver, p. ej. Carter, P. y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 4285-4289, 1992; y Presta, L.G. y col., *J. Immunol.* 151, 2623-2632, 1993); las regiones de armazón maduras humanas (mutadas somáticamente) o las regiones de armazón de línea germinal humana (ver, p. ej. Almagro, J.C. y Fransson, J., *Front. Biosci.* 13, 1619-1633, 2008); y las regiones de armazón derivadas de la exploración de bibliotecas de FR (ver, p. ej. Baca, M. y col., *J. Biol. Chem.* 272, 10678-10684, 1997 y Rosok, M.J. y col., *J. Biol. Chem.* 271, 22611-22618, 1996).

2. Anticuerpos humanos

En ciertas formas de ejecución, un anticuerpo proporcionado en la presente es un anticuerpo humano. Los anticuerpos humanos pueden producirse aplicando varias técnicas ya conocidas en ingeniería genética. Los anticuerpos humanos se han descrito en general en van Dijk, M.A. y van de Winkel, J.G., *Curr. Opin. Pharmacol.* 5, 368-374, 2001 y Lonberg, N., *Curr. Opin. Immunol.* 20, 450-459, 2008.

Los anticuerpos humanos pueden obtenerse administrando un inmunógeno a un animal transgénico, que se ha modificado para producir anticuerpos humanos intactos o anticuerpos intactos con regiones variables humanas en respuesta al reto antigénico. Tales animales contienen normalmente todas o una porción de los lugares (loci) de la inmunoglobulina humana, que reemplazan a los lugares de la

inmunoglobulina endógena o que están presentes en el exterior del cromosoma o están integrados de modo aleatorio en los cromosomas del animal. En tales ratones transgénicos, los lugares de la inmunoglobulina endógena se han inactivado en general. Una revisión de los métodos de obtención de anticuerpos humanos a partir de animales transgénicos se encontrará p. ej. en Lonberg, N., *Nat. Biotech.* 23, 1117-1125, 2005. Véase también, p. ej. US 6,075,181 y US 6,150,584, donde se describe la tecnología XENOMOUSE™; US 5,770,429, donde se describe la tecnología HuMab®; US 7,041,870, donde se describe la tecnología K-M MOUSE® y US 2007/0061900, donde se describe la tecnología VelociMouse®). Las regiones variables humanas de anticuerpos intactos generadas en tales animales pueden seguir modificándose, p. ej. combinándolas con un región constante humana diferente.

Los anticuerpos humanos pueden obtenerse también por métodos basados en el hibridoma. Ya se han descrito las líneas celulares de mieloma humano y de heteromieloma murino-humano para la producción de anticuerpos monoclonales humanos (ver, p. ej. Kozbor, D., *J. Immunol.* 133, 3001-3005, 1984; Brodeur, B.R. y col., *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, pp. 51-63, 1987, Marcel Dekker, Inc., Nueva York; y Boerner, P. y col., *J. Immunol.* 147, 86-95, 1991). Los anticuerpos humanos generados mediante la tecnología de hibridomas de células B humanas se han descrito también en Li, J. y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103, 3557-3562, 2006. Entre los métodos adicionales se incluyen, por ejemplo, los descritos en US 7,189,826 (donde se describe la producción de anticuerpos monoclonales humanos IgM a partir de líneas celulares de hibridoma) y Ni, J., *Xiandai Mianyixue* 26, 265-268, 2006 (donde se describen hibridomas humano-humanos). La tecnología del hibridoma humano (tecnología Trioma) se ha descrito también en Vollmers, H.P. y Brandlein, S., *Histology and Histopathology* 20, 927-937, 2005 y Vollmers, H.P. y Brandlein, S., *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology* 27, 185-191, 2005.

Los anticuerpos humanos pueden generarse también aislando las secuencias de dominio variable del clon Fv elegidas entre bibliotecas de exposición de fagos (phage display) derivadas de origen humano. Tales secuencias de dominio variable pueden combinarse después con un dominio constante humano que se desee. Las técnicas para seleccionar anticuerpos humanos de bibliotecas de anticuerpos se describen a continuación.

3. Variantes de anticuerpo

En ciertas formas de ejecución se contemplan variantes de secuencias de aminoácidos de los anticuerpos proporcionados en la presente. Por ejemplo, puede ser deseable mejorar la afinidad de unión y/u otras propiedades biológicas del anticuerpo. Las variantes de secuencias de aminoácidos de un anticuerpo pueden obtenerse introduciendo modificaciones apropiadas en la secuencia del nucleótido que codifica al anticuerpo, o por síntesis de péptidos. Tales modificaciones incluyen, por ejemplo, las deleciones de y/o las inserciones en y/o las sustituciones de restos dentro de las secuencias de aminoácidos del anticuerpo. Se puede efectuar cualquier combinación de deleción, inserción y sustitución para llegar al constructo final, con la condición de que el constructo final posea las características deseadas, p. ej. la unión con el antígeno.

a) Variantes de sustitución, inserción y deleción

En ciertas formas de ejecución se proporcionan variantes de anticuerpo que tienen una o más sustituciones de aminoácido. Los sitios de interés para la mutagénesis sustitucional incluyen a las HVR y los FR. Las sustituciones conservadoras se recogen en la tabla siguiente en la columna encabezada por “sustituciones preferidas”. En la tabla 1 se presentan cambios más sustanciales en la columna encabezada por “sustituciones ilustrativas”, que se describen después con mayor detalle en relación con las clases de cadenas laterales de aminoácidos. Las sustituciones de aminoácido pueden introducirse en un anticuerpo de interés y los productos explorados en busca de la actividad deseada, p. ej. unión al antígeno mantenida o mejorada, menor inmunogenicidad o mejor ADCC o CDC.

Tabla

resto original	sustituciones ilustrativas	sustituciones preferidas
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp, Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala

resto original	sustituciones ilustrativas	sustituciones preferidas
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; norleucina	Leu
Leu (L)	norleucina; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; norleucina	Leu

Los aminoácidos pueden dividirse con arreglo a las propiedades habituales de la cadena lateral:

- (1) hidrófobos: norleucina, Met, Ala, Val, Leu, Ile;
- (2) hidrófilos neutros: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;
- (3) ácidos: Asp, Glu;
- (4) básicos: His, Lys, Arg;
- (5) restos que influyen en la orientación de la cadena: Gly, Pro;
- (6) aromáticos: Trp, Tyr, Phe.

Las sustituciones no conservadoras acarrearán el intercambio de un miembro de una de estas clases por otra clase.

Un tipo de variante sustitucional implica la sustitución de uno o más restos de la región hipervariable de un anticuerpo original (p. ej. un anticuerpo humanizado o humano). En general, la o las variante(s) resultantes elegidas para el estudio posterior tendrán modificaciones (p. ej. mejoras) en ciertas propiedades biológicas (p. ej. mejor afinidad, menor inmunogenicidad) con respecto al anticuerpo original y/o tendrán ciertas propiedades biológicas sustancialmente conservadas del anticuerpo original. Una variante sustitucional ilustrativa es un anticuerpo madurado en afinidad, que puede generarse de modo conveniente, p. ej. aplicando técnicas de maduración

de afinidad basadas en la exposición de fago (phage display), por ejemplo las aquí descritas. Resumiendo, se mutan uno o más restos de la HVR y los anticuerpos variantes se exponen en el fago y se exploran para determinar una actividad biológica concreta (p. ej. la afinidad de unión).

Las alteraciones (p. ej. sustituciones) pueden efectuarse en las HVR, p. ej. para mejorar la afinidad del anticuerpo. Tales alteraciones pueden realizarse en puntos calientes ("hotspots") de las HVR, es decir, en restos codificados por codones que sufren una mutación por alta frecuencia durante el proceso de maduración somática (ver, p. ej. Chowdhury, P.S., *Methods Mol. Biol.* 207, 179-196, 2008), y/o restos que entran en contacto con el antígeno, ensayando la VH o VL variante resultante para determinar su afinidad de unión. Se ha descrito la maduración de afinidad construyendo y seleccionando de nuevo entre las bibliotecas secundarias, p. ej. en Hoogenboom, H.R. y col., *Methods in Molecular Biology* 178, 1-37, 2002. En algunas formas de ejecución de la maduración de afinidad se introduce la diversidad en los genes variables elegido para la maduración por uno cualquiera de una gran variedad de métodos (p. ej. PCR con tendencia al error, barajado de cadenas o mutagénesis dirigida a los oligonucleótidos). Entonces se crea una biblioteca secundaria. La biblioteca se explora a continuación para identificar cualquiera de las variantes de anticuerpo que tenga la afinidad deseada. Otro método consiste en introducir la diversidad e implica estrategias dirigidas a las HVR, en el que varios restos de las HVR (p. ej. 4-6 restos a la vez) se distribuyen al azar. Los restos de las HVR que intervienen en la unión con el antígeno pueden identificarse de modo específico, p. ej. realizando una mutagénesis o modelado de escaneo de alanina. Las dianas elegidas para ello son con frecuencia la CDR-H3 y la CDR-L3.

En ciertas formas de ejecución, las sustituciones, inserciones o deleciones pueden aparecer dentro de una o más HVR, en el supuesto de tales alteraciones no reduzcan sustancialmente la capacidad del anticuerpo para unirse al antígeno. Por ejemplo, en las HVR pueden efectuarse alteraciones conservadoras (p. ej. las sustituciones conservadoras proporcionadas en la presente) que no reduzcan sustancialmente la afinidad de unión. Tales alteraciones pueden, por ejemplo, situarse fuera de los restos de las HVR que entran en contacto con el antígeno. En ciertas formas de ejecución de las variantes de las secuencias VH y VL recién proporcionadas, cada HVR está sin alterar o contiene no más de uno, dos o tres sustituciones de aminoácido.

Un método útil para la identificación de restos o regiones de un anticuerpo que pueden tomarse como dianas para la mutagénesis es el llamado “mutagénesis de escaneo con alanina” (“alanine scanning mutagenesis”) descrito por Cunningham, B.C. y Wells, J.A., *Science* 244, 1081-1085, 1989. En este método se identifica un resto o grupo de restos diana (p. ej. restos cargados, por ejemplo arg, asp, his, lys y glu) y se reemplazan por un aminoácido neutro o de carga negativa (p. ej. alanina o polialanina) para determinar si ha resultado afectada la interacción del anticuerpo con el antígeno. Pueden introducirse otras sustituciones en las posiciones del aminoácido que despliegan sensibilidad funcional a las sustituciones iniciales. Como alternativa o de manera adicional, una estructura cristalina de un complejo antígeno-anticuerpo para identificar los puntos de contacto entre el anticuerpo y el antígeno. Tales restos de contacto y los restos vecinos pueden tomarse como dianas o eliminarse como candidatos para la sustitución. Se pueden explorar las variantes para determinar si contienen las propiedades deseadas.

