



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 349 781**

(51) Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

C07K 14/55 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

C12N 15/13 (2006.01)

C12N 15/62 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Número de solicitud europea: **04764037 .0**

(96) Fecha de presentación : **16.08.2004**

(97) Número de publicación de la solicitud: **1654287**

(97) Fecha de publicación de la solicitud: **10.05.2006**

(54) Título: **Composiciones polipeptídicas que se enlazan con el CD20.**

(30) Prioridad: **14.08.2003 EP 03018480**
14.11.2003 US 520171 P

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
11.01.2011

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
11.01.2011

(73) Titular/es: **MERCK PATENT GmbH**
Frankfurter Strasse 250
64293 Darmstadt, DE

(72) Inventor/es: **Williams, Stephen;**
Carr, Francis J. y
Gillies, Stephen, D.

(74) Agente: **Carvajal y Urquijo, Isabel**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

COMPOSICIONES POLIPEPTÍDICAS QUE SE ENLAZAN CON EL CD20.**DESCRIPCIÓN.****CAMPO DE LA INVENCION**

5 La presente invención se refiere a composiciones polipeptídicas que se enlazan con el antígeno CD20. De una manera más específica, la invención se refiere a composiciones polipeptídicas que se enlazan con el antígeno CD20 humano y a procedimientos para el empleo de las composiciones. Tales composiciones polipeptídicas incluyen anticuerpos quiméricos, fragmentos de anticuerpos y
10 proteínas de fusión de un anticuerpo o de un fragmento de anticuerpo con una citocina.

FUNDAMENTO DE LA INVENCION

Existen muchos casos en los que la eficacia de una proteína terapéutica está limitada por una reacción inmune no deseada con respecto a la proteína terapéutica.
15 Diversos anticuerpos monoclonales de ratón se han mostrado prometedores como terapias para controlar un número de enfermedades humanas pero, en ciertos casos, han fallado como consecuencia de la inducción de grados significativos de una respuesta de anticuerpo humano antimurino (HAMA) (Schroff, R. W. et al. (1985) Cancer Res. 45: 879-885; Shawler, D.L. et al. (1985) J. Immunol. 135: 1530-1535).
20 Se ha desarrollado un número de técnicas para los anticuerpos monoclonales en un intento de reducir la respuesta HAMA (WOA8909622; EPA0239400; EPA0438310; WOA9106667; EPA0699755). Los enfoques del ADN recombinante han reducido, en general, la información genética del ratón en el constructo del anticuerpo final mientras que aumentan la información genética humana en el constructo final para
25 dar como resultado moléculas de anticuerpos que se denominan, en general, anticuerpos "humanizados".

Los anticuerpos humanizados son, en su mayor parte, inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que han sido reemplazados residuos de la región hipervariable del receptor por residuos de la región hipervariable, que
30 proceden de especies no humanas (anticuerpo donante) tales como el ratón, la rata, el conejo o los primates, y este proceso se denomina a veces "implante CDR". Por regla general, son reemplazados residuos de la región marco Fv adicional (FR) de la

- 2 -

inmunoglobulina humana por residuos correspondientes no humanos y en algunos casos se llevan a cabo otras substituciones para restaurar ulteriormente la función anticuerpo. Los anticuerpos humanizados típicos son reconstituidos en moléculas de anticuerpos completos, que comprenden dos dominios variables, en los cuales todos, o substancialmente todos, los bucles hipervariables corresponden a los de la inmunoglobulina no humana y todas, o substancialmente todas, las regiones FR son las de la secuencia de la inmunoglobulina humana. Por lo tanto, el anticuerpo humanizado comprenderá, por regla general, como mínimo una porción de una región constante de la inmunoglobulina derivada humana (Fc) (Jones et al. (1986), Nature 321: 522-525; Reichmann et al. (1988), Nature 332: 323-329). No obstante, los anticuerpos humanizados han inducido todavía, en muchos casos, una respuesta inmune en pacientes (Issacs J.D. (1990) Sem. Immunol. 2: 449, 456; Rebello, P.R. et al. (1999) Transplantation 68: 1417-1420).

La clave de la inducción de una respuesta inmune consiste en la presencia dentro de la proteína de péptidos que puedan estimular la actividad de los linfocitos T por medio de la presentación de moléculas del MHC clase II, que se denominan "epitopos de los linfocitos T". Tales epitopos de los linfocitos T se definen, por regla general, como cualquier secuencia de residuos de aminoácidos que tiene la capacidad de enlazarse con las moléculas del MHC clase II. Implícitamente, un "epitopo de los linfocitos T" significa un epitomo, que puede ser reconocido por un receptor de los linfocitos T (TCR) cuando se enlaza con las moléculas del MHC, y que puede provocar, al menos en principio, la activación de estos linfocitos T, haciendo que un TCR promueva una respuesta de los linfocitos T.

Las moléculas del MHC clase II constituyen un grupo de proteínas altamente polimórficas, que juegan un papel central en la selección y en la activación de los linfocitos T auxiliares. El grupo antígeno de los leucocitos humanos DR (HLA-DR) constituye el isotipo predominante de este grupo de proteínas y los isotipos HLA-DQ y HLA-DP ejercen funciones similares. En la población humana, los individuos portan entre dos y cuatro alelos DR, dos alelos DQ y dos alelos DP. Se ha resuelto la estructura de un número de moléculas DR y estas se presentan como una cisura enlazante peptídica de extremo abierto con un número de bolsillos hidrófugos, que emplean residuos hidrófugos (residuos de bolsillo) de los péptidos (Brown et al.

- 3 -

Nature (1993) 364: 33; Stem et al. (1994) Nature 368: 215). El polimorfismo, que identifica los diferentes alotipos de las moléculas de clase II, contribuye a una amplia diversidad de diferentes superficies de enlace para péptidos dentro de la cisura de enlace peptídica y asegura, al nivel de población, la máxima flexibilidad con respecto a la capacidad para reconocer proteínas foráneas y establece una respuesta inmune a los organismos patógenos.

Una respuesta inmune a una proteína terapéutica se lleva a cabo a través de la vía de presentación de péptidos del MHC clase II. En este caso, las proteínas exógenas son absorbidas y procesadas para la presentación en asociación con moléculas del MHC clase II del tipo DR, DQ o DP. Las moléculas del MHC clase II son expresadas por células presentadoras de antígeno profesionales (APCs), tales como los macrófagos y las células dendríticas entre otras. El empleo de un complejo peptídico del MHC clase II por un receptor afín de los linfocitos T sobre la superficie de los linfocitos T, junto con la reticulación de otros co-receptores determinados tales como la molécula CD4, puede inducir un estado activado dentro de los linfocitos T. La activación conduce a la secreción de citocinas que, a continuación, activan a otros linfocitos tales como los linfocitos B, para que produzcan anticuerpos, o que activan a los linfocitos T agresores como una respuesta inmune celular completa.

La identificación de los epitopos de los linfocitos T es la primera etapa para la eliminación de los epitopos. Los epitopos identificados pueden ser eliminados mediante una substitución juiciosa de aminoácidos o por medio de otras estrategias de modificación. Un enfoque de este tipo ha sido reconocido en las publicaciones WO 98/52976 y WO 00/34317, habiendo sido descritas en el último de los casos técnicas informáticas de fileteado como un medio para llevar a cabo la identificación de las secuencias polipéptidas con el potencial para enlazarse con un subgrupo de alotipos DR humanos del MHC clase II y se eliminan los epitopos previstos de los linfocitos T por substitución de aminoácidos dentro de la proteína de interés.

Sería deseable identificar y eliminar, o al menos reducir, los epitopos de los linfocitos T a partir de un determinado péptido, de un determinado polipéptido o de una determinada proteína, que, en principio, son terapéuticamente valiosos, pero que originalmente son inmunógenos. Una de estas moléculas terapéuticamente valiosas es un anticuerpo monoclonal, con especificidad de enlace para el antígeno CD20 de

- 4 -

los linfocitos B humanas. Los anticuerpos monoclonales preferentes de la presente invención son formas modificadas de los anticuerpos 2B8 y Leu16. El anticuerpo 2B8 está descrito en la patente norteamericana U.S. No. 5,736,137, cuya descripción se incorpora aquí como referencia. El anticuerpo Leu16 está descrito en la publicación de los autores Wu et al. Protein Engineering (2001) 14:1025-1033. La publicación WO 02/069232 divulga algunas formas modificadas del anti-CD20 mAb c2B8 quimérico.

La CD20 es una fosfoproteína no glicosilada de 35,000 Daltons, que de forma típica se denomina antígeno de diferenciación restringido de los linfocitos B humanos Bp35B. La proteína es una molécula de superficie altamente específica para la células, que es expresada en los linfocitos pre-B y en los linfocitos B maduros, que incluyen más de un 90 % de linfocitos B de linfomas no hodgkinianos (NHL). Los anticuerpos monoclonales y los radioinmunoconjugados selectivos para el CD20 han emergido como nuevos tratamientos para los NHL. El ejemplo más significativo incluye el anticuerpo parental de la presente invención, concretamente el anticuerpo monoclonal 2B8 (Reff, M.E. et al. (1994) Blood 83: 435-445). Los dominios de región variable del 2B8 han sido clonados y combinados con dominios de región constante humanos para producir un anticuerpo quimérico, que se denomina C2B8 que está comercializado como RITUXANTM en los Estados Unidos de América o que está comercializado como MABTHERA[®] (rituximab) en Europa. El C2B8 está reconocido como un agente terapéutico valioso para el tratamiento de los NHL y de otras enfermedades de los linfocitos B (Maloney, D.G. et al. (1997) J. Clin. Oncol. 15: 3266-3274; Maloney, D.G. et al. (1997) Blood 90: 2188-2195).

Un ejemplo adicional de un fármaco anti-CD20 está dado por el anticuerpo B1, que está descrito en la patente norteamericana US No. 6,090,365. De forma similar, este anticuerpo ha conseguido ser registrado para uso como un fármaco para los NHL aún cuando, en este caso, la molécula (BEXXARTM) es un radioinmunoconjugado ¹³¹I. El anticuerpo B1 natural (no conjugado) tiene utilidad en regímenes de purificación *ex vivo* para terapias de trasplante autólogo de médula ósea para linfoma y para leucemia rebelde a los tratamientos (Freedman, A.S. et al. (1990), J. Clin. Oncol.8: 784). La publicación WO 03/049694 divulga la combinación de un anticuerpo anti CD 20 quimérico libre y de la IL-2 en el

- 5 -

tratamiento del linfoma no hodgkiniano. Independientemente del éxito de los anticuerpos tales como el C2B8 (rituximab) y el BEXXAR™ sigue existiendo una necesidad de análogos de anti-CD20 con propiedades reforzadas. Existe una necesidad particular para reforzar las características *in vivo* cuando son

5 administrados a un sujeto humano. A este respecto, es altamente deseable proporcionar moléculas de anticuerpos anti-CD20 con potencial reducido, o inexistente, para inducir una respuesta inmune en el sujeto humano. Tales proteínas presentarían un tiempo de circulación acrecentado en el sujeto humano y serían particularmente beneficiosas en los cuadros de uso crónico tal como ocurre en el caso

10 del uso terapéutico de las moléculas anti-CD20. La presente invención proporciona moléculas modificadas de anticuerpos anti-CD20 que presentan propiedades reforzadas *in vivo*.

SUMARIO DE LA INVENCION

La presente invención proporciona composiciones polipeptídicas que se

15 enlazan con el antígeno CD20, de manera preferente con el antígeno CD20 humano tal como se ha definido por medio de las reivindicaciones. Las composiciones CD20 comprenden uno o varios segmentos polipéptidos de la región variable de cadena pesada y/o de la cadena ligera anti-CD20, cuyos segmentos pueden ser polipéptidos seleccionados entre el grupo que comprende una forma modificada de la región

20 variable de cadena pesada (Vh) del anticuerpo 2B8 anti-CD20, una forma modificada de la región variable de cadena ligera (Vk) del anticuerpo 2B8 anti-CD20, una forma modificada de la región variable de cadena pesada (Vh) del anticuerpo Leu16 anti-CD20 y una forma modificada de la región variable de cadena ligera (Vk) del anticuerpo Leu16 anti-CD20. Los polipéptidos modificados Vh y Vk se diferencian

25 de las regiones naturales Vh o Vk del 2B8 y del Leu16 por una o más substituciones de residuos de aminoácido en la secuencia natural de la región Vh y/o Vk del anticuerpo. La o las substituciones de los residuos de aminoácido en los polipéptidos Vh o Vk proporciona un nivel más bajo de inmunogenia a la composición que se enlaza con el CD-20 de la invención con relación a la inmunogenia de las regiones

30 Vh o Vk de los anticuerpos naturales 2B8 y Leu16. De manera especial, la presente invención proporciona, respectivamente, composiciones polipeptídicas, que comprenden proteínas de fusión anti-CD20 mAb-JLZ.