Las inserciones de secuencias de aminoácidos incluyen las fusiones en el extremo amino y/o carboxilo, cuya longitud se sitúa entre un resto y los polipéptidos que contienen un centenar o más de restos, así como las inserciones en el interior de la secuencia de restos aminoácido individuales o múltiples. Los ejemplos de inserciones terminales incluyen un anticuerpo con un resto metionilo en el extremo N. Otras variantes de inserción de la molécula de anticuerpo incluyen la fusión con el extremo N o C del anticuerpo con una enzima (p. ej. para el ADEPT) o un polipéptido que aumente la vida media del anticuerpo en el suero.

b) Variantes de glicosilación

En ciertas formas de ejecución se altera un anticuerpo proporcionado en la presente para aumentar o disminuir el grado de glicosilación de dicho anticuerpo. La adición o delección de los sitios de glicosilación de un anticuerpo puede llevarse a cabo de modo conveniente alterando la secuencia de aminoácidos, de tal manera que se cree o se elimine uno o más sitios de glicosilación.

Cuando el anticuerpo contiene una región Fc, entonces puede alterarse el hidrato de carbono unido a la misma. Los anticuerpos nativos producidos por células de mamíferos contienen normalmente un oligosacárido biantenarico ramificado que por lo general está unido mediante un enlace de N con el Asn297 del dominio CH2 de la región Fc, véase, p. ej. Wright, A. y Morrison, S.L., *TIBTECH* 15, 26-32, 1997. El oligosacárido puede incluir varios hidratos de carbono, p. ej. manosa, N-acetil-

glucosamina (GlcNAc), galactosa y ácido siálico, así como una fucosa unida a una GlcNAc en el “vástago” de la estructura biantenaria del oligosacárido. En algunas formas de ejecución, las modificaciones del oligosacárido de un anticuerpo aquí descrito pueden efectuarse con el fin de crear variantes de anticuerpo con ciertas propiedades mejoradas.

En una forma de ejecución se proporcionan variantes de anticuerpo que tienen una estructura de hidrato de carbono carente de la fucosa unida (directa o indirectamente) a una región Fc. Por ejemplo, la cantidad de fucosa en tal anticuerpo puede situarse entre el 1 % y el 80 %, entre el 1 % y el 65 %, entre el 5 % y el 65 % o entre el 20 % y el 40 %. La cantidad de fucosa se determina calculando la cantidad media de fucosa dentro de la cadena azúcar del Asn297, referida a la suma de todas las glicoestructuras unidas al Asn 297 (p. ej. estructuras complejas, híbridas y de alto contenido de manosa), determinada por espectrometría de masas MALDI-TOF, del modo descrito en WO 2008/077546, por ejemplo. El Asn297 indica el resto asparagina situado aprox. en la posición 297 de la región Fc (numeración EU de los restos de la región Fc); no obstante, el Asn297 puede estar también situado aprox. $\pm$ 3 aminoácidos antes o después de la posición 297, es decir, entre las posiciones 294 y 300, debido a variaciones menores de la secuencia de los anticuerpos. Tales variantes de fucosilación tienen una mejor función ADCC, véase p. ej. US 2003/0157108; US 2004/0093621. Los ejemplos de publicaciones relativas a las variantes de anticuerpo “desfucosiladas” o “deficientes en fucosa” incluyen: US 2003/0157108; WO 2000/61739; WO 2001/29246; US 2003/0115614; US 2002/0164328; US 2004/0093621; US 2004/0132140; US 2004/0110704; US 2004/0110282; US 2004/0109865; WO 2003/085119; WO 2003/084570; WO 2005/035586; WO 2005/035778; WO 2005/053742; WO 2002/031140; Okazaki, A. y col., J. Mol. Biol. 336, 1239-1249, 2004; Yamane-Ohnuki, N. y col., Biotech. Bioeng. 87, 614-622, 2004. Los ejemplos de líneas celulares capaces de producir anticuerpos desfucosilados incluyen las células Lec13 CHO deficientes en fucosilación de proteína (Ripka, J. y col., Arch. Biochem. Biophys. 249, 533-545, 1986; US 2003/0157108; y WO 2004/056312, en especial el ejemplo 11) y líneas celulares inactivadas (knockout), por ejemplo el gen de alfa-1,6-fucosiltransferasa, FUT8, células CHO inactivadas (ver, p. ej. Yamane-Ohnuki, N. y col., Biotech. Bioeng. 87, 614-622, 2004; Kanda, Y. y col., Biotechnol. Bioeng. 94, 680-688, 2006; y WO 2003/085107).

Las variantes de anticuerpos se proporcionan también con oligosacáridos bisectados, p. ej. aquellos en los que un oligosacárido biantenarico unido a la región Fc del anticuerpo se ha bisectado con una GlcNAc. Tales variantes de anticuerpo pueden tener una fucosilación reducida y/o una función ADCC mejorada. Los ejemplos de tales variantes de anticuerpo se han descrito p. ej. en WO 2003/011878; US 6,602,684; y US 2005/0123546. Se proporcionan también variantes de anticuerpo con al menos un resto galactosa en el oligosacárido unido a la región Fc. Tales variantes de anticuerpo pueden tener una función CDC mejorada. Tales variantes de anticuerpo se han descrito p. ej. en WO 1997/30087; WO 1998/58964; y WO 1999/22764.

c) Variantes de la región Fc

En ciertas formas de ejecución puede introducirse una o más modificaciones de aminoácido en la región Fc de un anticuerpo proporcionado en la presente, con lo cual se genera una variante de la región Fc. La variante de región Fc puede contener una secuencia de región Fc humana (p. ej. una región Fc de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 humana) que contiene una modificación de aminoácido (p. ej. una sustitución) en una o más posiciones de aminoácido.

En ciertas formas de ejecución se contempla aquí una variante de anticuerpo que posee una pero no todas las funciones efectoras, que lo convierten en un candidato deseable para aplicaciones, en las que la vida media del anticuerpo “in vivo” es importante, aunque ciertas funciones efectoras (por ejemplo el complemento y la ADCC) sean innecesarias o nocivas. Los ensayos de toxicidad “in vitro” y/o “in vivo” pueden conducir a confirmar la reducción o merma de las actividades CDC y/o ADCC. Por ejemplo, los ensayos de unión con el receptor de Fc (FcR) pueden llevarse a cabo para asegurar que el anticuerpo carece de la unión con el FcR (por ello carece de igual manera de la actividad ADCC), pero conserva la capacidad de unirse al FcRn. Las células primarias para mediar en la ADCC, las células NK, expresan solamente el FcRIII, mientras que los monocitos expresan el FcγRI, FcγRII y FcγRIII. La expresión del FcR en células hematopoyéticas se resumen en la tabla 3 de la página 464 de Ravetch, J.V. y Kinet, J.P., Annu. Rev. Immunol. 9, 457-492, 1991. Los ejemplos no limitantes de ensayos “in vitro” para evaluar la actividad ADCC de una molécula de interés se ha descrito en US 5,500,362 (ver, p. ej. Hellstrom, I. y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 7059-7063, 1986; y Hellstrom, I. y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 1499-1502, 1985; US 5,821,337 (ver Bruggemann, M. y col., J. Exp. Med. 166, 1351-1361, 1987). Como alternativa

pueden aplicarse métodos de ensayo no radiactivos (ver, por ejemplo, ensayos de citotoxicidad no radiactiva ACTI™ para citometría de flujo (CellTechnology Inc., Mountain View, CA; y el ensayo CytoTox® 96 de citotoxicidad no radiactiva (Promega, Madison, WI). Las células efectoras útiles para estos ensayos incluyen a las células mononucleadas de la sangre periférica (PBMC) y las células asesinas naturales (Natural Killer = NK). Como alternativa o de manera adicional, la actividad ADCC de la molécula de interés puede evaluarse “in vivo”, p. ej. en un modelo animal como el descrito por Clynes, R. y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95, 652-656, 1998. Los ensayos de unión con el C1q pueden llevarse también a cabo para confirmar que el anticuerpo es incapaz de unirse al C1q y por lo tanto carece de actividad CDC, ver, p. ej. ensayo ELISA de unión al C1q y C3c en WO 2006/029879 y WO 2005/100402. Para evaluar la activación de complemento puede realizarse un ensayo CDC (ver, por ejemplo, Gazzano-Santoro, H. y col., J. Immunol. Methods 202, 163-171, 1996; Cragg, M.S. y col., Blood 101, 1045-1052, 2003; y Cragg, M.S. y Glennie, M.J., Blood 103, 2738-2743, 2004). La unión al FcRn y las determinaciones “in vivo” de la eliminación o vida media pueden efectuarse también con métodos ya conocidos de la técnica (ver, p. ej. Petkova, S.B. y col., Int. Immunol. 18, 1759-1769, 2006).

Los anticuerpos con una función efectora reducida incluyen a aquellos que tienen una sustitución de uno o más restos 238, 265, 269, 270, 297, 327 y 329 de la región Fc (US 6,737,056). Tales mutantes de Fc incluyen a los mutantes de Fc que tienen sustituciones en dos o más posiciones de aminoácido 265, 269, 270, 297 y 327, incluido el mutante de Fc llamado “DANA” que tiene la sustitución de los restos 265 y 297 por alanina (US 7,332,581).

Ya se han descrito ciertas variantes de anticuerpo con una unión mejorada o disminuida con los FcR (ver, p. ej. US 6,737,056; WO 2004/056312 y Shields, R.L. y col., J. Biol. Chem. 276, 6591-6604, 2001).

En ciertas formas de ejecución, una variante de anticuerpo contiene una región Fc que tiene una o más sustituciones de aminoácido que mejoran la ADCC, p. ej. sustituciones en las posiciones 298, 333 y/o 334 de la región Fc (numeración EU de los restos).

En algunas formas de ejecución se efectúan alteraciones en la región Fc que se traducen en una unión alterada (es decir, mejorada o disminuida) con el C1q y/o citotoxicidad dependiente de complemento también alterada (CDC), p. ej. las descritas en US 6,194,551, WO 99/51642 e Idusogie, E.E. y col., J. Immunol. 164, 4178-4184, 2000.

Los anticuerpos con vidas medias más prolongadas y mejor unión al receptor de Fc neonatal (FcRn), que produce la transferencia de las IgG maternas al feto (Guyer, R.L. y col., J. Immunol. 117, 587-593, 1976 y Kim, J.K. y col., J. Immunol. 24, 2429-2434, 1994), se han descrito en US 2005/0014934. Estos anticuerpos contienen una región Fc con una o más sustituciones en ella, que mejoran la unión de la región Fc con el FcRn. Tales variantes de Fc incluyen aquellas que tienen sustituciones en uno o más de los restos de la región Fc: 238, 256, 265, 272, 286, 303, 305, 307, 311, 312, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 382, 413, 424 ó 434, p. ej. la sustitución del resto 434 de la región Fc (US 7,371,826).