- 6 -

La composición polipeptídica que se enlaza con el CD20 de la invención comprende, como mínimo, un segmento polipeptídico elegido entre el grupo constituido por un polipéptido que tiene la secuencia de residuos de aminoácidos de la SEQ ID NO: 9 (Vh del anticuerpo Leu16), pero que incluye, como mínimo, una

5 substitución de residuos de aminoácidos en la SEQ ID NO: 9 elegida entre el grupo constituido por V₁₂K, M₂₀V, A₆₈T, Q₈₂E, T₈₇R, S₉₁T, D₉₃V, y A₁₁₄T; y un polipéptido que tiene la secuencia de residuos de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11 (Vk del anticuerpo Leu16), pero que incluye, como mínimo, una substitución de residuos de aminoácidos en la SEQ ID NO: 11 elegida entre el grupo constituido por L₁₁I, S₁₂T,

10 A₅₉S, S₆₉T, L₇₂M, R₇₆S, y V₇₇L.

Tal como se usa aquí y en las reivindicaciones adjuntas, la substitución de los residuos de aminoácidos está designada por medio del listado del código de una sola letra para el residuo natural de aminoácidos en la secuencia, seguido por el número de la posición de dicho residuo (subrayado), seguido por el código de una sola letra

15 para el residuo de aminoácido, que reemplaza al aminoácido natural.

De manera preferente, las composiciones polipeptídicas que se enlazan con el CD20 de la invención tienen una afinidad de enlace para el antígeno CD20 humano, que es aproximadamente igual o más fuerte que la afinidad de enlace para el CD20 humano de los anticuerpos monoclonales 2B8 o Leu16.

20 Realizaciones preferentes de la presente invención comprenden segmentos polipeptídicos, tal como una cadena pesada de la región V del anticuerpo monoclonal, que se denomina en este caso VhY, que comprende la secuencia de residuos de aminoácidos de la SEQ ID NO: 10:

**EVQLQQSGAELKKPGASVKVSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGQGLEWIGAIYPG
NGDTSYNQKFKGKTTLTADKSSSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARSNYYGSSYWFF
DVWGTGTTVTVSS.**

25 Otras realizaciones preferentes de la presente invención comprenden segmentos polipeptídicos, tal como una cadena ligera de la región V del anticuerpo monoclonal, que se denomina en este caso VkZ, que comprende la secuencia de residuos de aminoácidos de la SEQ ID NO: 12:

**DIVLTQSPAIITASPGEKVTMTCRASSSVNYMDWYQKKPGSSPKPWIYATSNLASG
VPSRFSGSGSGTTSMTISSLEAEDAATYYCQQWSFNPPTFGGGTKLEIK.**

- 7 -

Se proporcionan composiciones polipeptídicas, que tienen potencial terapéutico para el tratamiento de las enfermedades de los linfocitos B positivas al CD20 en los seres humanos. Las composiciones polipeptídicas que se enlazan con el CD20 de la invención pueden presentarse en forma de anticuerpos intactos, de
5 fragmentos Fab, o de proteínas de fusión que comprendan anticuerpos completos y citocinas, de proteínas de fusión de fragmentos de anticuerpos y de citocinas, o en cualquier otra forma que se enlace con el antígeno CD20.

Las composiciones polipeptídicas que se enlazan con el CD20 incluyen, de manera preferente, una combinación de una región variable de cadena pesada (Vh)
10 de anticuerpo anti-CD20 y una región variable de cadena ligera (Vk) de anticuerpo anti-CD20 que, en conjunto, se enlazan con el antígeno CD20. Las combinaciones Vh/Vk pueden estar configuradas como anticuerpos intactos, como fragmentos Fab, o como proteínas de fusión, que comprendan anticuerpos completos y citocinas, como proteínas de fusión de fragmentos de anticuerpos y de citocinas, o como
15 cualquier otra configuración que se enlace con el antígeno CD20. En otras realizaciones preferentes, las regiones V están enlazadas entre sí a través de una cadena principal polipeptídica.

De manera preferente, las composiciones polipeptídicas que se enlazan con el CD20 incluyen polipéptidos Vh y Vk, que están configurados como un anticuerpo
20 intacto, que incluye una región constante de cadena ligera, y dominios CH1, CH2 y CH3 de cadena pesada. De manera alternativa, los polipéptidos Vh y/o Vk pueden estar configurados en un fragmento Fab o en un "minicuerpo", que tenga un dominio CH3 pero que carezca de un dominio CH2 (véase, por ejemplo, la publicación de los autores Wu et al., US 5,837,821). De manera alternativa, los polipéptidos Vh y Vk
25 pueden estar enlazados entre sí a través de un segmento enlazador, para formar una molécula de anticuerpo "Fv monocatenaria". Las regiones constantes humanas están combinadas con los polipéptidos Vh y Vk que se enlazan con el CD-20. Tales regiones constantes incluyen aquellas que se derivan de las inmunoglobulinas de tipo IgA, IgD, IgM, IgE, o de tipo IgG1, IgG2, IgG3, o de tipo IgG4. Cuando está
30 incluido un dominio CH2 en la composición polipeptídica que se enlaza con el CD20, es preferible incluir un dominio de la IgG humana, tal como un dominio IgG1 CH2. Otros polipéptidos carecen del locus de glicosilación oligosacárido enlazado

- 8 -

con N, que se encuentra en el dominio IgG CH2. La ausencia del locus de glicosilación enlazado con N se lleva a cabo, de manera preferente, en ingeniería genética por medio de la mutación de la asparagina, de la serina o de la treonina relevante, o de los aminoácidos adyacentes, o por medio del tratamiento de la

5 proteína que contiene el CH2 con un enzima tal como la PNGasa F, con objeto de eliminar los oligosacáridos.

Las combinaciones preferentes de las regiones Vh y Vk incluyen una composición polipeptídica, que comprende la región V de cadena pesada VhY (SEQ ID NO: 10) y una región V de cadena ligera VkZ (SEQ ID NO: 12).

10 Una composición polipeptídica que se enlaza con el CD20, preferente de la invención, incluye una cadena pesada de la región V (Vh) del anticuerpo Leu16 (SEQ ID NO: 9) modificada de forma que contenga una o varias substituciones en la SEQ ID NO: 9 elegidas entre el grupo constituido por V₁₂K, M₂₀V, A₆₈T, Q₈₂E, T₈₇R, S₉₁T, D₉₃V, y A₁₁₄T.

15 De la misma forma, otra composición polipeptídica preferente de la invención incluye una cadena ligera de la región V (Vk) del anticuerpo Leu16 (SEQ ID NO: 11) modificada de forma que contenga una o varias substituciones de residuos de aminoácidos en la SEQ ID NO: 11 elegidas entre grupo constituido por L₁₁I, S₁₂T, A₅₉S, S₆₉T, L₇₂M, R₇₆S, y V₇₇L. La figura 16 ilustra la localización de las

20 substituciones preferentes de los residuos de aminoácidos, que están impresas en negrita.

De la misma forma, las composiciones polipeptídicas que se enlazan con el CD20 de la invención incluyen composiciones que tienen una o varias regiones V de cadena pesada del anticuerpo anti-CD20, que comprenden un segmento polipeptídico

25 elegido entre el grupo constituido por

SGAELKKPGAS (SEQ ID NO: 15),

VSCKASGYT (SEQ ID NO: 16),

YNQKFKGKT (SEQ ID NO: 18),

FKGKTTLTA (SEQ ID NO: 19),

30 YMELSSLRS (SEQ ID NO: 20),

SSLRSED TAV (SEQ ID NO: 21), y

DWGTGTTVT (SEQ ID NO: 22).

- 9 -

De manera similar, las composiciones polipeptídicas que se enlazan con el CD20 de la invención incluyen, así mismo, composiciones que tienen una o varias regiones V de cadena ligera del anticuerpo anti-CD20, que comprenden un segmento polipeptídico elegido entre grupo constituido por

- 5 IITASPGEKV (SEQ ID NO: 23),
LASGVPSRF (SEQ ID NO: 26),
FSGSGSGTT (SEQ ID NO: 27), y
YSMTISSLE (SEQ ID NO: 28).

Las cadenas pesadas y las cadenas ligeras de la región V pueden estar
10 configuradas, por ejemplo, en forma de anticuerpos intactos, de fragmentos de anticuerpos, de proteínas de fusión de un anticuerpo con una citocina, de proteínas de fusión de fragmento de anticuerpo-citocina, de moléculas Fab, de moléculas Fv monocatenarias y de minicuerpos. De manera preferente, las composiciones que se enlazan con el CD20 están configuradas como anticuerpos intactos, de manera más
15 preferente como anticuerpos que contienen regiones constantes humanas con un isotipo de la región constante de la cadena pesada IgG, de una manera más preferente que incluyen una región constante de cadena pesada IgG1 y que tienen funciones efectoras intactas, tal como la citotoxicidad con intervención celular, dependiente del anticuerpo.

20 La composición que se enlaza con el CD20 puede estar configurada como una proteína de fusión de anticuerpo-citocina, que incluye, de manera preferente, regiones constantes humanas con el isotipo IgG1 y que tiene funciones efectoras intactas, tal como la citotoxicidad con intervención celular, dependiente del anticuerpo. En dichas proteínas de fusión anticuerpo-citocina, es conveniente incluir
25 una interleucina tal como la interleucina-2 (IL-2), IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-10, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, IL-16 y IL-18, un factor hematopoyético, tal como un factor estimulador de las colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF), un factor estimulador de las colonias de granulocitos (G-CSF), la eritropoyetina, un factor de la necrosis tumoral (TNF) tal como el TNFalfa, una linfocina tal como la linfotoxina,
30 un regulador de los procesos metabólicos tal como la leptina, un interferón tal como interferón alfa, el interferón beta y el interferón gama, o una quemocina. La proteína de fusión de anticuerpo-citocina de la presente invención presenta actividad

- 10 -

biológica de citocina (por ejemplo, la estimulación de las células inmunitarias, tales como los linfocitos T o los linfocitos B), de JL-2. Las composiciones polipeptídicas de la presente invención tienen una pluralidad de propiedades biológicas convenientes, que incluyen la capacidad de enlazarse con los linfocitos B humanos; la capacidad de enlazarse con el antígeno CD20; una capacidad reducida de respuesta inmunitaria con relación a los anticuerpos Leu16, 2B8, o 1H4; y una actividad frente a los desórdenes de proliferación de los linfocitos B tales como las leucemias, los linfomas, la artritis reumatoide y otras enfermedades autoinmunitarias. De la misma forma, se contemplan usos para diagnóstico de las composiciones polipeptídicas que se enlazan con el CD20 de la presente invención, en cuya composición puede ser un anticuerpo de longitud completa, un fragmento de anticuerpo (por ejemplo F(ab')₂), un anticuerpo radiomarcado, un anticuerpo inmovilizado, o un anticuerpo conjugado con un compuesto heterólogo. Dicho procedimiento de diagnóstico puede ser empleado para detectar la presencia de células que presenten el CD20, para purificar o para separar células que presenten el CD20, etc.

La invención proporciona, de la misma manera, composiciones farmacéuticas que comprenden una composición que se enlaza con el CD20, como se ha definido más arriba, junto con un soporte, un diluyente o un excipiente farmacéuticamente aceptable, así como un procedimiento para llevar a cabo la producción de las composiciones polipeptídicas.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La FIGURA 1 muestra la secuencia natural de residuos de aminoácidos, en código de una sola letra, de la proteína de cadena pesada de la región V del anticuerpo 2B8 y las secuencias modificadas de residuos de aminoácidos VhC y VhD, basadas en la secuencia natural.