Véase también Duncan, A.R. y Winter, G., Nature 322, 738-740, 1988; US 5,648,260; US 5,624,821; y WO 94/29351 acerca de otros ejemplos de variantes de la región Fc.

d) Variantes de anticuerpo de ingeniería de cisteína

En ciertas formas de ejecución puede ser deseable crear anticuerpos de ingeniería de cisteína, p. ej. los "thioMAb", en los que uno o más restos de un anticuerpo se han sustituido por restos cisteína. En formas de ejecución particulares, los restos sustituidos aparecen en sitios accesibles del anticuerpo. Sustituyendo tales restos por cisteína, los grupos tiol reactivos quedan posicionados de esta manera en sitios accesibles del anticuerpo y pueden emplearse para conjugar el anticuerpo con otros restos, por ejemplo con restos de fármacos o con restos de fármacos de engarce, para crear un inmunoconjugado, del modo que se describe a continuación. En ciertas formas de ejecución, uno cualquiera o más de los restos siguientes puede sustituirse por cisteína: el V205 (numeración de Kabat) de la cadena corta; el A118 (numeración EU) de la cadena larga; y el S400 (numeración EU) de la región Fc de la cadena larga. Los anticuerpos de ingeniería de cisteína pueden generarse del modo descrito p. ej. en US 7,521,541.

e) Derivados de anticuerpo

En ciertas formas de ejecución, un anticuerpo proporcionado en la presente puede seguir modificándose para contener restos no proteináceos adicionales, que son conocidos en la técnica y de fácil disponibilidad. Los restos idóneos para la derivatización del anticuerpo incluyen pero no se limitan a los polímeros solubles en agua. Los ejemplos no limitantes de polímeros solubles en agua incluyen, pero no se limitan a: polietilenglicol (PEG), copolímeros de etilenglicol y propilenglicol, carboximetilcelulosa, dextrano, alcohol polivinílico, polivinilpirrolidona, poli-1,3-dioxolano, poli-1,3,6-trioxano, copolímeros de etileno y anhídrido maleico, poliaminoácidos (tanto homopolímeros como copolímeros aleatorios) y dextrano o poli(N-vinil-pirrolidona)polietilenglicol, homopolímeros del propilenglicol, copolímeros de óxido de propileno y óxido de etileno, polioles polietoxilados (p. ej. glicerina), alcohol polivinílico y mezclas de los mismos. El propionaldehído del polietilenglicol puede tener ventajas en la fabricación gracias a su estabilidad en agua. El polímero puede tener cualquier peso molecular y puede ser ramificado o sin ramificar. El número de polímeros unidos al anticuerpo puede variar y si hay más de un polímero unido, entonces podrán ser moléculas iguales o diferentes. En general, el número y/o tipo de polímeros empleados para la derivatización puede determinarse en base a consideraciones que incluyen, pero no se limitan a las propiedades o funciones particulares del anticuerpo a mejorar, a si el derivado de anticuerpo se va a emplear en terapia en condiciones definidas, etc.

En otra forma de ejecución se proporcionan conjugados de un anticuerpo y el resto no proteináceo que pueden calentarse selectivamente por exposición a la radiación. En una forma de ejecución, el resto no proteináceo es un nanotubo de carbono (Kam, N.W. y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102, 11600-11605, 2005). La radiación puede ser de cualquier longitud de onda e incluye, pero no se limita a: longitudes de onda que no dañan a las células ordinarias, pero que calientan al resto no proteináceo a una temperatura, en la que resultan muertas las células proximales al resto no proteináceo del anticuerpo.

B. Métodos recombinantes y composiciones

Los anticuerpos pueden producirse empleando métodos recombinantes y composiciones descritos p. ej. en US 4,816,567. En una forma de ejecución se proporciona un ácido nucleico aislado que codifica a un anticuerpo biespecífico anti-CD20 humano/receptor de transferrina humano aquí descrito. En otra forma de ejecución, se proporcionan uno o más vectores (p. ej. vectores de expresión) que

contienen dicho ácido nucleico. En otra forma de ejecución se proporciona una célula hospedante que contiene tal ácido nucleico. En una forma de ejecución, la célula hospedante es eucariota, p. ej. una célula de ovario de hámster chino (Chinese Hamster Ovary = CHO) o una célula linfóide (p. ej. una célula Y0, NS0, Sp20). En una forma de ejecución se proporciona un método de obtención de un anticuerpo biespecífico anti-CD20 humano/receptor de transferrina humano, dicho método consiste en cultivar una célula hospedante que contiene un ácido nucleico que codifica al anticuerpo, proporcionado antes, en condiciones idóneas para la expresión del anticuerpo y opcionalmente recuperar el anticuerpo de la célula hospedante (o del medio de cultivo de la célula hospedante).

Para la producción recombinante de un anticuerpo biespecífico anti-CD20 humano/receptor de transferrina humano, se aísla el ácido nucleico que codifica al anticuerpo, p. ej. del modo antes descrito, y se inserta en uno o más vectores para continuar la clonación y/o expresión en una célula hospedante. Tal ácido nucleico puede aislarse y secuenciarse fácilmente por procedimientos convencionales (p. ej. empleando sondas de oligonucleótido que son capaces de unirse específicamente a los genes que codifican las cadenas largas y/o cortas del anticuerpo).

Las células hospedantes idóneas para la clonación o expresión de los vectores que codifican a los anticuerpos incluyen a las células procariotas y eucariotas aquí descritas. Por ejemplo, los anticuerpos pueden producirse en bacterias, en particular cuando no se necesitan la glicosilación ni la función efectora de Fc. Para la expresión de fragmentos de anticuerpo y polipéptidos en bacterias véase p. ej. US 5,648,237, US 5,789,199 y US 5,840,523 (ver también Charlton, K.A., *Methods in Molecular Biology*, vol. 248, pp. 245-254, 2003, Lo, B.K.C. (coord.), Humana Press, Totowa, NJ, donde se describe la expresión de fragmentos de anticuerpo en *E. coli*). Después de la expresión, el anticuerpo puede aislarse de la pasta de células bacterianas en una fracción soluble y seguir purificándose.

Además de los microbios procariotas son hospedantes idóneos para la clonación y expresión los eucariotas, por ejemplo los hongos filamentosos o la levadura, para los vectores que codifican a los anticuerpos, incluidos los hongos y las cepas de levadura, cuyos mecanismos de glicosilación se han “humanizado”, conduciendo a la producción de un anticuerpo con modelos de glicosilación parcial o totalmente humanos, véase Gerngross, T.U., *Nat. Biotech.* 22, 1409-1414, 2004; y Li, H. y col., *Nat. Biotech.* 24, 210-215, 2006.

Las células hospedantes idóneas para la expresión de anticuerpos glicosilados se derivan también de organismos multicelulares (invertebrados y vertebrados). Los ejemplos de células de invertebrados incluyen a las células de plantas y de insectos. Se han identificado numerosas cepas de baculovirus, que pueden emplearse en combinación con células de insectos, en especial para la transfección de células de *Spodoptera frugiperda*.

Los cultivos de células vegetales pueden emplearse también como hospedantes, véase p. ej. US 5,959,177, US 6,040,498, US 6,420,548, US 7,125,978 y US 6,417,429 (donde se describe la tecnología PLANTIBODIES™ para producir anticuerpos en plantas transgénicas).

Las células de vertebrados pueden emplearse también como hospedantes. Pueden ser útiles por ejemplo las líneas celulares de mamíferos que se adaptan para cultivos en suspensión. Otros ejemplos de líneas de células hospedantes de mamíferos útiles son la línea CV1 de riñón de mono transformada con SV40 (COS-7); la línea de riñón embrionario humano (293 o células 293 descritas p. ej. en Graham, F.L. y col., J. Gen Virol. 36, 59-74, 1977); las células renales de hámster bebé (BHK); células de Sertoli de ratón (células TM4 descritas p. ej. en Mather, J.P., Biol. Reprod. 23, 243-252, 1980); células renales de mono (CV1); células renales de mono verde africano (VERO-76); células de carcinoma cervical humano (HELA); células renales caninas (MDCK); células de hígado de rata búfalo (BRL 3A); células pulmonares humanas (W138); células hepáticas humanas (Hep G2); células de tumor de mama de ratones (MMT 060562); células TRI descritas p. ej. en Mather, J.P. y col., Annals N.Y. Acad. Sci. 383, 44-68, 1982; células MRC 5; y células FS4. Otras líneas de células hospedantes de mamíferos útiles incluyen a las células de ovario de hámster chino (CHO), incluidas las células DHFR⁻ CHO (Urlaub, G. y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 4216-4220, 1980); y las líneas celulares de mieloma, por ejemplo la Y0, NS0 y Sp2/0. Una revisión de ciertas líneas de células hospedantes de mamíferos idóneas para la producción de anticuerpos se encontrará p. ej. en Yazaki, P. y Wu, A.M., Methods in Molecular Biology, vol. 248, pp. 255-268, 2004, Lo, B.K.C. (coord.), Humana Press, Totowa, NJ.

C. Métodos y composiciones para el diagnóstico y la detección

En ciertas formas de ejecución, cualquiera de los anticuerpos biespecíficos anti-CD20 humano/receptor de transferrina humano aquí proporcionados es útil para detectar la presencia del CD20 en una muestra biológica. El término “detectar” se

emplea aquí para indicar la detección cuantitativa o la cualitativa. En ciertas formas de ejecución, una muestra biológica contiene una célula o un tejido.

En una forma de ejecución se proporciona un anticuerpo biespecífico anti-CD20 humano/receptor de transferrina humano para usar en un método de diagnóstico o de detección. En otro aspecto se proporciona un método para detectar la presencia del CD20 en una muestra biológica. En ciertas formas de ejecución, el método consiste en poner en contacto la muestra biológica con un anticuerpo biespecífico anti-CD20 humano/receptor de transferrina humano aquí descrito en condiciones que permitan la unión del anticuerpo biespecífico anti-CD20 humano/receptor de transferrina humano con el CD20 y detectar si se ha formado un complejo entre el anticuerpo biespecífico anti-CD20 humano/receptor de transferrina humano y el CD20. Dicho método puede ser un método “in vitro” o “in vivo”.

En ciertas formas de ejecución se proporcionan anticuerpos biespecíficos marcados anti-CD20 humano/receptor de transferrina humano. Los marcadores incluyen, pero no se limitan a: marcadores o restos que se detectan directamente (por ejemplo los marcadores fluorescentes, cromóforos, opacos a los electrones, quimioluminiscentes y radiactivos), así como los restos, por ejemplo enzimas o ligandos, que se detectan indirectamente, p. ej. por una reacción enzimática o por una interacción molecular. Los ejemplos de marcadores incluyen, pero no se limitan a: los radioisótopos P^{32} , C^{14} , I^{125} , H^3 e I^{131} , los fluoróforos, por ejemplo los quelatos de tierras raras y la fluoresceína y sus derivados, la rodamina y sus derivados, el dansil, las umbeliferonas, las luciferinas, p. ej. la luciferasa de luciérnaga y las luciferinas bacterianas (US 4,737,456), la luciferina, las 2,3-dihidroftalazinadionas, la peroxidasa de rábano rústico (horseradish) (HRP), la fosfatasa alcalina, la β -galactosidasa, la glucoamilasa, la lisozima, las sacárido-oxidasas, p. ej. la glucosa-oxidasa, la galactosa-oxidasa y la glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa, las oxidasas heterocíclicas, por ejemplo la uricasa y xantina-oxidasa, asociadas a una enzima que utiliza peróxido de hidrógeno para oxidar un compuesto previo de colorante, por ejemplo la HRP, la lactoperoxidasa o la microperoxidasa, biotina/avidina, los marcadores de centrifugación (spin labels), los marcadores de bacteriófago, los radicales libres estables y similares.