La FIGURA 2 muestra la secuencia natural de residuos de aminoácidos, en código de una sola letra, de la proteína de cadena ligera de la región V del anticuerpo 2B8 y las secuencias modificadas VkA, VkB, VhC y VhD, basadas en la secuencia natural.

La FIGURA 3 muestra la secuencia de residuos de aminoácidos, en código de una sola letra, de las regiones variables de cadena pesada de Leu16Vh y una región modificada Leu16Vh denominada VhY;

- 11 -

La FIGURA 4 muestra la secuencia de residuos de aminoácidos, en código de una sola letra, de las regiones variables de cadena ligera de Leu16Vk y una Leu16Vk modificada, que se denomina VhZ.

5 La FIGURA 5 es una representación gráfica de un ensayo de lisis de citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo (ADCC), que está descrito en el ejemplo 3; las proteínas ensayadas eran el anticuerpo Leu16 quimérico (chLeu16; triángulos rellenos), una proteína de fusión de chLeu16 y de IL2 (chLeu16-IL2; cuadrados rellenos), una proteína de fusión LeuVhY/VkZ-IL2 (cuadrados rellenos), un anticuerpo 2B8 quimérico (C2B8, círculos rellenos),
10 una proteína de fusión C2B8-IL2 (cuadrados vacíos), y una proteína de fusión KS-IL2 inmunocitocina, que no actúa sobre el CD20 (círculos vacíos). Eje X: concentración (ng/ml); eje Y: % de lisis.

La FIGURA 6 ilustra la actividad que se enlaza con el anti-CD20 de las composiciones polipeptídicas que se enlazan con el CD20 y de las
15 inmunocitocinas (ICs). Se incubaron linfocitos de linfoma de Daudi humano con concentraciones variables de las composiciones polipeptídicas y de ICs y se evaluó el enlace relativo con las células por medio de una citometría de flujo, tal como se ha descrito en el ejemplo 2.

La FIGURA 6A muestra la intensidad de la fluorescencia media (MFI, eje
20 Y), que aumenta como una función de la concentración polipeptídica (eje X). La FIGURA 6B muestra la intensidad de la fluorescencia medida en una muestra de célula de Daudi que presenta anticuerpo no primario (pico situado en la posición más a la izquierda); una fusión anticuerpo-IL2 dirigida contra el receptor EGF, que no es expresado en las células de Daudi (pico central a la izquierda); y Leu16VhY/VkZ-IL2 (pico situado en la posición más a la
25 derecha). Eje X: intensidad de la fluorescencia en 10 ug/ml; eje Y: número de acontecimientos.

La FIGURA 7 ilustra la citotoxicidad con intervención celular y dependiente del complemento, que depende del anticuerpo. Las figuras 7A y 7B
30 representan, de manera independiente, ensayos de ADCC comparados con la figura 5. La ADCC se determinó en un ensayo de 4 horas empleándose células diana de Daudi marcadas con ⁵¹Cr y PBMC humanos como efectores

- 12 -

(E:T = 100). FIGURA 7A: los anticuerpos marcados fueron 2B8 (círculos rellenos), chLeu16 (rombos rellenos), y Leu16VhY, VkZ (triángulos vacíos). FIGURA 7B: las inmunocitocinas ensayadas fueron chLeu16-IL2 (cuadrados rellenos), y Leu16VhY/VkZ-IL2 (triángulos rellenos), Leu16VhY/VkZ-IL2 desglucosilada (aspas), y huKS-IL2 (círculos vacíos) a modo de control no enlazante. Eje Y: % de lisis, eje X: concentración (ng/ml).

La FIGURA 7C muestra la actividad CDC empleándose células de Daudi marcadas con ^{51}Cr y plasma humano como una fuente de complemento, tal como se ha descrito en el ejemplo 4. La incubación se llevó a cabo durante 1 hora, empleándose los mismos anticuerpos y las mismas inmunocitocinas. Los anticuerpos ensayados fueron 2B8 (círculos rellenos), chLeu16 (rombos rellenos), chLeu16-IL2 (cuadrados rellenos), y Leu16VhY/VkZ-IL2 (triángulos rellenos), y huKS-IL2 (círculos vacíos) a modo de control no enlazante.

La FIGURA 8 ilustra las farmacocinéticas de las inmunocitocinas Leu16 empobrecidas en epítipo en ratones, tal como se ha descrito en el ejemplo 5. Se llevó a cabo un análisis de tiempo-concentración después de una dosis intravenosa (i.v.) de cada inmunocitocina. Se determinaron las concentraciones en suero por medio de un ensayo ELISA, que detecta las formas intactas de las proteínas naturales (cuadrados rellenos) y de las proteínas desglucosiladas (círculos vacíos). Se inyectaron ratones con 25 mg de la inmunocitocina indicada y se tomaron muestras por sangría retroorbital y se ensayaron por medio de la captura con antisueros IgG antihumana H&L y por medio de la detección con un anticuerpo contra la IL2 antihumana. Los resultados se normalizaron con respecto a la concentración inicial en el suero de cada ratón, tomado inmediatamente después de la inyección. Eje X: horas, eje Y: ID remanente en %.

La FIGURA 9 muestra las evaluaciones modelo antitumorales en ratones SCID. Se inyectaron ratones SCID i.v. con 2×10^6 CD20+ linfocitos de linfoma de Daudi seguido por 5 inyecciones diarias consecutivas de inmunocitocinas comenzándose día 3 (figura 9A) o el día 7 (figura 9B). La inmunocitocina de control 425-IL2, no actuante, específica para EGFR, se

- 13 -

empleó a dosis elevada para ilustrar la actividad incompleta debida a la semivida alterada de la IL-2. Los tratamientos en la figura 9A se administraron los días 3, 4, 6, 6 y 7 y

solamente incluyeron PBS (rombos rellenos); 425-IL2 (aspas cruzadas, obscuras); y Leu16VhY/VkZ-IL2 a dosis diarias de 5 microgramos (mcg) (aspas claras), 10 mcg (triángulos rellenos), y 20 mcg (cuadrados rellenos).

En la figura 9A, las tres últimas dosis mostraron, en conjunto, una protección completa de los ratones, y los puntos de datos están superpuestos. Los tratamientos en la figura 9B fueron administrados los días 7, 8, 9, 10 y 11, y solamente incluyeron PBS únicamente (rombos rellenos); y Leu16VhY/VkZ-IL2 a dosis diarias de 5 mcg (aspas claras); y 20 mcg (cuadrados rellenos). Eje X: días; eje Y: supervivencia en %.

La FIGURA 10 muestra los resultados de las evaluaciones modelo antitumorales (2B8 frente a chLeu16-IL2) en ratones SCID; se inyectaron ratones SCID con linfocitos de linfoma de Daudi y se trataron con el anticuerpo indicado o con la inmunocitocina comenzándose 7 días más tarde, tal como se ha descrito para la figura 9. Los tratamientos incluyen PBS únicamente (aspas cruzadas, los días 7-11); rituximab (C2B8; círculos rellenos, 25 mg/kg los días 7, 9 y 11); dosis elevada de Leu16VhY/VkZ-IL2 (cuadrados grandes, 1 mg/kg los días 7-11); dosis baja de Leu16VhY/VkZ-IL2 (cuadrados pequeños, 0,25 mg/kg los días 7-11). (A): ratones sanos, (B) supervivencia de los ratones; eje X: días; eje Y: ratones sanos en % (A), supervivencia de los ratones en % (B).

La FIGURA 11 muestra los resultados de las evaluaciones modelo antitumorales (chLeu16-IL2 frente a (DI)-Leu16-IL2 desinmunizada) en ratones SCID; se inyectaron ratones SCID con linfocitos de linfoma de Daudi y se trataron con el anticuerpo indicado o con la inmunocitocina comenzándose 7 días más tarde, tal como se ha descrito para la figura 9. Los tratamientos incluyen PBS únicamente (aspas cruzadas, los días 7-11); rituximab (círculos rellenos, 25 mg/kg los días 7, 9 y 11); dosis elevada de Leu16VhY/VkZ-IL2 (cuadrados grandes, 1 mg/kg los días 7-11); dosis baja de Leu16VhY/VkZ-IL2 (cuadrados pequeños, 0,25 mg/kg los días 7-11);

- 14 -

dosis elevada de chLeu16-IL2 (triángulos grandes, 1 mg/kg los días 7-11); y dosis baja de chLeu16-IL2 (triángulos pequeños, 0,25 mg/kg los días 7-11). (A) ratones sanos, (B) supervivencia de los ratones. Eje X: días; eje Y: ratones sanos en % (A), supervivencia de los ratones en % (B).

5 La FIGURA 12 ilustra que la pérdida de la actividad ADCC sólo tiene un efecto parcial sobre la actividad antitumoral con intervención de la Leu16VhY/VKZ-IL2 (DI-Leu16-IL2 frente a DI-Leu16-IL2 desglicosilada). Se utilizaron dos dosis diferentes de Leu16VhY/VkZ-IL2 natural y
10 días después de la inyección de linfocitos de linfoma de Daudi, tal como se ha descrito para la figura 9. Los tratamientos incluyen PBS únicamente (aspas, los días 7-11); rituximab (círculos rellenos, 25 mg/kg los días 7, 9 y 11); dosis elevada de Leu16VhY/VkZ-IL2 (triángulos grandes, 1 mg/kg los días 7-11); dosis baja de Leu16VhY/VkZ-IL2 (triángulos pequeños, 0,25 mg/kg
15 los días 7-11); dosis elevada de Leu16VhY/VkZ-IL2 desglicosilada (aspas grandes con líneas gruesas, 1 mg/kg los días 7-11); y dosis baja de Leu16VhY/VkZ-IL2 desglicosilada (aspas pequeñas con líneas delgadas, 0,25 mg/kg los días 7-11). (A) ratones sanos, (B) supervivencia de los ratones. Eje X: días; eje Y: de ratones sanos en % (A), supervivencia de los
20 ratones en % (B).

La FIGURA 13 ilustra que la especificidad antigénica es importante para la actividad antitumoral óptima. Se ensayo el papel de las células tumorales diana por comparación de la actividad de la DI-Leu16-IL2 y de otra inmunocitocina con especificidad enlazante para el EGFR, una molécula que
25 únicamente es expresada a bajos niveles de linfocitos de linfoma de Daudi. El tratamiento incluye PBS únicamente (aspas, los días 7-11); rituximab (rombos rellenos, 25 mg/kg los días 7, 9 y 11); anticuerpo DI-leu16 (rombos vacíos, 25 mg/kg los días 7, 9 y 11); dosis media de DI-Leu16-IL2 (cuadrados rellenos, 1 mg/kg los días 7-11); dosis reducida de DI-Leu16-IL2 (círculos vacíos, 1 mg/kg los días 7 y 10); dosis baja de DI-Leu16-IL2 (cuadrados vacíos, 0,25 mg/kg los días 7-11); y dosis media de anti-EGFR-IL2 (triángulos rellenos, 1 mg/kg los días 7-11). Los resultados fueron
30

- 15 -

puntuados como supervivencia en ausencia de enfermedad. Eje X: días, eje Y: ausencia de enfermedad en %.

La FIGURA 14 ilustra que la Leu16VhY/VkZ-IL2 es más potente que las dosis elevadas de anticuerpo anti-CD20 combinado con la IL-2 libre. Se compararon las actividades antitumorales de la dosis media de la Leu16VhY/VkZ-IL2 (cuadrados rellenos, 20 mg/ratón los días 7-11) y las dosis correspondientes de los componentes constituidos por el anticuerpo individual y por la IL-2 (cuadrados vacíos, 16,7 mg de Leu16VhY, VKZ y 3,3 mg de IL-2 por i.v. los días 7-11) con la dosis elevada de rituximab y con IL-2 subcutánea (s.c.) IL-2 (rombos vacíos, 500 mg de rituximab el día 7 y 10 mg de IL-2 los días 7, 9 y 11), rituximab únicamente (rombos rellenos, 500 mg el día 7) o PBS de control. Eje X: días; eje Y: ausencia de enfermedad en %.