D. Inmunoconjugados

La invención proporciona también inmunoconjugados que contienen un anticuerpo anti-CD20 humano/receptor de transferrina humano aquí descrito conjugado con uno

o más agentes citotóxicos, por ejemplo agentes o fármacos quimioterapéuticos, agentes inhibidores del crecimiento, toxinas (p. ej., toxinas de proteína, toxinas activas enzimáticamente de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, o fragmentos de las mismas), o isótopos radiactivos.

En una forma de ejecución, un inmunoconjugado es un conjugado de anticuerpo y fármaco (ADC), en el que se conjuga un anticuerpo biespecífico con uno o más fármacos, incluidos, pero sin limitarse a ellos: un maitansinoide (ver US 5,208,020, US 5,416,064 y EP 0 425 235 B1); una auristatina, por ejemplo los restos DE y DF de fármaco monometil-auristatina (MMAE y MMAF) (ver US 5,635,483, US 5,780,588 y US 7,498,298); una dolastatina; una caliqueamicina o derivado de la misma (ver US 5,712,374, US 5,714,586, US 5,739,116, US 5,767,285, US 5,770,701, US 5,770,710, US 5,773,001 y US 5,877,296; Hinman, L.M. y col., Cancer Res. 53, 3336-3342, 1993; y Lode, H.N. y col., Cancer Res. 58, 2925-2928, 1998); una antraciclina, por ejemplo la daunomicina o la doxorubicina (ver Kratz, F. y col., Curr. Med. Chem. 13, 477-523, 2006; Jeffrey, S.C. y col., Bioorg. Med. Chem. Lett. 16, 358-362, 2006; Torgov, M.Y. y col., Bioconjug. Chem. 16, 717-721, 2005; Nagy, A. y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97, 829-834, 2000; Dubowchik, G.M. y col., Bioorg. & Med. Chem. Letters 12, 1529-1532, 2002; King, H.D. y col., J. Med. Chem. 45, 4336-4343, 2002; y US 6,630,579); metotrexato; vindesina; un taxano, por ejemplo docetaxel, paclitaxel, larotaxel, tesetaxel y ortataxel; un tricoteceno; y CC1065.

En otra forma de ejecución, un inmunoconjugado contiene un anticuerpo biespecífico aquí descrito conjugado con una toxina activa enzimáticamente o un fragmento de la misma, incluidas, pero sin limitarse a ellas: la cadena A de la difteria, los fragmentos activos no ligantes de la toxina de la difteria, la cadena A de la exotoxina (de la *Pseudomonas aeruginosa*), la cadena A de la ricina, la cadena A de la abrina, la cadena A de la modecina, la alfa-sarcina, las proteínas del *Aleurites fordii*, las proteínas de diantina, las proteínas de la *Phytolacca americana* (PAPI, PAPII y PAP-S), el inhibidor de la *Momordica charantia*, la curcina, la crotina, el inhibidor de la *Saponaria officinalis*, la gelonina, la mitogelina, la restrictocina, la fenomicina, la enomicina y los tricotecenos. Véase, por ejemplo, la patente WO 93/21232 publicada con fecha 28 de octubre de 1993.

En otra forma de ejecución, un inmunoconjugado contiene un anticuerpo biespecífico aquí descrito conjugado con un átomo radiactivo para formar un radioconjugado. Se

dispone de una gran variedad de isótopos radiactivos para la producción de los radioconjugados. Los ejemplos incluyen al At^{211} , I^{131} , I^{125} , Y^{90} , Re^{186} , Re^{188} , Sm^{153} , Bi^{212} , P^{32} , Pb^{212} y los isótopos radiactivos del Lu. Si el radioconjugado se emplea para la detección, entonces podrá contener un átomo radiactivo para estudios escintigráficos, por ejemplo el $\text{Tc}^{99\text{m}}$ o I^{123} , o un marcador de centrifugación (spin label) para la generación de imágenes por resonancia magnética nuclear (RMN) (también conocida como generación de imágenes por resonancia magnética, MRI), por ejemplo de nuevo el yodo-123, el yodo-131, el indio-111, el flúor-19, el carbono-13, el nitrógeno-15, el oxígeno-17, el gadolinio, el manganeso o el hierro.

Los conjugados de anticuerpo biespecífico y agente citotóxico pueden obtenerse empleando una gran variedad de agentes de condensación bifuncionales, por ejemplo el propionato de N-succinimidil-3-(2-piridilditio) (SPDP), el ciclohexano-1-carboxilato de succinimidil-4-(N-maleimido-metilo) (SMCC), el iminotiolano (IT), los derivados bifuncionales de imidoésteres (por ejemplo el HCl del adipimidato de dimetilo), los ésteres activos (por ejemplo el suberato de disuccinimidilo), los aldehídos (por ejemplo glutaraldehído), los compuestos bis-azido (por ejemplo la bis-(p-azidobenzoil)-hexanodiamina), los derivados de bis-diazonio (por ejemplo la bis-(p-diazoniobenzoil)-etileno-diamina), los diisocianatos (por ejemplo el 2,6-diisocianato de tolueno) y los compuestos de bis-flúor activo (por ejemplo el 1,5-difluor-2,4-dinitrobenzeno). Puede obtenerse por ejemplo una inmunotoxina de ricina del modo descrito en Vitetta, E.S. y col., *Science* **238**, 1098-1104, 1987. El ácido 1-isotiocianatobencil-3-metildietileno-triamina-pentaacético (MX-DTPA) marcado con carbono-14 es un agente quelante ilustrativo de la conjugación de radionucleótidos con el anticuerpo. Véase WO 94/11026. El engarce puede ser un “engarce iliminable” que facilite la liberación de un fármaco citotóxico en la célula. Puede emplearse por ejemplo un engarce de ácido lábil, un engarce sensible a la peptidasa, un engarce fotolábil, un engarce dimetilo o un engarce que contenga disulfuro (Chari, R.V. y col., *Cancer Res.* **52**, 127-131, 1992; US 5,208,020).

Los inmunoconjugados o ADC contemplados explícitamente en la presente, pero sin limitarse a ellos, se obtienen con reactivos de engarce cruzado, que incluyen, pero no se limitan a: BMPS, EMCS, GMBS, HBVS, LC-SMCC, MBS, MPBH, SBAP, SIA, SIAB, SMCC, SMPB, SMPH, sulfo-EMCS, sulfo-GMBS, sulfo-KMUS, sulfo-MBS, sulfo-SIAB, sulfo-SMCC, sulfo-SMPB y SVSB (succinimidil-(4-vinilsulfona)benzoato), que son productos comerciales (p. ej., de Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL., EE.UU.).

Se contemplan también en la presente los conjugados de un anticuerpo biespecífico aquí descrito y una o más toxinas de molécula pequeña, por ejemplo una caliqueamicina, una maitansina (US5,208,020), un tricoteno y el CC1065. En una forma de ejecución de la invención, el anticuerpo biespecífico está conjugado con una o más moléculas de maitansina (p. ej. aprox. de 1 a 10 moléculas de maitansina por molécula de antagonista). La maitansina puede convertirse, por ejemplo, en la May-SS-Me, que puede reducirse a la May-SH3 y hacerse reaccionar con un antagonista modificado (Chari y col., Cancer Research 52, 127-131, 1992) para generar un conjugado de maitansinoide y anticuerpo.

Como alternativa, el anticuerpo biespecífico aquí descrito está conjugado con una o más moléculas de caliqueamicina. Los antibióticos del grupo de la caliqueamicina son capaces de producir roturas en el DNA de doble hebra en concentraciones sub-picomolares. Los análogos estructurales de la caliqueamicina, que pueden emplearse en la presente, incluyen, pero no se limitan a: γ 1 I, α 2 I, α 3 I, N-acetil- γ 1 I, PSAG y θ 1 I (Hinman y col., Cancer Research 53, 3336-3342, 1993 y Lode y col., Cancer Research 58, 2925-2928, 1998).

La presente invención contempla además un anticuerpo biespecífico aquí descrito conjugado con un compuesto provisto de actividad nucleolítica (p. ej. una ribonucleasa o una endonucleasa de DNA, por ejemplo una desoxirribonucleasa; DNasa).

Como alternativa puede obtenerse una proteína de fusión que contenga el anticuerpo biespecífico aquí descrito y un agente citotóxico, p. ej. por técnicas recombinantes o por síntesis de péptidos.

E. Formulaciones farmacéuticas

Las formulaciones farmacéuticas de un anticuerpo biespecífico anti-CD20 humano/receptor de transferrina humano aquí descrito se fabrican mezclando dicho anticuerpo que tiene el grado deseado de pureza con uno u opcionalmente más vehículos farmacéuticamente aceptables (Remington's Pharmaceutical Sciences, 16ª edición, Osol, A. (coord.) (1980)), en forma de formulaciones liofilizadas o de soluciones acuosas. Los vehículos farmacéuticamente aceptables en general no son tóxicos para los receptores en las dosis y concentraciones empleadas y incluyen, pero no se limitan a: tampones, por ejemplo fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes, incluidos el ácido ascórbico y la metionina; conservantes (por ejemplo

el cloruro de octadecildimetilbencilamonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio; cloruro de bencetonio; fenol, alcohol butílico o bencílico; alquil-parabenos, por ejemplo el metil- o el propil-paraben; catecol; resorcina; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); polipéptidos de peso molecular bajo (menos de 10 restos); proteínas, por ejemplo la albúmina del suero, la gelatina o las inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos, por ejemplo la poli(vinilpirrolidona); aminoácidos, por ejemplo la glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros hidratos de carbono, incluidas la glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes, por ejemplo el EDTA; azúcares, por ejemplo la sucrosa, manita, trehalosa o sorbita; contraiones que forman sales, por ejemplo el sodio; complejos metálicos (p. ej. los complejos de Zn y proteínas); y/o tensioactivos no iónicos, p. ej. el polietilenglicol (PEG). Los vehículos ilustrativos farmacéuticamente aceptables en la presente incluyen además a los agentes de dispersión intersticial de fármacos, por ejemplo las glicoproteínas de hialuronidasa neutras-activas solubles (sHASEGP), por ejemplo las glicoproteínas de hialuronidasa PH-20 humanas solubles, tales como la rhuPH20 (HYLENEX[®], Baxter International Inc.). Ciertas sHASEGP ilustrativas y los métodos de uso, incluida la rhuPH20, se han descrito en US 2005/0260186 y US 2006/0104968. En un aspecto se combina una sHASEGP con una o más glicosaminoglicanasas adicionales, por ejemplo las condroitinasas.

Se han descrito formulaciones ilustrativas de anticuerpos liofilizados en US 6,267,958. Las formulaciones acuosas de anticuerpos incluyen a las descritas en US 6,171,586 y WO 2006/044908, estas últimas formulaciones incluyen un tampón de histidina-acetato. En el documento WO 90/56418, que se incorpora explícitamente a la presente como referencia, se describen formulaciones ilustrativas de anticuerpo anti-CD20.

En el documento WO 97/04801 se describen formulaciones liofilizadas adaptadas a la administración subcutánea. Dichas formulaciones liofilizadas pueden reconstituirse con un diluyente apropiado para formar una formulación de alta concentración de proteínas y la formulación reconstituida puede administrarse por vía subcutánea al mamífero a tratar.

La formulación presente puede contener también más de un ingrediente activo si fuera necesario para la indicación concreta a tratar, con preferencia aquellos que despliegan actividades complementarias, que no interfieren negativamente entre sí.

Tales ingredientes activos están presentes de modo conveniente en combinación, en cantidades que son eficaces para el fin perseguido.

Los ingredientes activos pueden alojarse en microcápsulas preparadas, por ejemplo, por técnicas de coacervación o por polimerización interfacial, por ejemplo, microcápsulas de hidroximetilcelulosa o de gelatina y microcápsulas poli(metacrilato de metilo), respectivamente, en sistemas de entrega farmacológica coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Dichas técnicas se han descrito en Remington's Pharmaceutical Sciences, 16ª edición, Osol, A. (coord.) (1980).

Pueden fabricarse preparaciones de liberación sostenida. Los ejemplos idóneos de preparaciones de liberación sostenida incluyen la matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos, que contienen el anticuerpo, dichas matrices se presentan en forma de artículos moldeados, p. ej. películas o microcápsulas. Los ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen a los poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(metacrilato de 2-hidroxietilo), alcohol polivinílico, polilactidas (US 3,773,919), copolímeros de ácido L-glutámico y L-glutamato de γ -etilo, copolímeros de etileno-acetato de vinilo no degradables, copolímeros de ácido láctico-ácido glicólico degradables, por ejemplo el LUPRON DEPOT™ (microesferas inyectables compuestas por un copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolida) y el ácido poli-D-(-)-3-hidroxibutírico.

Las formulaciones a emplear para la administración "in vivo" son en general estériles. La esterilidad puede lograrse fácilmente, p. ej. por filtración a través de membranas estériles. En una forma de ejecución, la formulación es isotónica.

F. Métodos terapéuticos y composiciones

En los métodos terapéuticos puede emplearse cualquiera de los anticuerpos biespecíficos anti-CD20 humano/receptor de transferrina humano aquí proporcionados.

En un aspecto se proporciona un anticuerpo biespecífico anti-CD20 humano/receptor de transferrina humano para el uso como medicamento. En otros aspectos se proporciona un anticuerpo biespecífico anti-CD20 humano/receptor de transferrina humano para el uso en la prevención y/o el tratamiento de una enfermedad proliferativa de células B. En ciertas formas de ejecución se proporciona

un anticuerpo biespecífico anti-CD20 humano/receptor de transferrina humano para el uso en un método de tratamiento. En ciertas formas de ejecución se proporciona un anticuerpo biespecífico anti-CD20 humano/receptor de transferrina humano para el uso en un método de tratamiento de un individuo que tenga una enfermedad proliferativa de células B, que consiste en administrar al individuo una cantidad eficaz del anticuerpo biespecífico anti-CD20 humano/receptor de transferrina humano. En una forma de ejecución de este tipo, el método consiste además en administrar al individuo una cantidad eficaz de al menos un agente terapéutico adicional, por ejemplo uno de los que figuran en el listado posterior. En otras formas de ejecución se proporciona un anticuerpo biespecífico anti-CD20 humano/receptor de transferrina humano para el uso en la disminución de las células B secuestradas en el cerebro que expresan al CD20. En ciertas formas de ejecución se proporciona un anticuerpo biespecífico anti-CD20 humano/receptor de transferrina humano para el uso en el método de disminuir las células B secuestradas en el cerebro que expresan al CD20 en un individuo, que consiste en administrar al individuo una cantidad eficaz del anticuerpo biespecífico anti-CD20 humano/receptor de transferrina humano para disminuir las células B secuestradas en el cerebro que expresan al CD20. Un "individuo" según una cualquiera de las formas de ejecución anteriores es con preferencia un ser humano.

En otro aspecto se proporciona el uso de un anticuerpo biespecífico anti-CD20 humano/receptor de transferrina humano para la fabricación o preparación de un medicamento. En una forma de ejecución, el medicamento está destinado al tratamiento de una enfermedad proliferativa de las células B. En otra forma de ejecución, el medicamento está destinado al uso en un método de tratamiento de una enfermedad proliferativa de células B, que consiste en administrar a un individuo que sufra una enfermedad proliferativa de células B una cantidad eficaz del medicamento. En una forma de ejecución de este tipo, el método consiste además en administrar al individuo una cantidad eficaz de al menos un agente terapéutico adicional, por ejemplo uno de los que figuran en el listado posterior. En otra forma de ejecución, el medicamento está destinado a la disminución de las células B secuestradas en el cerebro que se expresan en el CD20. En otra forma de ejecución, el medicamento está destinado al uso en un método para disminuir las células B secuestradas en el cerebro que se expresan en el CD20 de un individuo, que consiste en administrar al individuo una cantidad eficaz de dicho medicamento para disminuir células B secuestradas en el cerebro que se expresan en el CD20. Un

“individuo” según una cualquiera de las formas de ejecución anteriores puede ser un humano.

En otro aspecto se proporciona un método para tratar una enfermedad proliferativa de las células B. En una forma de ejecución, el método consiste en administrar a un individuo que sufra una enfermedad proliferativa de las células B una cantidad eficaz de un anticuerpo biespecífico anti-CD20 humano/receptor de transferrina humano.

En una forma de ejecución de este tipo, el método consiste además en administrar al individuo una cantidad eficaz de al menos un agente terapéutico adicional, por ejemplo uno de los que figuran en el listado posterior. Un “individuo” según una cualquiera de las formas de ejecución anteriores puede ser un humano.

En otro aspecto, se proporciona un método para disminuir las células B circulantes, que se expresan en el CD20, de un individuo. En una forma de ejecución, el método consiste en administrar al individuo una cantidad eficaz de un anticuerpo biespecífico anti-CD20 humano/receptor de transferrina humano para disminuir las células B circulantes, que se expresan en el CD20. En una forma de ejecución, un “individual” es un ser humano.

En otro aspecto se proporcionan aquí formulaciones farmacéuticas que contienen uno cualquiera de los anticuerpos biespecíficos anti-CD20 humano/receptor de transferrina humanos aquí proporcionados, p. ej. para el uso en uno cualquiera de los métodos terapéuticos anteriores. En una forma de ejecución, una formulación farmacéutica contiene uno cualquiera de los anticuerpos biespecíficos anti-CD20 humano/receptor de transferrina humanos aquí proporcionados y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En otra forma de ejecución, una formulación farmacéutica contiene uno cualquiera de los anticuerpos biespecíficos anti-CD20 humano/receptor de transferrina humanos aquí proporcionados y al menos un agente terapéutico adicional, p. ej. uno de los que figuran en el listado posterior.

Los anticuerpos aquí descritos pueden emplearse en la terapia a título individual o en combinación con otros agentes. Por ejemplo, un anticuerpo aquí descrito puede co-administrarse con al menos un agente terapéutico adicional. En ciertas formas de ejecución, un agente terapéutico adicional es un agente terapéutico eficaz para tratar el mismo trastorno neurológico u otro diferente que el anticuerpo biespecífico aquí descrito pretende tratar.

Estas terapias de combinación recién mencionadas abarcan la administración combinada (en la que se incluyen dos o más agentes terapéuticos en la misma formulación o en formulaciones separadas) y la administración separada, en tal caso la administración del anticuerpo aquí descrito puede realizarse antes, al mismo tiempo y/o después de la administración del o de los agentes terapéuticos adicionales. En una forma de ejecución, la administración del anticuerpo biespecífico anti-CD20 humano/receptor de transferrina humano y la administración de un agente terapéutico adicional pueden tener lugar con un mes, o con una, dos o tres semanas, o con uno, dos, tres, cuatro, cinco o seis días de separación entre sí. Los anticuerpos aquí descritos pueden emplearse también en combinación con otras terapias de intervención, por ejemplo, pero sin limitarse a ellas: la terapia de radiación, la terapia conductista u otras terapias ya conocidas en la técnica, que son apropiadas para tratar o prevenir los trastornos neurológicos.

Un anticuerpo aquí descrito (y cualquier agente terapéutico adicional) puede administrarse por cualquier medio apropiado, incluidas las vías parenteral, intrapulmonar e intranasal y, si se desea, para el tratamiento local, la vía intralesional. Las infusiones parenterales incluyen las vías intramuscular, intravenosa, intraarterial, intraperitoneal y subcutánea. La dosificación puede realizarse por cualquier vía, p. ej. con inyecciones, por ejemplo inyecciones intravenosa o subcutánea, en función en parte de si la administración va a ser breve o crónica. Aquí se contemplan diversos regímenes de dosificación, que incluyen pero no se limitan a la administración única o múltiple a lo largo de varios puntos temporales, la administración de bolo y la infusión pulsante.

Por otro lado, el anticuerpo biespecífico puede administrarse de modo adecuado por infusión pulsante, p. ej. con dosis decrecientes del anticuerpo biespecífico. La dosis puede administrarse por inyección, por inyección intravenosa o subcutánea, dependiendo en parte de si la administración deberá ser de corta duración o crónica. Los anticuerpos aquí descritos deberían formularse, dosificarse y administrarse de manera consistente con la buena práctica médica. Los factores a tomar en consideración en este contexto incluyen el trastorno concreto a tratar, el mamífero concreto a tratar, el estado clínico del paciente individual, la causa del trastorno, el sitio de entrega del agente, el método de administración, el régimen de administración y otros factores que los facultativos ya conocen. El anticuerpo no necesariamente, pero sí opcionalmente, puede formularse con uno o más agentes empleados habitualmente para prevenir o tratar el trastorno en cuestión. La cantidad

eficaz de los agentes adicionales dependerá de la cantidad de anticuerpo presente en la formulación, el tipo de trastorno o tratamiento y otros factores ya debatidos antes. Estos se emplean en general en las mismas dosis y con las mismas vías de administración aquí descritas, o en una cantidad comprendida entre el 1 y el 99 % de las dosis aquí descritas, o en cualquier dosis y por cualquier vía que se determine que es apropiada desde el punto de vista empírico o clínico.

Los métodos de transporte basados en lípidos del constructo de fusión o de un compuesto a través de la barrera hematoencefálica (BBB) incluyen, pero no se limitan a: encapsular el constructo de fusión o un compuesto en liposomas que están asociadas a una entidad monovalente que se une a los receptores en el endotelio vascular de la BBB (ver p. ej. US 2002/0025313) y recubrir la entidad monovalente de unión con partículas de lipoproteína de baja densidad (ver p. ej. US 2004/0204354) o con apolipoproteína E (ver p. ej. US 2004/0131692).