La FIGURA 15 ilustra que la presencia de linfocitos normales B anti-CD20+ no disminuye la actividad antitumoral de la Leu16VhY/VkZ-IL2. Se ensayó el efecto del implante previo de linfocitos humanos normales B CD20+ en el mismo modelo de SCID/linfoma de Daudi que ha sido descrito en los procedimientos. Se trataron grupos de ratones con una sola dosis elevada de rituximab (rombos, 25 mg/kg el día 7), Leu16VhY/VkZ-IL2 (cuadrados, 1 mg/kg los días 11-15), con la combinación de ambos regímenes de dosificación (triángulos, rituximab el día 7 seguido por Leu16VhY/VkZ-IL2 los días 11-15) o PBS únicamente todos los días de la dosificación. La mitad de los grupos fue inyectada i.v. con $4,5 \times 10^6$ de PBMC el día 5 (símbolos vacíos) o recibieron únicamente PBS (símbolos rellenos). Se confirmó el injerto de los linfocitos B con ayuda de la medida de los niveles de anticuerpo humano en el suero de todos los ratones. Eje X: días; eje Y: ausencia de enfermedad en %.

La FIGURA 16 muestra una alineación de las regiones V de cadena pesada y de cadena ligera de los anticuerpos 2B8, Leu16, y 1H4, anti-CD20, así como los derivados de las regiones V empobrecidos en epitopos de 2B8 (VhC, VhD, VkA, VkB, VcC, y VcD), y las regiones V de Leu16 empobrecidas en epitopos VhY y VkZ.

- 16 -

La FIGURA 17 muestra un resumen de todos los números de identidad de la secuencias (SEQ ID Números.: 1 - 43) como se utilizan en esta solicitud.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LAS REALIZACIONES PREFERENTES

Tal como se utiliza aquí y en las reivindicaciones adjuntas, el término "composición polipeptídica" y las variaciones gramaticales del mismo se refieren a polipéptidos monocatenarios, así como a polipéptidos multicatenarios, en los cuales las cadenas polipeptídicas están químicamente enlazadas entre sí, tal como por medio de uno o varios enlaces de disulfuro entre un residuo de cisteína en una cadena y un residuo de cisteína en otra cadena, por un enlace tipo éster, por un enlace tipo amida o por cualquier otro tipo de ligamiento adecuado.

Una composición polipeptídica que se enlaza con el CD20 comprende, como mínimo, un segmento polipeptídico elegido entre el grupo constituido por una Vh modificada, que tiene la secuencia de residuos de aminoácidos de la SEQ ID NO: 9, pero que incluye, como mínimo, una substitución de residuos de aminoácidos en la SEQ ID NO: 9 elegida entre el grupo constituido por V₁₂K, M₂₀V, A₆₈T, Q₈₂E, T₈₇R, S₉₁T, D₉₃V, y A₁₁₄T; y una Vk modificada, que tiene la secuencia de residuos de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11, pero que incluye, como mínimo, una substitución de residuos de aminoácidos en la SEQ ID NO: 11 elegida entre el grupo constituido por L₁₁I, S₁₂T, A₅₉S, S₆₉T, L₇₂M, R₇₆S, y V₇₇L.

De manera preferente, la composición polipeptídica que se enlaza con el CD20 incluye, como mínimo, un segmento polipeptídico, que tiene una secuencia de residuos de aminoácidos elegida entre el grupo constituido por SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27 y SEQ ID NO: 28.

En una realización preferente, la composición polipeptídica que se enlaza con el CD20 comprende un polipéptido de la región variable de cadena pesada modificado y un polipéptido de la región variable de cadena ligera modificado. De una manera más preferente, la composición polipeptídica que se enlaza con el CD20 se encuentra en la forma de un anticuerpo quimérico e incluye, así mismo, una región constante de cadena pesada humana y una región constante de cadena ligera humana. De manera preferente, la región constante de cadena pesada humana es una región

- 17 -

constante IgG, de una manera más preferente es una región constante IgG1. La región constante de cadena ligera humana es, de manera preferente, una región constante de cadena ligera kappa humana. Otra realización preferente de la composición polipeptídica que se enlaza con el CD20 de la invención es una proteína de fusión, que comprende una composición polipeptídica que incluye un segmento de región variable de cadena pesada o de la cadena ligera modificado, tal como se ha descrito más arriba, fusionado con una citocina. De manera preferente la citocina es la IL2.

Otra realización preferente de la composición polipeptídica que se enlaza con el CD20 de la invención es una molécula de anticuerpo, tal como un fragmento de anticuerpo Fab, un fragmento de anticuerpo Fv monocatenario, o un minicuerpo, que incluye, como mínimo, un segmento Vh modificado o un segmento Vk modificado, tal como se ha descrito más arriba.

Una composición polipeptídica que se enlaza con el CD20, particularmente preferente, comprende, como mínimo, un segmento polipeptídico Vh, que tiene una secuencia de residuos de aminoácidos de la SEQ ID NO: 10.

Otra composición polipeptídica que se enlaza con el CD20, particularmente preferente, comprende, como mínimo, un segmento polipeptídico Vk, que tiene una secuencia de residuos de aminoácidos de la SEQ ID NO: 12.

De una manera más preferente, la composición polipeptídica que se enlaza con el CD20 comprende un segmento polipeptídico, que tiene una secuencia de residuos de aminoácidos de la SEQ ID NO: 10; y un segmento polipeptídico VK, que tiene una secuencia de residuos de aminoácidos de la SEQ ID NO: 12.

Otras composiciones polipeptídicas que se enlazan con el CD20, preferentes de la presente invención, comprenden combinaciones de segmentos de Vh modificados y de Vk modificados elegidos entre el grupo constituido por (g) un segmento Vh, que tiene una secuencia de residuos de aminoácidos de la SEQ ID NO: 10 y un segmento Vk, que tiene una secuencia de residuos de aminoácidos de la SEQ ID NO: 12.

Otro aspecto de la presente invención consiste en una composición farmacéutica, que comprende una composición polipeptídica que se enlaza con el CD20 de la invención, junto con un vehículo, con un excipiente, con un diluyente

- 18 -

farmacéuticamente aceptables. De la misma manera, la composición farmacéutica puede incluir así mismo un fármaco adicional, farmacológicamente efectivo.

Las secuencias descritas han sido derivadas a partir del análisis de las secuencias de la región V de los anticuerpos monoclonales de ratón 2B8 y Leu16 que se denominan aquí anticuerpos "parentales" y que están completamente descritos, con relación a sus valiosas propiedades *in vitro* e *in vivo*, en la patente norteamericana US No. 5,736,137; en la patente norteamericana US No. 5,776,456; en la patente norteamericana US No. 6,399,061; en la patente norteamericana US No. 6,455,043 y en las equivalentes extranjeras, y en la publicación de los autores Wu et al. (Protein Engineering (2001) 14:1025-1033).

El análisis de las secuencias, realizado de este modo, estuvo dirigido a través de la identificación de los péptidos contenidos en la secuencia capaces de actuar como ligandos MCH clase II y que, por lo tanto, funcionan como un epitopos de los linfocitos T en los seres humanos. Un objeto de la presente invención consiste en proporcionar una versión mejorada del anticuerpo parental. De este modo, el conocimiento de las posiciones de los epitopos potenciales del MHC clase II es una primera etapa importante del proceso de ingeniería genética. La identificación de los epitopos se llevó a cabo por vía informática, siguiéndose el esquema descrito en detalle en la publicación WO 02/069232 y que se incorpora aquí completamente a modo de referencia. Después de esta primera etapa, los inventores han descubierto, de manera sorprendente, juegos de substituciones de aminoácidos que satisfacen de forma colectiva muchos criterios diferentes con respecto a la realización de modificaciones deseadas con respecto a los anticuerpos parentales.

Los juegos de substitución en las regiones V del anticuerpo parental dan como resultado una secuencia polipeptídica con un número reducido de ligandos del MHC clase II y, por lo tanto, con una menor tendencia a que los polipéptidos actúen como epitopos de los linfocitos T. De manera equivalente, dichos juegos de substituciones dan como resultado secuencias polipeptídicas con mantenimiento de las propiedades estructurales y funcionales del anticuerpo parental y esto es válido con respecto a las propiedades duales especialmente deseadas de la expresión conservada y estable en una célula huésped, y de importancia particular, un conservación de la capacidad del polipéptido para enlazarse con el antígeno CD20

- 19 -

humano y, de manera especial, para enlazarse *in vitro* con los linfocitos B humanas.

Debe señalarse que las secuencias de residuos de aminoácidos Vh y Vk de 2B8 y de Leu16, así como el anticuerpo B 1 anti-CD20, son completamente equivalentes, aún cuando sean de origen independiente. Sin pretender un

5 compromiso teórico, una observación de la invención es la siguiente. La secuencia CEPANPSEKNSPSTQYC (SEQ ID NO: 29) en el CD20 humano, que es parte del péptido extracelular corto del CD20 y que está flanqueada por cisteínas, que probablemente forman un enlace de disulfuro, corresponde a la secuencia CEPSNSSEKNSPSTQYC (SEQ ID NO: 38) en el CD20 de ratón. La secuencia NSS

10 de ratón es probablemente un locus de glicosilación enlazado con N, mientras que la correspondiente secuencia NPS en los seres humanos no es probablemente un locus de glicosilación enlazado con N. Esta diferencia entre las secuencias del CD20 de ratón y humana revelaría, desde el punto ventajoso del sistema inmune del ratón, un epitopo en la secuencia humana. De este modo, todos los anticuerpos de ratón

15 generados contra el CD20 humano pueden ser seleccionados para reconocer un epitopo definido de una manera muy restringida y éstos pueden ser un juego óptimo de regiones V de ratón para llevar esto a cabo.

De este modo, la invención proporciona un juego de secuencias de regiones V de consenso con inmunogenia reducida, que son importantes para el reconocimiento

20 del CD20 humano. Por ejemplo, en la cadena pesada, el segmento de secuencia VSCKASGYT (SEQ ID NO: 16) en las cadenas pesadas modificadas de la invención, es adecuado en el contexto de un anticuerpo que se enlaza con el CD20; de manera específica, este segmento es menos inmunógeno que el segmento correspondiente, MSCKASGYT (SEQ ID NO: 30), procedente de los anticuerpos

25 2B8 y Leu16. De manera similar, las secuencias YNQKFKGKT (SEQ ID NO: 18), FKGKTTLTA (SEQ ID NO: 19), y YMELSSLRS (SEQ ID NO: 20) son adecuadas en el contexto de los anticuerpos frente al CD20 y son menos inmunógenas que las secuencias correspondientes, YNQKFKGKA (SEQ ID NO: 31), FKGKATLTA (SEQ ID NO: 32), y YMQLSSLRS (SEQ ID NO: 33), que se encuentran en los

30 anticuerpos 2B8 y Leu16 parentales.

Si se considera la cadena ligera, el segmento de secuencia IITASPGEKV (SEQ ID NO: 23) en las cadenas ligeras modificadas de la invención, es adecuado en

- 20 -

el contexto de un anticuerpo que se enlaza con el CD20; de manera específica, este segmento es menos inmunógeno que el segmento correspondiente, ILSASPGEKV (SEQ ID NO: 34), procedente de los anticuerpos 2B8 y Leu16 parentales. De manera similar, las secuencias LASGVPSRF (SEQ ID NO: 26), FSGSGSGTT (SEQ ID NO: 27), y YSMTISSLE (SEQ ID NO: 28) son adecuadas en el contexto de los anticuerpos frente al CD20, y son menos inmunógenas que las secuencias correspondientes, LASGVPSRF (SEQ ID NO: 35), FSGSGSGTS (SEQ ID NO: 36), y YSLTISRVE (SEQ ID NO: 37), que se encuentran en los anticuerpos 2B8 y Leu16 parentales.

La referencia a "substancialmente no inmunógeno" o a "potencial inmunógeno reducido", tal como se usa aquí y en las reivindicaciones adjuntas, incluye la inmunogenia reducida en comparación con un anticuerpo complemento o "progenitor", es decir un anticuerpo monoclonal murino o quimérico no modificado tal como el 2B8 o el Leu16. El término "inmunogenia" incluye la capacidad de provocar, de inducir o de facilitar de otro modo una respuesta humoral y/o con intervención de los linfocitos T en un animal huésped y, en particular, cuando el "animal huésped" es un ser humano.

El término "molécula de anticuerpo" se refiere a un polipéptido de la familia de la inmunoglobulina, que incluye un anticuerpo completo, que es capaz de combinarse, de interactuar o de asociarse de otra forma con un antígeno.

El término "antígeno" se usa aquí para indicar una sustancia que es capaz de interactuar con la molécula de anticuerpo y, en el contexto de la presente invención, quiere indicar el CD20. El CD20 de la presente invención es el CD20 humano o cualquier CD20, que represente un antígeno para el anticuerpo 2B8. El CD20 puede ser un derivado soluble del CD20 o un CD20 asociado a la membrana.

El término "inmunoglobulina" se usa aquí para indicar una proteína, que está constituida por uno o varios polipéptidos substancialmente codificados por genes de la inmunoglobulina. Los genes de la inmunoglobulina reconocidos incluyen los genes de la región IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 y genes de la región variable de la inmunoglobulina de múltiple naturaleza. Una forma natural de la inmunoglobulina es un tetrámero, que comprende dos pares idénticos en los que cada par tiene una cadena ligera y una cadena pesada. En cada par, las regiones variables de la cadena

- 21 -

pesada y de la cadena ligera proporcionan, en conjunto, la superficie de enlace capaz de interactuar con el antígeno. El término Vh se usa aquí para indicar la región variable de cadena pesada, y el término Vk se usa aquí para indicar la región variable de cadena ligera y, en este caso es, como es común en numerosos anticuerpos monoclonales, la cadena ligera es una cadena de tipo "kappa" (k).

La región V incluye residuos de aminoácidos procedentes de una "región que determina la complementariedad" o "CDR" (es decir aproximadamente en los residuos de los aminoácidos 24-34 (L1), 50-56 (L2) y 89-97 (L3) en el dominio variable de cadena ligera y aproximadamente los residuos de los aminoácidos 31-35 (H1), 50-65 (H2) y 95-102 (H3) en el dominio variable de cadena pesada, tal como se ha definido por los autores Kabat *et al.* (Kabat *et al. Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)). De la misma manera, están reconocidas en el estado de la técnica definiciones alternativas de las CDRs, por ejemplo, de conformidad con el esquema de Chothia (Chothia and Lesk (1987) J. Mol. Biol. 196: 901-917), en cuyo caso las CDRs se encuentran aproximadamente en los residuos de los aminoácidos 26-32 (L1), 50-52 (L2) y 91-96 (L3) en la cadena ligera, y aproximadamente en los residuos de los aminoácidos 26-32 (H1), 53-55 (H2) y 96-101 (H3) en la cadena pesada. Los residuos "marco" o "FR" son aquellos residuos de la región V que son diferentes de los residuos de la CDR, tal como han sido aquí definidos.

Tal como se usa aquí, Vh significa un polipéptido que tiene una longitud aproximada de 110 hasta 125 residuos de aminoácidos, cuya secuencia corresponde a cualquiera de las cadenas Vh especificadas aquí, que son capaces, en combinación con Vk, de enlazarse con el CD20 humano. De manera similar, Vk significa un polipéptido que tiene una longitud aproximada de 95-130 residuos de aminoácidos, cuya secuencia corresponde a cualquiera de las cadenas Vk especificadas aquí, que son capaces, en combinación con Vh, de enlazarse con el CD20 humano. Las cadenas pesadas de inmunoglobulina de longitud completa tienen aproximadamente un peso molecular de 50 kDa y son codificadas por un gen Vh en el extremo N y uno de los genes de la región constante en el extremo C. De manera similar, las cadenas ligeras de longitud completa tienen aproximadamente un peso molecular de 25 kDa y son codificadas por un gen de la región V en el extremo N y por un gen de la región

constante en el extremo C.

El término "epitopo de los linfocitos T", tal como se usa aquí y en las reivindicaciones adjuntas, significa una secuencia de aminoácidos, que es capaz de enlazarse con el MHC clase II, capaz de estimular a los linfocitos T y/o así mismo
5 capaz de enlazarse (sin una actividad necesariamente medible) con los linfocitos T en el complejo con el MHC clase II.

El término "péptido", tal como se usa aquí y en las reivindicaciones adjuntas, es un compuesto que incluye dos o más residuos de aminoácidos. Los residuos de aminoácidos están enlazados entre sí por medio de un enlace peptídico (que se define
10 aquí más adelante). Existen 20 aminoácidos diferentes comunes, que se presentan en la naturaleza, que intervienen en la producción biológica de péptidos, y cualquier número de los mismos puede estar ligado en cualquier orden para formar una cadena o un anillo peptídico. Todos los aminoácidos, que se presentan en la naturaleza, que son empleados en la producción biológica de péptidos, tienen la configuración L. Los
15 péptidos sintéticos también pueden ser preparados por medio del empleo de procedimientos sintéticos convencionales, utilizándose L-aminoácidos así como, también, D-aminoácidos, o diversas combinaciones de aminoácidos de las dos configuraciones diferentes. Algunos péptidos contienen únicamente un número reducido de residuos de aminoácidos. Los péptidos cortos, por ejemplo que tienen
20 menos de diez residuos de aminoácidos, son denominados a veces como "oligopéptidos". Otros péptidos contienen un número elevado de residuos de aminoácidos, por ejemplo hasta 100 o por encima de este valor, y son denominados "polipéptidos".

Por convenio, un "polipéptido" puede ser considerado como cualquier cadena
25 peptídica, que contenga tres o más residuos de aminoácidos, mientras que un "oligopéptido" es usualmente considerado como un tipo particular de polipéptido "corto". De este modo, tal como se utiliza aquí, se entiende que cualquier referencia a un "polipéptido" también incluye en este caso un oligopéptido. Por otra parte, cualquier referencia a un "péptido" incluye a los polipéptidos, a los oligopéptidos y a
30 las proteínas. Cada disposición diferente de los residuos de aminoácidos forma polipéptidos o proteínas diferentes. El número de polipéptidos – y, por lo tanto, el número de proteínas diferentes –, que puede ser formado, es prácticamente ilimitado.

- 23 -

El término "composición peptídica" significa una composición que comprende, como mínimo, un polipéptido derivado de un anticuerpo anti-CD20, de manera preferente el 2B8 y el Leu16. El polipéptido puede existir como cadena simple (por ejemplo cadena pesada o parte de la misma, cadena ligera o parte de la misma, o Fv monocatenario) o en una forma dímera. La composición puede comprender varios polipéptidos de cadena simple sólo, que no están ligados por un enlace químico o por un enlace de cisteína.

La invención se refiere a moléculas de anticuerpo monoclonal anti-CD20 en las que se han llevado a cabo substituciones de, como mínimo, un residuo de aminoácido, en posiciones dentro de las regiones V de la molécula dando como resultado una reducción substancial de la actividad de, o la eliminación de, uno o varios epitopos potenciales de los linfocitos T a partir de la proteína. Es más preferente proporcionar moléculas de anticuerpo modificadas, en las cuales se lleva a cabo la modificación de aminoácidos (por ejemplo una substitución) dentro de las regiones más inmunógenas de la molécula progenitora. Las realizaciones más preferentes de la presente invención comprenden moléculas de anticuerpo modificadas, para lo cual se ha alterado cualquiera de los ligandos del MHC clase II, tal como para eliminar el enlace o en otro caso para reducir los números de alotipos del MHC, con los cuales puede enlazarse el péptido.

Con objeto de llevar a cabo la eliminación de los epitopos de los linfocitos T, se llevan a cabo substituciones de aminoácidos en puntos apropiados dentro de la secuencia peptídica prevista para alcanzar una reducción substancial o la eliminación de la actividad del epitopo de los linfocitos T. En la práctica, un punto apropiado será preferentemente asimilable a un residuo de aminoácido vinculante dentro de uno de los bolsillos proporcionados dentro de la cisura de enlace con el MHC clase II.

Es más preferente alterar el enlace dentro del primer bolsillo de la hendidura en la posición del péptido denominada P1 o anclaje P1. La calidad de la interacción de enlace entre el residuo de anclaje P1 del péptido y el primer bolsillo de la cisura de enlace del MHC clase II es reconocida como un determinante principal de la afinidad de enlace total para el péptido en su conjunto. Una substitución apropiada en esta posición del péptido es ya menos apropiada para un residuo dentro del bolsillo, por ejemplo, la substitución por un residuo más hidrófilo. De la misma manera, se

- 24 -

consideran y quedan abarcados en el alcance de la presente los residuos de aminoácidos en el péptido en posiciones equiparables para enlazarse dentro de otras regiones de bolsillo en la hendidura de enlace del MHC.

Se entiende que las substituciones de un solo aminoácido dentro de un epitopo potencial de los linfocitos T es la vía más preferente, por medio de la cual el epitopo puede ser eliminado. Pueden tomarse en consideración combinaciones de substitución dentro de un epitopo individual y, por ejemplo, pueden ser particularmente apropiadas cuando están solapados entre sí epitopos definidos individualmente. De manera adicional, pueden llevarse a cabo substituciones de aminoácidos bien individualmente dentro de un epitopo dado, o en combinación dentro de un epitopo individual, en posiciones no equiparables con los "residuos de bolsillo" con respecto a la cisura de enlace del MHC clase II, pero en cualquier punto dentro de la secuencia peptídica. Todas estas substituciones quedan abarcadas dentro del alcance de la presente.

Una característica importante y significativa de las moléculas de anticuerpo modificadas de la presente invención consiste en que éstas mantienen las actividades funcionales del anticuerpo parental no modificado. Por lo tanto, es particularmente deseable producir moléculas de anticuerpo modificadas en las cuales estén presentes todas las características técnicas beneficiosas asociadas con la eficacia terapéutica del anticuerpo parental no modificado. Esto es adecuado con respecto a la utilidad considerada de la invención, concretamente para proporcionar una composición con eficacia terapéutica en un número de enfermedades importantes en los seres humanos con inclusión especialmente del linfoma de los linfocitos B y de otras patologías en las que intervienen los linfocitos B. Una fármaco de este tipo constituye una realización preferente de la presente invención.

Por lo tanto, la molécula de anticuerpo modificada de la presente invención presenta una afinidad para su antígeno diana, que es similar a la afinidad que presenta el anticuerpo parental. Por lo tanto, la molécula de anticuerpo reconoce a los linfocitos B humanas positivas al CD20. Se considera que la eficacia terapéutica de la molécula parental depende de la capacidad del anticuerpo para inducir citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo (ADCC). Para esta actividad es crítica la capacidad de la región constante del anticuerpo (es decir del dominio Fc)

- 25 -

para enlazar al componente complemento del suero humano C1q. La ADCC y el C1q vinculante están favorecidos por el dominio de la región constante de las moléculas de anticuerpo completas, y la presente invención contempla la producción de moléculas de anticuerpo completas, que comprenden un Fc humano compatible con
5 la inducción de la ADCC. Tales regiones constantes son, de una manera más preferente, cadenas pesadas IgG1 en combinación con cadenas ligeras kappa humanas (por ejemplo Km3).

Se proporcionan proteínas de fusión, en las que las regiones V anti-CD20 de la invención están acopladas con una proteína emparejada de fusión no
10 inmunoglobulina tal como una proteína anticáncer. Ejemplos de tales proteínas incluyen las citocinas. Las citocinas particularmente adecuadas son el tipo natural y las versiones mutantes de IL-2, IL-12, formas fusionadas de IL-2 y de IL-12, y otras interleucinas, interferones, y factores de necrosis tumoral. Los autores Gillies y colaboradores (US5,150,650, WO 98/25978, WO 01/10912, WO 02/72605, WO
15 03/48334), Epstein (WO 03/15697), y Halin et al. (Cancer Res. (2003) 63:3202-10) han descrito un número de configuraciones de regiones V de anticuerpo anticáncer y de citocinas. Las regiones constantes de inmunoglobulina de las proteínas de fusión, que comprenden las regiones V, pueden ser ulteriormente modificadas por medio de mutaciones, tales como mutaciones que afecten a la fijación del complemento,
20 mutaciones que afecten al receptor Fc vinculante, mutaciones que afecten al FcRn vinculante y mutaciones que afecten a la semivida en suero de la proteína de fusión; ejemplos de tales mutaciones están descritas en las publicaciones WO 09943713 y WO01/58957.