Para la prevención o tratamiento de la enfermedad, la dosis apropiada de un anticuerpo aquí descrito (cuando se emplea solo o en combinación con uno o más agentes terapéuticos adicionales) dependerá del tipo de enfermedad a tratar, del tipo de anticuerpo, de la severidad y curso de la enfermedad, de si el anticuerpo se administra con fines preventivos o terapéuticos, de la terapia previa, del historial clínico del paciente, de la respuesta al anticuerpo y del criterio del facultativo que atiende al paciente. El anticuerpo se administra de modo conveniente al paciente en una vez o a lo largo de una serie de tratamientos. En función del tipo y severidad de la enfermedad, la dosis inicial propuesta para la administración al paciente puede situarse aprox. entre 1 $\mu\text{g/kg}$ y 15 mg/kg (p. ej. entre 0,5 mg/kg y 10 mg/kg) de anticuerpo, ya sea, por ejemplo, en una sola administración o en varias administraciones separadas, o por infusión continua. Un intervalo típico de dosificación diaria podría situarse entre aprox. 1 $\mu\text{g/kg}$ y 100 mg/kg o más, en función de los factores recién mencionados. Para las administraciones repetidas a lo largo de varios días o más, en función del estado patológico, el tratamiento debería mantenerse en general hasta lograr la supresión deseada de los síntomas de la enfermedad. Un ejemplo de dosificación del anticuerpo podría situarse aprox. entre 0,05 mg/kg y 10 mg/kg . Por lo tanto, podrían administrarse al paciente una o más dosis de aprox. 0,5 mg/kg , 2,0 mg/kg , 4,0 mg/kg o 10 mg/kg (o cualquier combinación de las mismas). Dichas dosis pueden administrarse de modo intermitente, p. ej. cada semana o cada tres semanas (p. ej. de tal manera que el paciente reciba entre dos y veinte o p. ej. unas seis dosis del anticuerpo). Puede

administrarse una dosis inicial de mayor carga, seguida por una o más dosis de menor cuantía. Sin embargo pueden ser también útiles otros regímenes de dosificación. Puede hacerse fácilmente el seguimiento del progreso de esta terapia por técnicas y ensayos convencionales.

Se da por supuesto que cualquiera de las formulaciones o métodos terapéuticos anteriores pueden llevarse a la práctica empleando un inmunoconjugado aquí descrito en lugar de o además de un anticuerpo biespecífico anti-CD20 humano/receptor de transferrina humano.

La composición que contiene un anticuerpo biespecífico aquí descrito, que se une a un antígeno de superficie de células B, podrá formularse, dosificarse y administrar de una manera consistente con la buena práctica médica. Los factores a tomar en consideración en este contexto incluyen la enfermedad o trastorno concretos a tratar, el mamífero concreto a tratar, el estado patológico del paciente individual, la causa de la enfermedad o trastorno, el sitio en el que se entrega el agente, el método de administración, el régimen de administración y otros factores que los facultativos médicos ya conocen. La cantidad terapéuticamente eficaz del antagonista a administrar dependerá de tales consideraciones.

Aparte del tratamiento de las enfermedades proliferativas de las células B, el anticuerpo biespecífico aquí descrito puede emplearse para el tratamiento de las enfermedades autoinmunes. Los ejemplos de enfermedades o trastornos autoinmunes incluyen, pero no se limitan a: las trombocitopenias de origen inmune, por ejemplo la púrpura trombocitopénica idiopática aguda y la púrpura trombocitopénica idiopática crónica, la dermatomiositis, la corea de Sydenham, el lupus nefrítico, la fiebre reumática, los síndromes poliglandulares, la púrpura de Henoch-Schonlein, la nefritis post-estreptococal, el eritema nodoso, la arteritis de Takayasu, la enfermedad de Addison, el eritema multiforme, la poliarteritis nodosa, la espondilitis anquilosante, el síndrome de Goodpasture, la tromboangitis obliterante, la cirrosis biliar primaria, la tiroiditis de Hashimoto, la tirotoxicosis, la hepatitis activa crónica, la polimiositis/dermatomiositis, la policondritis, el pénfigo vulgar, la granulomatosis de Wegener, la nefropatía membranosa, la esclerosis lateral amiotrófica, la tabes dorsal, la polimioglia, la anemia perniciosa, la glomerulonefritis de progreso rápido y la alveolitis fibrosante, las respuestas inflamatorias, por ejemplo las enfermedades inflamatorias de la piel, incluidas la psoriasis y la dermatitis (p. ej. la dermatitis atópica); el escleroderma sistémico y la esclerosis; las respuestas

asociadas a la enfermedad del intestino inflamatorio (por ejemplo la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa); el síndrome del distrés respiratorio (incluido el síndrome del distrés respiratorio del adulto, ARDS); la dermatitis; la meningitis; la encefalitis; la uveítis; la colitis; la glomerulonefritis; los estados patológicos alérgicos, por ejemplo el eccema y el asma y otros estados patológicos en los que interviene la infiltración de las células T y las respuestas inflamatorias crónicas; la aterosclerosis; la deficiencia de adhesión de leucocitos; la artritis reumatoide; el lupus eritematoso sistémico (SLE); la diabetes mellitus (p. ej. la diabetes mellitus de tipo 1 o la diabetes mellitus dependiente de la insulina); la esclerosis múltiple; el síndrome de Reynaud; la tiroiditis autoinmune; la encefalomiелitis alérgica; el síndrome de Sjogren; la diabetes de inicio juvenil; y las respuestas inmunes asociadas con la hipersensibilidad aguda y retardada mediadas por citoquinas y linfocitos T, presentes normalmente en caso de tuberculosis, la sarcoidosis, la polimiositis, la granulomatosis y la vasculitis; la amenia perniciosa (enfermedad de Addison); las enfermedades, en las que interviene la diapedesis de leucocitos; los trastornos inflamatorios del sistema nervioso central (SNC); el síndrome de la lesión de múltiples órganos; la anemia hemolítica (incluidas pero sin limitarse a ellas la crioglobulinemia o la anemia positiva de Coombs); la miastenia grave; las enfermedades mediadas por complejos de antígeno-anticuerpo; las enfermedades de membrana basal anti-glomerular; el síndrome de anti-fosfolípidos; la neuritis alérgica; la enfermedad de Graves; el síndrome miasténico de Lambert-Eaton; el pénfigoide buloso; el pénfigo; las poliendocrinopatías autoinmunes; la enfermedad de Reiter; el síndrome del hombre rígido; la enfermedad de Bechet; la arteritis de células gigantes; la nefritis de complejo inmune; la nefropatía de IgA; las polineuropatías de IgM; la púrpura trombocitopénica inmune (ITP) o la trombocitopenia autoinmune, etc. En este aspecto de la invención, los ABM de la invención se emplean para disminuir las células B normales de la sangre durante un período prolongado.

No obstante, tal como se ha mencionado antes, las cantidades sugeridas de anticuerpo biespecífico son objeto en alto grado del criterio terapéutico. El factor clave en el momento de elegir la dosis y el régimen apropiado es el resultado obtenido, tal como se indicado antes. Por ejemplo, inicialmente es posible que se requieran dosis relativamente altas para el tratamiento de enfermedades en curso y agudas. Para obtener los resultados eficaces máximos, en función de la enfermedad o trastorno, se administrará el antagonista lo antes posible después del primer signo, diagnóstico, aparición o manifestación de la enfermedad o trastorno o durante la remisión de dicha enfermedad o trastorno.

Aparte de la administración de los anticuerpos biespecíficos aislados aquí descritos al paciente, la presente solicitud contempla la administración del anticuerpo biespecífico por terapia genética. Tal administración de ácido nucleico que codifica al anticuerpo biespecífico se incluye dentro de la expresión “administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo biespecífico”, véase, por ejemplo, WO 96/07321 en lo relativo al uso de la terapia genética para generar anticuerpos intracelulares.

Hay dos estrategias principales para introducir el ácido nucleico (alojado opcionalmente en un vector) en las células del paciente: “in vivo” y “ex vivo”. Para la entrega “in vivo” se inyecta el ácido nucleico directamente en el paciente, normalmente en el sitio, en el que se requiere el anticuerpo biespecífico. Para el tratamiento “ex vivo”, se eliminan las células del paciente, se introduce el ácido nucleico en estas células aisladas y se administran las células modificadas en el paciente ya sea directamente o, por ejemplo, encapsuladas dentro de membranas porosas, que se implantan en el paciente (véase p. ej. US 4,892,538 y US 5,283,187). Hay una gran variedad de técnicas disponibles para introducir ácidos nucleicos en células viables. Las técnicas varían en función de si el ácido nucleico se transfiere a células cultivadas “in vitro” o bien “in vivo” a las células del hospedante en cuestión. Las técnicas apropiadas para la transferencia de ácido nucleico a células de mamíferos “in vitro” incluyen el uso de liposomas, electroporación, microinyección, fusión celular, DEAE-dextrano, el método de precipitación de fosfato cálcico, etc. Un vector empleado habitualmente para la entrega del gen “ex vivo” es un retrovirus.

Las técnicas de transferencia de ácido nucleico “in vivo” actualmente preferidas incluyen la transfección con vectores virales (por ejemplo adenovirus, virus del Herpes simple I o adenovirus asociados) y los sistemas basados en lípidos (los lípidos útiles para la transferencia mediada por lípidos de los genes son el DOTMA, DOPE y DC-Chol, por ejemplo). En algunas situaciones es deseable proporcionar la fuente de ácido nucleico con un agente que se dirige contra las células diana, por ejemplo un anticuerpo específico de una proteína de membrana de superficie celular o la célula diana, un ligando para un receptor de la célula diana, etc. Si se emplean liposomas, las proteínas que se unen a la proteína de membrana de superficie celular asociada con la endocitosis puede emplearse para apuntar a la diana y/o para facilitar la absorción, p. ej. proteínas de cápside o fragmentos de las mismas trópicas para un tipo concreto de células, anticuerpos de proteínas que sufren

internalización en ciclado y proteínas que se dirigen a la localización intracelular e intensifican la vida media intracelular. La técnica de la endocitosis mediada por el receptor se ha descrito, por ejemplo, en Wu y col., J. Biol. Chem. 262, 4429-4432, 1987; y Wagner y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 3410-3414, 1990. Una visión de conjunto de los protocolos actualmente conocidos de marcado genético y de terapia genética se encontrará p. ej. en Anderson y col., Science 256, 808-813, 1992. Véase también WO 93/25673 y las referencias que allí se citan.

Son bien conocidas las técnicas generales para conjugar los agentes terapéuticos adicionales y los anticuerpos (véase, p. ej., Arnon y col., "Monoclonal Antibodies for Immunotargeting of Drugs in Cancer Therapy", en: Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Reisfeld y col. (coord.), pp. 243-56, 1985 (Alan R. Liss, Inc.); Hellstrom y col., "Antibodies For Drug Delivery", en: Controlled Drug Delivery (2ª ed.), Robinson y col. (coord.), pp. 623-53, 1987 (Marcel Dekker, Inc.); Thorpe, "Antibody Carriers of Cytotoxic Agents in Cancer Therapy: A Review", en: Monoclonal Antibodies '84: Biological and Clinical Applications, Pinchera y col. (coord.), pp. 475-506, 1985; y Thorpe y col., "The Preparation and Cytotoxic Properties of Antibody-Toxin Conjugates", Immunol. Rev. 62, 119-58, 1982).

III. Artículos de fabricación industrial

En otro aspecto aquí descrito se proporciona un artículo de fabricación industrial que contiene los materiales útiles para el tratamiento, prevención y/o diagnóstico de los trastornos antes descritos. El artículo de fabricación contiene un recipiente y una etiqueta o prospecto externos o asociados al recipiente. Los recipientes apropiados incluyen, por ejemplo, botellas, viales, jeringuillas, bolsas de solución i.v., etc. Los recipientes pueden fabricarse con una gran variedad de materiales, por ejemplo vidrio o plástico. En el recipiente se aloja la composición, que por sí misma o combinada con otras composición, es eficaz para tratar, prevenir y/o diagnosticar el estado patológico y puede tener un puerto estéril de acceso (por ejemplo, el recipiente puede ser una bolsa de solución intravenosa o un vial que tenga un tapón perforable con una aguja de inyección hipodérmica). Al menos un agente activo de la composición es un anticuerpo aquí descrito. La etiqueta o el prospecto indican que la composición se emplea para tratar el estado patológico de elección. Además, el artículo de fabricación puede contener (a) un primer recipiente con una composición en su interior, dicha composición contiene un anticuerpo aquí descrito; y (b) un segundo recipiente con una composición en su interior, dicha composición contiene otro agente citotóxico o terapéutico de otro tipo. En esta forma de ejecución, el

artículo de fabricación puede contener además un prospecto que indique que las composiciones pueden emplearse para tratar un estado patológico concreto. Como alternativa o de manera adicional, el artículo de fabricación puede contener además un segundo recipiente (o un tercero) que contenga un tampón farmacéuticamente aceptable, por ejemplo agua bacteriostática para inyectables (BWFI), una solución salina tamponada con fosfato, una solución de Ringer o una solución de dextrosa. Puede incluir además otros materiales deseables desde el punto de vista comercial, industrial o del usuario, incluidos otros tampones, diluyentes, filtros, agujas y jeringuillas.

Se da por supuesto que cualquiera de los artículos anteriores de fabricación industrial puede incluir un inmunoconjugado aquí descrito en lugar de o además del anticuerpo biespecífico aquí descrito.

IV. Ejemplos

A continuación se presentan ejemplos de métodos y composiciones de la invención. Se da por supuesto que se pueden llevar a la práctica otras formas de ejecución diferentes, habida cuenta de la descripción general facilitada en párrafos anteriores.

Materiales & métodos generales

La información general respecto a las secuencias de nucleótidos de inmunoglobulinas humanas y cadenas largas y cortas se encontrará en: Kabat, E.A. y col., Sequencies of Proteins of Immunological Interest, 5ª ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991). Los aminoácidos de las cadenas de anticuerpo se numeran y denominan según la numeración con arreglo a Kabat (Kabat, E.A. y col., Sequencies of Proteins of Immunological Interest, 5ª ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)).

Técnicas de DNA recombinante

Los métodos estándar aplicados para manipular el DNA se han descrito en Sambrook, J. y col., Molecular Cloning: A laboratory manual; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, 1989. Los reactivos de biología molecular se emplean con arreglo a las instrucciones del fabricante.

Síntesis de genes

Los segmentos deseados de los genes se obtienen a partir de oligonucleótidos por síntesis química. Los segmentos largos de los genes, que están flanqueados por

sitios de rotura de las endonucleasas de restricción singulares, se acoplan por fusión y ligadura de los oligonucleótidos, incluida la amplificación PCR y después se clonan a través de los sitios de restricción indicados. Las secuencias de DNA de los fragmentos de gen subclonados se confirman por secuenciación del DNA. Los fragmentos de síntesis genética se orden con arreglo a las especificaciones dadas por Geneart (Regensburg, Alemania).

Determinación de la secuencia de DNA

Se determinan las secuencias de DNA por secuenciación de doble hebra realizada en MediGenomix GmbH (Martinsried, Alemania) o SequiServe GmbH (Vaterstetten, Alemania).

Análisis de la secuencia de DNA y proteína y gestión de los datos de secuencia

Se emplean el paquete de programas informáticos de GCG (Genetics Computer Group, Madison, Wisconsin) versión 10.2 y el Infomax's Vector NT1 Advance suite versión 8.0 para la creación de secuencia, mapeo, análisis, anotación e ilustración.

Vectores de expresión

Para la expresión de los anticuerpos biespecíficos descritos pueden aplicarse plásmidos para la expresión transitoria (p. ej. en células HEK293) basados en una organización de cDNA con o sin un promotor CMV de intrón A o en una organización genómica con un promotor CMV.

Aparte del casete de expresión del anticuerpo, los vectores contienen:

- un origen de replicación, que permite la replicación de este plásmido en *E. coli* y
- un gen de β -lactamasa, que confiere resistencia a la ampicilina en *E. coli*.

La unidad de transcripción del gen del anticuerpo está compuesta por los elementos siguientes:

- sitio(s) de restricción únicos en el extremo 5'
- el intensificar temprano inmediato y promotor del citomegalovirus humano,
- la secuencia del intrón A en el caso de organización de cDNA,
- una región 5' sin traducir, derivada de un gen de anticuerpo humano,
- una secuencia de señal de cadena larga de inmunoglobulina,

- la correspondiente cadena de anticuerpo que codifica al ácido nucleico como cDNA o con una de organización genómica de exón-intrón,
- la región 3' sin traducir con una secuencia de señal de poliadenilación,
- una secuencia de terminador y
- sitio(s) de restricción únicos en el extremo 3'.

Los genes de fusión que codifican las cadenas de anticuerpo se generan por PCR y/o por síntesis genética y se acoplan por métodos y técnicas recombinantes ya conocidos conectando los segmentos de ácido nucleico en cuestión, p. ej. empleando sitios de restricción únicos en los vectores correspondientes. Se verifican las secuencias de ácido nucleico subclonadas por secuenciación del DNA. Para las transfecciones transitorias se preparan mayores cantidades de los plásmidos mediante la preparación de plásmidos a partir de cultivos de *E. coli* transformados (Nucleobond AX, Macherey-Nagel).

Se emplea para todos los constructos la tecnología de heterodimerización botón-en-hueco con una sustitución típica de botón (T366W) en el primer dominio CH3 y las correspondientes sustituciones de hueco (T366S, L368A e Y407V) en el segundo dominio CH3 (así como dos restos cisteína S354C/Y349'C introducidos de modo adicional) (contenidos en las secuencias de cadena larga (HC) respectivas correspondientes descritas antes).

Técnicas de cultivo celular

Se emplean las técnicas estándar de cultivo celular descritas en Current Protocols in Cell Biology (2000), Bonifacino, J.S., Dasso, M., Harford, J.B., Lippincott-Schwartz, J. y Yamada, K.M. (coord.), John Wiley & Sons, Inc.

Transfecciones transitorias en el sistema HEK293-F

Los anticuerpos biespecíficos se producen por expresión transitoria. Para ello se realiza una transfección con los plásmidos correspondientes empleando un sistema HEK293-F (Invitrogen) con arreglo a las instrucciones del fabricante. En resumen, se transfectan las células HEK293-F (Invitrogen) cultivadas en suspensión en un matraz agitable o en fermentador con agitador en un medio de expresión FreeStyle™ 293 sin suero (Invitrogen) con una mezcla de los correspondientes plásmidos de expresión y 293fectin™ o fectina (Invitrogen). En el caso del matraz agitable de 2 l (Corning) se siembran las células HEK293-F en una densidad de 1.0×10^6 células/ml en 600 ml y se incuban a 120 rpm, con un 8 % de CO₂. Al día siguiente se

transfectan las células con una densidad de aprox. 1.5×10^6 células/ml con aprox. 42 ml de una mezcla de A) 20 ml de medio Opti-MEM (Invitrogen) que contiene 600 µg de DNA plásmido total (1 µg/ml) y B) 20 ml de medio Opti-MEM suplementado con 1,2 ml de 293fectin o fectina (2 µl/ml). En función del consumo de glucosa se añade una solución de glucosa durante el curso de la fermentación. después de 5-10 días se recoge el líquido sobrenadante que contiene el anticuerpo secretado y los anticuerpos se purifican directamente del líquido sobrenadante o bien se congela el líquido sobrenadante y se almacena.

Determinación de la proteína

Se determina la concentración de proteína de los anticuerpos purificados y derivados midiendo la densidad óptica (OD) a 280 nm, empleando el coeficiente de extinción molar en base a la secuencia de aminoácidos según Pace y col., Protein Science **4**, 2411-1423, 1995.

Determinación de la concentración de anticuerpo en líquidos sobrenadantes

La concentración de anticuerpos y derivados en líquidos sobrenadantes de cultivos celulares se estima por inmunoprecipitación con esferillas de proteína A-agarosa (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania). Para ello se lavan tres veces 60 µl de esferillas de proteína A-agarosa en un medio TBS-NP40 (50 mM de tampón Tris de pH 7,5, suplementado con 150 mM de NaCl y 1 % de Nonidet-P40). A continuación se aplican 1-15 ml líquido sobrenadante de cultivo celular a las esferillas de proteína A-agarosa pre-equilibradas en TBS-NP40. Después de la incubación a temperatura ambiente durante 1 hora se lavan las esferillas en una columna de filtro Ultrafree-MC (Amicon) una vez con 0,5 ml de TBS-NP40, dos veces con 0,5 ml de 2x solución salina tamponada con fosfato (2xPBS, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania) y brevemente cuatro veces con 0,5 ml de tampón citrato Na 100 mM (pH 5,0). Se eluye el anticuerpo fijado por adición de 35 µl de tampón para muestras NuPAGE® LDS (Invitrogen). Se combina la mitad de la muestra con agente reductor de muestras NuPAGE® o se deja sin reducir, respectivamente y se calienta a 70 °C durante 10 min. Seguidamente se aplican 5-30 µl a un gel NuPAGE® Bis-Tris SDS-PAGE del 4-12 % (Invitrogen) (con tampón MOPS para el SDS-PAGE sin reducir y tampón MES con aditivo tampón de trabajo antioxidante NuPAGE® (Invitrogen) para el SDS-PAGE reducido) y se tiñe con el colorante Coomassie Blue.