Según otro aspecto, la presente invención se refiere a ácidos nucleicos
25 aislados, que codifican composiciones polipeptídicas que se enlazan con el CD20, tal como se define en las reivindicaciones, tales como ácidos nucleicos que codifican una molécula de anticuerpo modificada anti-CD20, un polipéptido de región variable de cadena pesada modificado, un polipéptido de región variable de cadena ligera modificado, proteínas de fusión de anticuerpos anti-CD20, etc. La secuencia de ADN
30 del polinucleótido, que codifica la cadena ligera del Leu16 está mostrada en la figura 17 (SEQ ID NO: 39). La secuencia de ADN, que codifica una versión preferente, empobrecida en epitopo, de la cadena ligera del Leu16 (es decir, que incluye VkZ y

- 26 -

una región constante humana) está mostrada en la figura 17 como SEQ ID NO: 40. La secuencia de ADN del polinucleótido, que codifica la cadena pesada del Leu16 está mostrada en la figura 17 (SEQ ID NO: 41). La secuencia de ADN, que codifica una versión preferente, empobrecida en epitopo, de la cadena pesada del Leu16
5 fusionada con IL-2 (es decir, que incluye VhY, una región constante humana y enlace IL-2 con el extremo C de la región constante) está mostrada en la figura 17 como SEQ ID NO: 43.

Así mismo, otro aspecto se refiere a procedimientos para el tratamiento terapéutico de los seres humanos mediante el empleo de las composiciones
10 polipeptídicas que se enlazan con el CD20 de la invención. Los ejemplos ilustran el modo en que las composiciones polipeptídicas de la invención han sido utilizadas para el tratamiento de las células cancerosas humanas en modelos de ratón, y los resultados obtenidos más adelante son ilustrativos, en general, de las estrategias que podrían ser usadas para el tratamiento de cánceres humanos tales como el linfoma de
15 los linfocitos B y otros cánceres que expresan el CD20.

Las composiciones polipeptídicas que se enlazan con el CD20 de la invención, es decir las proteínas de fusión anti-CD20-IL2, son empleadas de la manera siguiente: se administra una composición polipeptídica de la invención a un paciente, que sufre de un cáncer que expresa el CD20, tal como el linfoma de los
20 linfocitos B. La vía preferente para llevar a cabo la administración es la inyección intravenosa o la inyección subcutánea, pero también es posible la inyección intramuscular, intraperitoneal, intradermal, o por otras vías. De la misma manera, es posible la administración por inhalación, por vía oral o por medio de supositorios, a título de otras vías de administración. La administración se lleva a cabo
25 preferentemente en un ciclo de cuatro semanas de tres veces por semana, seguido por ausencia de tratamiento durante las tres semanas siguientes. Los tratamientos pueden ser más o menos frecuentes, en función del comportamiento farmacocinético de la proteína de fusión en un individuo dado. La dosificación preferente para un adulto de aproximadamente 70 kg se encuentra en el intervalo comprendido entre
30 aproximadamente 1 y aproximadamente 100 miligramos por dosis, con un rango preferente comprendido entre aproximadamente 4 y aproximadamente 20 miligramos por dosis. La dosis más preferente es aproximadamente de 10 miligramos para un

- 27 -

adulto de 70 kg tratado una vez por mes. La respuesta de los pacientes es monitorizada de conformidad con los procedimientos estándar.

EJEMPLOS

Los ejemplos describen ciertos procedimientos particulares para la obtención de proteínas de la invención, pero los técnicos en la materia correspondiente a la expresión proteica reconocerán que puede ser empleada una gran variedad de técnicas perfectamente conocidas para llevar a cabo la obtención de las proteínas de la invención. Por ejemplo, las proteínas de la invención son preparadas preferentemente en células eucariotas tales como las células de los mamíferos, tales como las células NS/0, las células BHK, las células CHO, las células 293 o las células PERC6. Una proteína de la invención puede ser purificada, por ejemplo, empleándose, en secuencia, algunas de las etapas siguientes o todas ellas: la cromatografía en columna de resina mixturada Abx Mixed Resin, la cromatografía de proteína A recombinante y la cromatografía en columna de Q Sepharose, seguido por una diafiltración de flujo tangencial Pellicon 2 para cambiar el tampón por el tampón de formulación. Las etapas de inactivación y de eliminación del virus están interdigitalizadas en estas etapas. Las etapas de inactivación y de eliminación del virus no son necesarias para llevar a cabo la purificación per se, pero son usadas para satisfacer normas reglamentarias. En otro aspecto, la presente invención se refiere a procedimientos para el tratamiento terapéutico de seres humanos con empleo de moléculas de anticuerpo anti-CD20 modificadas. Los ejemplos ilustran el modo en que las proteínas de la invención han sido empleadas para tratar células cancerosas humanas en modelos de ratón, y los resultados obtenidos más adelante son ilustrativos, en general, de las estrategias que podrían ser empleadas para el tratamiento de cánceres humanos tales como el linfoma de los linfocitos B y otros cánceres que expresan el CD20.

Ejemplo 1. Procedimientos y reactivos para la expresión de anticuerpos frente al Leu16 desinmunizados.

1A: Cultivo celular y transfección: con objeto de obtener clones transfectados de manera estable, se introdujo ADN plásmido en células NS/0 de mieloma de ratón por electroporación. Se lavaron una vez aproximadamente 5×10^6 células y se volvieron a suspender con solución de tampón de fosfato (PBS). A continuación se incubaron

- 28 -

diez μg de ADN plásmido linealizado con las células en una cubeta Gene Pulser (distancia entre los electrodos 0,4 cm, BioRad) sobre hielo, durante 10 minutos. La electroporación se llevó a cabo empleándose un dispositivo Gene Pulser (BioRad) con regulación a 0,25 V y 500 μF . Se permitió que las células se recuperasen durante 5 10 minutos sobre hielo, después de lo cual se volvieron a suspender en medio de cultivo y, a continuación, se distribuyeron en placas de 96 pocillos. Se seleccionaron los clones, que se habían transfectado de manera estable, por medio de su crecimiento en presencia de 100 nM de metotrexato (MTX), que fue introducido dos días después de la transfección. Las células alimentadas cada 3 días, 2 o 3 veces más, 10 y los clones resistentes al MTX aparecieron al cabo de 2 a 3 semanas. Se ensayaron los sobrenadantes procedentes de los clones por medio del ensayo ELISA FC antihumano y por medio de cromatografía líquida de alta presión analítica (HPLC), para llevar a cabo la identificación de los productores de alta capacidad (Gillies et al. (1989) J. Immunol. Methods 125:191). Se aislaron los clones con alta capacidad de 15 producción (rendimiento aproximado 100 μg de proteína purificada por ml de sobrenadante de cultivo celular a media escala) y fueron propagados en medio de cultivo, que contenía 100 mM de MTX.

1B: Ensayos ELISA: se utilizaron ensayos ELISA para llevar a cabo la determinación de las concentraciones de los productos proteicos en los sobrenadantes 20 de clones resistentes al MTX. Se empleó el ensayo ELISA anti-huFc para medir la cantidad de proteínas humanas que contienen Fc. El ensayo ELISA anti-huFc se describe en detalle más adelante.

A. Placas de recubrimiento: se recubrieron placas ELISA con IgG antihumana de cabra (H+L) AFFINIPURE™ (Jackson Immuno Research) en una cantidad de 5 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en PBS y 100 $\mu\text{l}/\text{pocillo}$ en placas de 96 pocillos (Nunc Immuno Plate Maxisorp). Las placas recubiertas fueron recubiertas e incubadas a 4 °C durante la noche. A continuación se lavaron las placas 4 veces con 0,05 % de Tween (Tween 20) en PBS y se bloquearon con un 1 % de albúmina de suero bovino (BSA)/ 1 % de suero de cabra en PBS, 200 $\mu\text{l}/\text{pocillo}$. Tras incubación con el tampón de bloqueo a 30 37°C durante 2 horas, se lavaron las placas 4 veces con 0,05 % de Tween y se secaron por recalcado sobre toallas de papel.

B. Incubación con muestras de ensayo y anticuerpo secundario: se diluyeron

- 29 -

muestras de ensayo hasta las concentraciones adecuadas en tampón para muestras, que contenía 1 % de BSA / 1 % de suero de cabra / 0,05 % de Tween en PBS. Se preparó una curva patrón con un anticuerpo quimérico (que porta un Fc humano), cuya concentración era conocida. Para preparar una curva patrón se llevaron a cabo diluciones en serie en el tampón para muestras con objeto de obtener una curva patrón, que se extiende desde 125 ng/ml hasta 3,9 ng/ml. Las muestras diluidas y los patrones se añadieron a la placa, 100 µl/pocillo y la placa se incubó a 37 °C durante 2 horas.

Después de la incubación, la placa se lavó 8 veces con 0,05 % de Tween en PBS. A continuación se añadieron a cada pocillo 100 µl del anticuerpo secundario, el conjugado de IgG antihumana de peroxidasa de rábano picante (HRP) (Jackson Immuno Research), diluido aproximadamente en la relación de 1:120.000 en el tampón para muestras. La dilución exacta del anticuerpo secundario debe ser determinada por separado para cada lote del conjugado de IgG antihumana de HRP. Después de la incubación a 37°C durante 2 horas, la placa se lavó a continuación 8 veces con 0,05 % de Tween en PBS.

C. Revelado: se añadió solución de sustrato recién preparada (sustrato TMB, BioFX Laboratories, MD) a la placa en una cantidad de 100 µl/pocillo y se permitió que se revelase el color a la temperatura ambiente durante 10 minutos. La reacción se detuvo por medio de la adición de HCl 1N, 100 µl/pocillo. Se leyó la placa por medio de un dispositivo lector de placas que estaba ajustado a una longitud de onda de 450 nm.

1C: procedimiento para la determinación de la concentración proteica basado en la HPLC analítica: de la misma manera se determinaron las concentraciones proteicas mediante el empleo de una HPLC analítica. Se determinó una curva patrón para la concentración proteica entre el rango comprendido entre 0,78 y 50,0 µg/ml, empleándose un protocolo de elución basado en el pH, con una columna POROS (Perceptive Biosystems) en un sistema HPLC Agilent 1100, y utilizándose como patrón el inmunoconjugado KS-IL2.

Ejemplo 2. Determinación de la afinidad de enlace relativa de la proteína de fusión Leu16 anticuerpo-IL2 empobrecida en epítopo para las células tumorales de Daudi, que presentan el antígeno CD20. Se comparó el enlace de la proteína de

- 30 -

fusión Leu16-IL2 empobrecida en epitopo con los linfocitos de linfoma de Daudi, que portan el antígeno CD20, con el enlace de otros anticuerpos anti-CD20 conocidos mediante la utilización del análisis por citometría de flujo. Se utilizaron aproximadamente 10^6 células de Daudi con diversas concentraciones de anticuerpo en un volumen de 100 μ l, para cada muestra ensayada. El análisis mostró que la proteína de fusión de anticuerpo-IL2 modificada con regiones variables VHY y VKZ se enlaza con las células que expresan el CD20, al menos como tal lo hace la correspondiente proteína de fusión Leu16-IL2 quimérica. Esto muestra que las mutaciones introducidas en las regiones V de Leu16 para generar VHY y VKZ no interfieren con el antígeno vinculante. La proteína de fusión de anticuerpo-IL2 con regiones variables VHY y VKZ es igualmente comparada favorablemente con el RITUXAN (C2B8), así como, también, con la proteína de fusión 2B8-IL2, que contiene las regiones V de 2B8 murino. Los datos de la tabla 1 siguiente muestran la intensidad media de la fluorescencia, medida en un citómetro de flujo, de las células de Daudi expuestas a diferentes concentraciones de anticuerpo o de proteína de fusión de anticuerpo-IL2; estos datos representan un juego típico de resultados experimentales.

Tabla 1

Anticuerpo	Concentración del anticuerpo (μ g/ml)							
	10	5	2,5	1,25	0,625	0,313	0,156	0,078
2B8-IL2	857,32	720,02	512,81	369,04	229,45	147,26	85,32	52,13
Ab(VhY/VkZ-IL2	987,54	848,56	677,11	539,35	336,41	219,48	124,33	74,77
chLeu16-IL2	789,20	665,20	489,04	363,00	219,06	131,92	78,24	52,31
2B8	997,18	816,47	647,43	491,38	311,52	215,34	130,70	86,48

Ejemplo 3. Citotoxicidad con intervención celular, dependiente del anticuerpo (ADCC) inducida por proteínas de fusión anti-CD20-IL2, que portan mutaciones que reducen la inmunogenia.

Se expusieron linfocitos NS/0, que expresan el CD20, a diversas concentraciones de anticuerpo o de proteína de fusión de anticuerpo-IL2 y se

- 31 -

ensayaron con respecto a la lisis de DAC, de acuerdo con los procedimientos estándar. Un juego de datos típico está mostrado en la FIGURA 5. Las proteínas ensayadas eran las siguientes: chLeu16 es un anticuerpo quimérico, que está constituido por las regiones V de Leu16 de ratón y por las regiones constantes de IgG1 humana; la chLeu16-IL2 es un anticuerpo quimérico, que está constituido por las regiones V de Leu16 de ratón y por las regiones constantes de IgG1 humana, con una mitad IL-2 humana fusionada con el extremo C de la cadena pesada del anticuerpo; Ab(VhY/VkZ)-IL2 es idéntica a la chLeu16-IL2, con excepción de que estaban presentes los dominios variables VhHY y VkZ listados en las FIGURAS 3 y 4 en lugar de las regiones V de Leu16 murino; 2B8 es, en esta figura, un anticuerpo quimérico, que está constituido por las regiones V de ratón de 2B8 y por las regiones constantes de IgG1 humana; el 2B8-IL2 es, en esta figura, un anticuerpo quimérico, que está constituido por las regiones V de ratón de 2B8 y por las regiones constantes de IgG1 humana, con una mitad IL-2 humana fusionada con el extremo C de la cadena pesada del anticuerpo; y KS-IL2 es un anticuerpo anti-EpCAM, con una mitad IL-2 humana fusionada con el extremo C de la cadena pesada del anticuerpo. La proteína KS-IL2 sirve como control negativo. Algunas de las proteínas de fusión anticuerpo-IL2 tienen mutaciones de los aminoácidos de cadena pesada del extremo C tal como se ha descrito por los autores Gillies *et al.* (WO 02/66514); estas mutaciones no tenían efecto sobre los datos de ADCC.

Los datos indican que una proteína de fusión, que porta las regiones variables VhY y VkZ tenía una actividad para la estimulación de la ADCC igual que la de las moléculas que portan regiones V murinas que se enlazan con CD20. Se determinó la actividad IL2 por medio de diversos ensayos celulares diferentes. Los resultados están indicados en la tabla 2 siguiente.

Tabla 2

	Linfocitos T		linfocitos T	+ IL2 R ₋
	CTLL-2 ED ₅₀ media (ng/ml)	HUPBMC ED ₅₀ media (ng/ml)	Juego-225 ED ₅₀ media (ng/ml)	TF-1 ED ₅₀ media (ng/ml)
KS IL2	1,71	2,09	0,08	0,51
R&D Hu IL2	0,65	1,51	0,07	0,71

- 32 -

	Linfocitos T		linfocitos T	+ IL2 R_
	CTLL-2 ED ₅₀ media (ng/ml)	HUPBMC ED ₅₀ media (ng/ml)	Juego-225 ED ₅₀ media (ng/ml)	TF-1 ED ₅₀ media (ng/ml)
ChLeu16-IL2			0,06	1,15
D1-Leu16-IL2	1,94	2,03	0,05	1,14
D1-Leu-16-IL2 Degly	3,30	3,42	0,09	1,99

De la misma manera, se ha encontrado que las inmunocitocinas basadas en IL-2, que actúan sobre el CD20, son altamente eficaces en modelos de ratón SCID de linfomas perfectamente establecidos, al menos en ausencia de los linfocitos B humanas normales, que expresan el mismo antígeno superficial, y que el empleo de inmunocitocinas era mucho más eficaz que el del anticuerpo desnudo para ampliar la supervivencia de los ratones con enfermedad diseminada, independientemente de la carencia de linfocitos T funcionales, linfocitos que han sido identificados muchos estudios preclínicos por ser efectores primarios de la actividad antitumoral de la inmunocitocina.

Ejemplo 4. Citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) inducida por proteínas de fusión anti-CD20-IL2, que portan mutaciones que reducen la inmunogenia.

Para determinar la actividad CDC de anticuerpos y de proteínas de fusión de la invención, se incubaron células de Daudi marcadas con ⁵¹Cr durante 1 hora con plasma humano (diluido 1 en 8) como una fuente de complemento. El porcentaje de lisis específica se calculó restándose la radioactividad de fondo de los valores experimentales, dividiéndose por la radioactividad emitida total obtenida por lisis con detergente, y multiplicándose por 100.

Una comparación entre las actividades CDC del anticuerpo Leu-16 quimérico y del correspondiente anticuerpo Leu16 con regiones V empobrecidas en epitopo indicó que las actividades de estos dos anticuerpos eran esencialmente idénticas. Una comparación similar entre las actividades CDC de la fusión quimérica Leu-16

- 33 -

anticuerpo-IL2 y de la correspondiente fusión Leu16 anticuerpo-IL2 con regiones V empobrecidas en epitopo indicó que las actividades de estas dos proteínas de fusión eran, así mismo, esencialmente idénticas.

En contra de lo que ocurre con la ADCC, la CDC se redujo algo como consecuencia de la fusión IL-2 con el extremo C de la cadena H (figura 2B). Con anterioridad se había descrito un efecto similar con una inmunocitocina anti-GD2 (Gillies SD, et al. Cancer Res. (1999);59:2159-2166.). En la figura 7C se han mostrado resultados típicos.

Ejemplo 5. Perfil farmacocinético de una proteína de fusión Leu16-IL2 empobrecida en epitopo.

En un constructo particularmente conveniente Leu16VhY/VkZ-IL2, se mantuvieron el FcR vinculante y la actividad ADCC mediante la utilización de un isotipo de cadena pesada Cg1 pero que tenía incorporada una región de unión modificada entre la cadena H y la IL-2 con objeto de reducir la proteólisis intracelular (WO 01/58957). De manera específica, se empleó un cambio de lisina por alanina que corresponde al aminoácido C-terminal de la cadena pesada del anticuerpo. La proteína resultante tenía un perfil farmacocinético favorable después de la administración i.v., especialmente durante la fase a de distribución (figura 8). Se examinó el efecto del FcR vinculante sobre el perfil farmacocinético por medio del ensayo de la Leu16VhY/VkZ desglucosilada por vía enzimática en el mismo experimento. Los resultados indican que la pérdida del FcR vinculante mejora algo el comportamiento farmacocinético. En función de la aplicación y de la frecuencia deseada de la administración, puede ser preferible emplear una molécula de Leu16VhY/VkZ-IL2 con el locus de glicosilación enlazado con N en el dominio CH2, que tiene actividad ADCC pero una semivida en suero relativamente más corta, o una molécula de Leu16VhY/VkZ-IL2, que carezca de locus de glicosilación enlazado con N en el dominio CH2, que no tiene actividad ADCC pero que tiene una semivida en suero relativamente prolongada.

Ejemplo 6. Perfil de eficacia de una proteína de fusión Leu16-IL2 empobrecida en epitopo.

Se inyectaron ratones SCID i.v. con 5×10^6 CD20+ linfocitos de linfoma de Daudi (día 0) seguido por inyección i.v. de inmunocitocinas (5 dosis diarias de 5 o de

- 34 -

20 mg) o con anticuerpo de control (500 mg cada dos días con un total de 3 dosis) comenzándose el día 7. Se empleó una inmunocitocina de control 425-IL2 de baja selectividad, específica para el EGFER (control), a dosis elevada para demostrar la actividad debida, en primer lugar, a la semivida alterada de la IL-2. Los resultados

5 fueron registrados como estado general de salud, por ejemplo parálisis, que precede al fallecimiento entre los días 10-14, y supervivencia de los ratones. Las figuras 9-12 muestran resultados típicos. Los datos en las figuras 10-12 proceden de un solo experimento a gran escala, pero los datos están presentados en diferentes figuras para facilitar la comprensión. En los primeros experimentos antitumorales se inyectaron

10 células de Daudi i.v. en ratones SCID dando por resultado una enfermedad extensamente diseminada, que condujo a la parálisis de todos los ratones el día 30. Se retrasó el tratamiento hasta el día 7 para asegurar que las células tumorales se habían injertado por completo. Hemos comparado dosis bajas y dosis moderadas tanto de las inmunocitocinas quiméricas como de las inmunocitocinas

15 Leu16VhY/VkZ-IL2 con dosis elevada de rituximab, empleándose 5 dosis diarias de las inmunocitocinas y 3 dosis, en días alternos, del anticuerpo. Se eligió este programa debido a que la semivida en circulación del rituximab es mucho mayor (varios días) en comparación con la de las inmunocitocinas (aproximadamente 8 horas). Bajo estas condiciones, el rituximab (25 mg/kg x 3) amplió en un 50 % la

20 supervivencia de los ratones que portaban tumor, desde los días 39 hasta 56, con relación al control PBS (figura 4). Los grupos con dosis baja de quimérico y de Leu16VhY/VkZ-IL2 (0,25 mg/kg x 5) tenían una curva de supervivencia similar (50 % de supervivencia al cabo de 64 días) como ocurre con la dosis elevada de rituximab. Los grupos tratados con las dosis elevadas de las inmunocitocinas (1

25 mg/kg x 5) mostraron un aumento espectacular de la supervivencia sin fallecimiento de los ratones en el grupo de la Leu16VhY/VkZ-IL2 al final del experimento (día 110) y únicamente falleció 1 de cada 8 ratones en el grupo de la chLeu16-IL2. De este modo, las regiones V empobrecidas en epitopo del anticuerpo Leu16 eran tan eficaces como las del anticuerpo Leu16 murino, en el contexto de una

30 inmunocitocina basada en IL-2, para el tratamiento de linfoma diseminado en ratones SCID. De igual modo, en el mismo experimento se ensayó la contribución de la función efectora de anticuerpo sobre la actividad antitumoral, empleándose la

- 35 -

Leu16VhY/VkZ-IL2 desglicosilada por vía enzimática, que ha perdido la actividad ADCC como se ha mostrado más arriba (figura 7B). Como se ha mostrado en la figura 12, se preservó una porción significativa de la actividad antitumoral independientemente de la pérdida de la actividad ADCC. En fechas posteriores se observó una marcada diferencia entre las formas intactas y las formas desglicosiladas en los grupos de mayor dosis. Por lo tanto, mientras que la ADCC parece que juega un papel en este modelo, una gran parte de la actividad antitumoral en este modelo puede ser atribuida a la sola administración de la IL-2 selectiva del tumor. Con objeto de poner de manifiesto la importancia del enlace real de una inmunocitocina empobrecida en epítipo con una célula diana, en contra de lo que ocurre con un efecto de la simple ampliación de la semivida en suero de la IL-2, se ensayó una inmunocitocina IL-2 de control que es selectiva del EGFR (Cruz et al. J Biotechnol. (2002) 26;96:169-183), que se expresa solo a niveles muy bajos (figura 6B) en esta línea celular. Se encontró que, incluso la dosis mayor (1 mg/kg), administrada durante 5 días consecutivos, tiene una actividad antitumoral mucho menor en este modelo que la misma dosis de las inmunocitocinas que son selectivas para el CD20 (figura 13). Por lo tanto, la inmunocitocina selectiva para el EGFR tiene una actividad significativamente menor que la misma dosis de la Leu16VhY/VKkIL2 administrada sólo dos veces, a intervalos de tres días (los días 7 y 10), o a una dosis cuatro veces menor administrada durante 5 días. Estos resultados demuestran la importancia de la selectividad específica de las células tumorales para la actividad antitumoral.