La concentración de los anticuerpos en los líquidos sobrenadantes de los cultivos celulares se determina cuantitativamente por cromatografía HPLC de afinidad. En resumen, se aplican los líquidos sobrenadantes del cultivo celular, que contienen los anticuerpos que se unen a la proteína A, a una columna de tipo Applied Biosystems Poros A/20 en KH_2PO_4 200 mM, citrato sódico 100 mM de pH 7,4 y se eluyen con NaCl 200 mM, ácido cítrico 100 mM de pH 2,5 en un sistema de tipo Agilent HPLC 1100. Se cuantifica el anticuerpo eluido por absorbancia UV y la integración de las áreas de los picos. Se emplea como patrón un anticuerpo IgG1 estándar purificado. Como alternativa, la concentración de anticuerpos y derivados en líquidos sobrenadantes de cultivos celulares se determina por un ensayo ELISA sandwich-IgG. En resumen, se recubren las placas de microvaloración de 96 hoyos de tipo StreptaWell High Bind Streptavidin A (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania) con 100 μl /hoyo de una molécula de $\text{F(ab')}_2\text{-h-Fc}\gamma$ BI (Dianova) de captura de IgG anti-humana biotinilada a razón de 0,1 $\mu\text{g/ml}$ a temperatura ambiente durante 1 hora o como alternativa a 4°C durante una noche y después se lava tres veces con 200 μl /hoyo de PBS, al 0,05 % en Tween (PBST, Sigma). A continuación se añaden a los hoyos 100 μl /hoyo de una serie de diluciones en PBS (Sigma) del líquido sobrenadante del cultivo celular que contiene el anticuerpo y se incuban en un agitador a temperatura ambiente durante 1-2 horas. Se lavan los hoyos tres veces con 200 μl /hoyo de PBST y se detecta el anticuerpo fijado con 100 μl del $\text{F(ab')}_2\text{-h-Fc}\gamma\text{>POD}$ (Dianova) a razón de 0,1 $\mu\text{g/ml}$ como anticuerpo de detección por incubación en un agitador a temperatura ambiente durante 1-2 horas. El anticuerpo de detección no fijado se elimina por lavado, tres veces, con 200 μl /hoyo de PBST. El anticuerpo de detección fijado se detecta por adición de 100 μl de ABTS/hoyo y posterior incubación. La determinación de la absorbancia se efectúa en un espectrómetro Tecan Fluor con una longitud de onda a medir de 405 nm (longitud de onda de referencia: 492 nm).

Purificación preparativa de anticuerpos

Se purifican los anticuerpos a partir de líquidos sobrenadantes de cultivos celulares filtrados aplicando los protocolos estándar. En resumen, se aplican los anticuerpos a la columna de proteína A-Sepharose (GE Healthcare) y se lavan con PBS. Se efectúa la elución de los anticuerpos a pH 2,8 y posterior neutralización inmediata. Se separa la proteína agregada de los anticuerpos monoméricos por cromatografía de exclusión de tamaños (Superdex 200, GE Healthcare) en PBS o en tampón histidina 20 mM que contiene NaCl 150 mM (pH 6,0). Se reúnen las fracciones de anticuerpo monomérico, se concentran (si fuera necesario) empleando un

concentrador centrífugo p. ej. del tipo MILLIPORE Amicon Ultra (30 MWCO), se congelan y se almacenan a -20°C o a -80°C. Se emplea una parte de las muestras para los posteriores análisis de proteína y para la caracterización analítica, p. ej. por SDS-PAGE, cromatografía de exclusión de tamaños (SEC) o espectrometría de masas.

SDS-PAGE

Se emplea el sistema de gel NuPAGE® Pre-Cast (Invitrogen) con arreglo a las instrucciones del fabricante. En particular se emplea el 10 % o del 4 al 12 % de geles NuPAGE® Novex® Bis-TRIS Pre-Cast (pH 6,4) y un tampón de trabajo NuPAGE® MES (geles reducidos, con aditivo tampón de trabajo antioxidante NuPAGE®) o un tampón de trabajo MOPS (geles no reducidos).

CE-SDS

Se analizan la pureza y la integridad de anticuerpo por CE-SDS empleando la tecnología Labchip de microfluidos (PerkinElmer, EE.UU.). Para ello se preparan 5 µl de solución de anticuerpo para el análisis CE-SDS empleando el kit de reactivos HT Protein Express Reagent con arreglo a las instrucciones del fabricante y se analizan en un sistema de tipo LabChip GXII empleando un chip de tipo HT Protein Express Chip. Los datos se analizan empleando el programa informático LabChip GX.

Cromatografía analítica de exclusión de tamaños

La cromatografía de exclusión de tamaños (SEC) para la determinación de la agregación y estado oligomérico de los anticuerpos se lleva a cabo por cromatografía HPLC. En resumen, los anticuerpos purificados de proteína A se aplican a una columna Tosoh TSKgel G3000SW en NaCl 300 mM, un tampón $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ 50 mM (pH 7,5) en un sistema Dionex Ultimate® (Thermo Fischer Scientific), o a una columna Superdex 200 (GE Healthcare) en 2 x PBS en un sistema Dionex HPLC. Se cuantifica el anticuerpo eluido por absorbancia UV e integración de las áreas de los picos. Como patrón se toma el patrón 151-1901 de BioRad para la filtración de geles.

Espectrometría de masas

En esta sección se describe la caracterización de los anticuerpos biespecíficos con énfasis en su acoplamiento correcto. Se analizan las estructuras primarias esperadas por espectrometría de masas con ionización de electrospray (EM-ESI) del

anticuerpo intacto desglicosilado y en casos especiales del anticuerpo desglicosilado o digerido con LysC limitada.

Los anticuerpos se desglicosilan con N-glicosidasa F en un tampón fosfato o Tris a 37°C durante un máximo de 17 h en una concentración de proteínas de 1 mg/ml. Las digestiones limitadas con LysC (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania) se realizan con 100 µg de anticuerpo desglicosilado en un tampón Tris (pH 8) a temperatura ambiente durante 120 horas, o a 37°C durante 40 min, respectivamente. Antes de la espectrometría de masas se desalinizan las muestras por HPLC en una columna Sephadex G25 (GE Healthcare). El peso total se determina por EM-ESI en un sistema maXis 4G UHR-QTOF MS (Bruker Daltonik) equipado con una fuente TriVersa NanoMate (Advion).

Ensayo de degradación química

Se dividen las muestras en tres partes alícuotas y se tamponan de nuevo con His/His*HCl 20 mM, NaCl 140 mM de pH 6,0 o con PBS, respectivamente y se almacenan a 40 °C (His/NaCl) o 37 °C (PBS). Se almacena una muestra de control a -80 °C.

Una vez finalizada la incubación se analizan las muestras para determinar la concentración activa relativa (BIAcore), la agregación (SEC) y la fragmentación (electroforesis capilar o SDS-PAGE) y se comparan con el control no tratado.

Estabilidad térmica

Se preparan muestras de una concentración de 1 mg/ml en histidina/cloruro de histidina 20 mM, NaCl 140 mM de pH 6,0, se trasvasan a una placa óptica de 384 hoyos por centrifugación a través de una placa de filtro de 0,4 µm y se recubre con aceite de parafina. Se mide el radio hidrodinámico de modo repetido por dispersión dinámica de la luz en un lector de tipo DynaPro Plate Reader (Wyatt) mientras se calientan las muestras a razón de 0,05 °C/min desde 25 °C a 80 °C.

Como alternativa, se trasvasan las muestras a un montaje de microcubeta de 10 µl y con un instrumento Optim1000 (Avacta Inc.) se registran los datos de dispersión estática de luz así como los datos de fluorescencia posterior a la excitación con un láser de 266 nm, mientras se calientan las muestras a razón de 0,1 °C/min desde 25 °C a 90 °C

Se define la temperatura de inicio de la agregación como la temperatura en la que empieza a aumentar el radio hidrodinámico (DLS) o la intensidad de la luz dispersada (Optim1000).

Como alternativa, se transfieren las muestras a un montaje multicubeta de 9 µl. Se calienta el montaje multicubeta de 35 °C a 90 °C con una velocidad constante de 0,1 °C/minuto en un instrumento Optim1000 (Avacta Analytical Inc.). El instrumento registra en continuo la intensidad de la luz dispersada de un láser de 266 nm anotando los datos aproximadamente cada 0,5 °C. Las intensidades de dispersión de la luz se trazan en forma de curva frente a la temperatura. La temperatura de inicio de la agregación (T_agg) se define como la temperatura, en la que empieza a aumentar la intensidad de la luz dispersada.

La temperatura de fusión se define como el punto de inflexión en la gráfica de la intensidad de fluorescencia frente a la longitud de onda.

Ejemplo 1

Expresión y purificación

Se producen los anticuerpos biespecíficos del modo antes descrito en la sección general de materiales y métodos.

Se purifican los anticuerpos biespecíficos del líquido sobrenadante por una combinación de cromatografía de afinidad de la proteína A y cromatografía de exclusión de tamaños. Los productos obtenidos se caracterizan en cuanto a la identidad por espectrometría de masas y las propiedades analíticas, tales como la pureza, por CE-SDS, contenido de monómeros y estabilidad.

Se analizan las estructuras primarias esperadas por espectrometría de masas con ionización de electrospray (EM-ESI) del anticuerpo intacto desglicosilado y desglicosilado / digerido en plasmina o como alternativa del anticuerpo desglicosilado/digerido con LysC limitada del modo descrito en la sección general de métodos.

Los métodos analíticos adicionales (p. ej. estabilidad térmica, espectrometría de masas y evaluación funcional) se aplican únicamente después de la purificación por cromatografía de afinidad de la proteína A y por SEC.

Ejemplo 2

Determinación de la unión con el receptor de transferrina “in vitro”

Se comprueba la unión de los anticuerpos biespecíficos al receptor de transferrina murino por análisis FACS en células de mieloma X63.AG8-563 de ratón. Si el anticuerpo anti-A β presenta una cierta tendencia a la unión no específica con las células Ag8, entonces la unión específica puede cuantificarse por co-incubación con un exceso 20 veces mayor del anticuerpo anti-TfR de ratón. Se recogen las células por centrifugación, se lavan una vez con PBS y se incuban 5×10^4 células con una serie de diluciones de 1,5 pM a 10 nM del polipéptido de fusión con o sin adición de anticuerpo anti-TfR de ratón 200 nM en 100 μ l de RPMI/10 % de FCS durante 1,5 h sobre hielo. Después de 2 lavados con RPMI/10 % de FCS se incuban las células con IgG de cabra anti-humana acoplada a la ficoeritrina (Jackson Immunoresearch) en una dilución de 1:600 en RPMI/19 % de FCS durante 1,5 h sobre hielo. Se lavan de nuevo las células, se suspenden de nuevo en RPMI/10 % de FCS y se mide la fluorescencia de la ficoeritrina en un instrumento de tipo FACS-Array (Becton-Dickinson).

Ejemplo 3

Ensayo de unión basado en la resonancia de plasmón de superficie para la interacción del anticuerpo anti-TfR humano

El ensayo de unión se lleva a cabo en un instrumento BIAcore B 4000 (GE Healthcare) equipado con un chip sensor C1 (GE Healthcare, nº de cat. BR1005-35), tratado previamente con anticuerpo Fab anti-humano (GE Healthcare, nº de cat. 28-9583-25), efectuando un procedimiento estándar de química de condensación de aminas, con arreglo al manual del vendedor.

Para las mediciones cinéticas se inmoviliza el anticuerpo de muestra aplicando un tiempo de contacto de 60 segundos y un caudal de 10 μ l/min en solución salina en tampón fosfato de pH 7,4, 0,05 % de Tween 20 a 25 °C. Se aplica el receptor de transferrina humano marcado con His6 recombinante (R&D Systems, nº de cat. 2474-TR-050) en concentraciones crecientes y se hace el seguimiento de la señal a lo largo del tiempo. Se registra un período medio de 150 segundos para el tiempo de asociación y de 600 segundos para el tiempo de disociación para un caudal de 30 μ l/min. Los datos se ajustan empleando un modelo de unión 1:1 (isoterma de Langmuir).