Actividad antitumoral de los componentes separados constituidos por el anticuerpo y por la IL-2. Ensayos clínicos que combinan el rituximab y la IL-2 han mostrado tasas acrecentadas de respuesta (Friedberg et al. Br. J. Haematol. (2002); 117: 828-834). Esta combinación fue ensayada en el mismo modelo de linfoma de Daudi empleándose dos enfoques diferentes y se comparó con el tratamiento con la Leu16VhY/VkZ-IL2. En el primero de los casos, se administraron a los animales i.v. durante 5 días consecutivos cantidades molares equivalentes del anticuerpo Leu16VhY/VkZ y de la IL-2, contenidas en 20 mg de la Leu16VhY/VkZ-IL2. En el segundo de los casos, se administraron s.c. 25 mg/kg del rituximab y 10 mcg de la IL-2 cada dos días, en 3 dosis. Este segundo régimen de dosificación aseguraría

- 36 -

niveles elevados de anticuerpo así como una activación sostenida de la IL-2 como consecuencia del efecto depósito de la administración s.c. Los resultados indican que los dos protocolos de combinación dan como resultado, a groso modo, el mismo grado de actividad antitumoral, con un 50 % de supervivencia al cabo de 63 días (figura 14). El tratamiento con cantidades equivalentes de la inmunocitocina Leu16VhY/VkZ-IL2, empleada en el grupo de combinación de dosis baja, dio como resultado una supervivencia a largo plazo de todos los ratones. Esto es particularmente notable puesto que los grupos tratados, por separado, con el anticuerpo y con la IL-2 están expuestos al anticuerpo durante un tiempo mucho mayor que la Leu16VhY/VkZ-IL2 como consecuencia de que su semivida es mucho mayor. Por otra parte, las cantidades de la IL-2, que fueron empleadas para llevar a cabo la comparación, estaban basadas en masa y no en unidades de actividad de la IL-2. Tal como se muestra más arriba en la tabla 2, la rIL-2 libre es aproximadamente 3 veces más activa que la cantidad molar equivalente de la IL-2 contenida en la Leu16VhY/VkZ-IL2 cuando se mide con una línea celular de ratón, que exprese la elevada afinidad del IL-2R. Para células inmunitarias de ratón, que expresan únicamente el IL-2R intermedio, esta diferencia es más de 10 veces mayor, en favor de la rIL-2 libre.

Ejemplo 7. Actividad antitumoral de las moléculas de Leu16VhY, VKZ en ratones reconstituidas con células inmunitarias humanas En el modelo SCID, reconstituido con linfocitos B humanas, se inyectaron ratones i.v. con 5×10^6 CD20+ linfocitos de linfoma de Daudi el día 0 y con $4,5 \times 10^7$ de PBMC humanos el día 5. Un grupo de ratones (n = 8) recibió solamente PBS; un grupo recibió solamente anticuerpo (500 mg el día 7, 9 y 11); un grupo recibió solamente inmunocitocina (20 mg los días 11-15); y un grupo recibió la combinación de anticuerpo (500 mg el día 7, 9 y 11) y de inmunocitocina (20 mg los días 11-15). Se comprobó en todos los ratones la presencia de anticuerpos humanos en su suero mediante el ensayo ELISA IgG antihumana los días 21 y 34. La selectividad del CD20 sobre los linfocitos de linfoma B es complicada debido a que el antígeno es expresado en los linfocitos B normales. De este modo, la terapia comprende el empobrecimiento selectivo de las células tumorales en la base de un gran número de linfocitos B normales. Puesto que la dosificación de la inmunocitocina IL-2 debe ser limitada, probablemente, debido a

- 37 -

la toxicidad del componente IL-2, es improbable que puedan ser usadas para la Leu16VhY, VKZ-IL2 las elevadas dosis, que son requeridas para el empobrecimiento de los linfocitos B normales por el anticuerpo desnudo. El tratamiento combinado es probablemente un enfoque clínico, en el que la terapia con

5 Leu16VhY, VKZ-IL2 seguiría al tratamiento con rituximab para disminuir, en primer lugar la carga, tanto de las células tumorales CD20+ como, también, la de los linfocitos B normales. En una tentativa para crear un modelo tumoral más realista, se inyectaron ratones con linfocitos B humanas que contenían PBMC y, a continuación, se comparó la monoterapia con el rituximab o con la Leu16VhY/VkZ-IL2 así como

10 la combinación en la que el anticuerpo es administrado a una dosis única el día 7, seguido por un ciclo de terapia con la Leu16VhY/VkZ-IL2 comenzándose el día 11. Un segundo juego de ratones no fue implantado con PBMC humanos pero recibió los mismos regímenes de tratamiento. Se obtuvo la confirmación de que los linfocitos B habían sido implantados llevándose a cabo la medición de los niveles de IgG humana

15 en todos los grupos de ratones. Los datos en la tabla 3 muestran que todos los ratones que recibieron PBMC humanos tenían niveles de IgG humana > 500 ug/ml lo que demuestra un injerto eficaz.

Tabla 3. Producción de anticuerpos humanos en ratones SCID implantados con PBMC humanos

Grupo de tratamiento	Día 21		Día 34	
	Linfocitos - B	Linfocitos + B	Linfocitos - B	Linfocitos + B
PBS	NT	> 500	0	> 500
DI-Leu16-IL2 (d 11-15)	NT	64,1	0,83	88,31
Rituximab (d 7)	NT	14,32	9,12	6,18
Combinación	NT	9,55	6,0	5,8

20

Se cuantificaron los anticuerpos humanos por medio del ensayo ELISA anti-IgG y se representaron en mcg/ml. Los anticuerpos detectados en el grupo de

- 38 -

linfocitos - B muestran la contribución del rituximab y de la DI-Leu16-IL2 (ambas IgG humanas) al total de anticuerpo en circulación. Los niveles de anticuerpos el día 21 muestran aumentos espectaculares en todos los grupos de tratamiento, con inclusión de la monoterapia con la Leu16VhY/VkZ-IL2, sin embargo, el nivel en

5 IgG se acrecentó ligeramente el día 34, lo que indica una producción continuada por parte de los linfocitos B. El tratamiento con el rituximab o con la combinación, por otro lado, dio como resultado la eliminación de la producción de anticuerpos humanos el día 34. Los niveles remanentes, detectados en la sangre de los ratones en

10 ambos grupos tratados con el rituximab y con la combinación, eran claramente del propio rituximab, puesto que se encontraron los mismos niveles en los grupos correspondientes, que no fueron implantados con PBMC. Por lo tanto, los resultados mostraron que las actividades antitumorales de todos los grupos de tratamiento no quedaron afectadas de manera significativa por la presencia de los linfocitos CD20+

15 B humanos (figura 15). Sin pretender un compromiso teórico, esto puede deberse, en parte, a la capacidad de la Leu16VhY/VkZ-IL2 sola para eliminar la mayoría de los linfocitos B implantados, así como de las células tumorales. En este modelo se redujo marcadamente el nivel de actividad de la Leu16VhY/VkZ-IL2, en comparación con los experimentos previos, como consecuencia del aplazamiento de la iniciación del tratamiento (día 11 frente al día 7) sin embargo, debe observarse que únicamente se

20 utilizó un solo ciclo de tratamiento para comparar moléculas diferentes y serían clínicamente útiles ciclos de tratamiento adicionales. De la misma manera, hemos encontrado que la combinación de una sola dosis de rituximab, seguida por un solo ciclo con la Leu16VhY/VkZ-IL2, tenía, como mínimo, actividad antitumoral aditiva, permaneciendo la mayoría de los ratones libre de enfermedad al final del

25 experimento (día 120).

Ejemplo 8. Procedimientos generales para la eliminación de los epitopos de los linfocitos T a partir de los anticuerpos anti-CD20

Los autores Haisma et al. (Blood 92:184 (1998)) han descrito otro anticuerpo anti-CD20, denominado 1H4, cuyas regiones V tienen aproximadamente un 95 % de

30 identidad con las regiones V del Leu16. La figura 16 muestra una alineación de las regiones V pesada y ligera (kappa) del 2B8, del Leu16, de sus derivados empobrecidos en epitopo de conformidad con la invención, y del 1H4. A partir del

- 39 -

descubrimiento de que los anticuerpos 2B8, Leu16 y 1H4 tienen una secuencia tan similar, una deducción de la invención consiste en que todos estos anticuerpos reconocen al mismo epítipo en CD20. Sin pretender un compromiso teórico, una observación de la invención consiste en que el CD20 es una proteína altamente conservada entre el ratón y los seres humanos y que existe una secuencia CEPANPSEKNSPSTQYC (SEQ ID NO: 38) en el dominio extracelular del CD20 que corresponde a la secuencia CEPSNSSEKNSPSTQYC (SEQ ID NO: 29) en el CD20 de ratón. En el CD20 humano, la secuencia NPS no está glicosilada en N, mientras que la secuencia correspondiente NSS en el CD20 de ratón está glicosilada en N. De acuerdo con esta teoría de la invención, la falta de glicosilación en N en el CD20 humano revela un epítipo de anticuerpo, que está ausente en el CD20 de ratón de tal manera que, cuando los ratones son inmunizados con el CD20 humano, este epítipo no será reconocido como propio por el sistema inmune del ratón. Por lo tanto, de conformidad con la invención, las regiones V iniciales de un anticuerpo monoclonal, dirigidas contra el CD20, tienen una identidad en la secuencia de, al menos, un 80 %, y de una manera más frecuente tienen una identidad en la secuencia de, al menos, un 90 %, con las regiones V de Leu16 o de 2B8. El anticuerpo 1H4 es un ejemplo a este respecto. De conformidad con la invención, los epítopos de los linfocitos T en un anticuerpo anti-CD20, por ejemplo 1H4, son eliminados en primer lugar por medio de la alineación de las regiones V de cadena pesada y de cadena ligera con Leu16, con 2B8 y con las correspondientes variantes empobrecidas en epítipo, que están mostradas en la figura 16 y, en segundo lugar, por medio de la introducción de mutaciones en las regiones V del anticuerpo contra el CD20, tal como el 1H4, que corresponde a las mutaciones introducidas en las versiones empobrecidas en epítipo del Leu16 y/o del 2B8. Las alineaciones pueden ser llevadas a cabo por medio de una alineación manual o empleándose programas de alineación perfectamente conocidos tales como el BLAST. Por ejemplo, cuando se usan las alineaciones de la figura 16, es evidente que se genera un dominio Vh anti-CD20 con uno o varios de los segmentos de aminoácidos siguientes: SGAELKKPGAS, VSCKASGYT, LEWTGAIY, YNQKFKGKT, FKGKTTTLTA, YMELSSLRS, SSLRSED TAV, y DWGTGTTVT es decir, SEQ ID NO: 15-22, respectivamente. De manera similar, cuando se utilizan las alineaciones de la figura

- 40 -

16, es evidente que se genera un dominio VL anti-CD20 con uno o varios de los segmentos de aminoácidos siguientes: IITASPGKEKV, CRASTSASY, QKPTSSP, LASGVPSRF, FSGSGSGTT, y YSMTISSLE, es decir, SEQ ID NO: 23-28, respectivamente. En particular, se genera una variante del anticuerpo 1H4 con uno o
5 más de los segmentos de aminoácidos precedentes de este párrafo. La utilidad de las mutaciones introducidas de forma novedosa puede ser verificada, además, por medio de la comprobación de que los epitopos de los linfocitos T han sido realmente eliminados, mediante la utilización de procedimientos estándar para la detección de la actividad de los epitopos de los linfocitos T. Por ejemplo, pueden ser empleados
10 procedimientos como los de los autores Carr et al. (solicitud de patente norteamericana US 20030153043 y WO 02/069232). De manera alternativa, pueden añadirse a las células inmunitarias los péptidos correspondientes a los epitopos potenciales de los linfocitos T, de manera preferente a las células inmunitarias humanas, y pueden ser ensayadas con respecto a la capacidad para estimular la
15 proliferación celular de acuerdo con técnicas estándar. Las proteínas correspondientes, que contienen la región V, están configuradas como anticuerpos completos, como proteínas de fusión de anticuerpos, como Fabs, como proteínas de fusión de Fab, como proteínas Fv monocatenarias o en forma de otras configuraciones estándar de las regiones V de anticuerpos. Las correspondientes
20 proteínas, que contienen la región V, son producidas entonces de conformidad con los procedimientos estándar de expresión de proteínas, tales como los que han sido descritos más arriba en los ejemplos.

REIVINDICACIONES

1.- Una molécula de anticuerpo anti-CD20 fusionada con IL-2, que comprende:

- 5 (i) un polipéptido de región variable de cadena pesada, modificado, que tiene la secuencia de residuos de aminoácidos de la SEQ ID NO: 9, pero que incluye, como mínimo, una substitución de residuos de aminoácidos en dicha secuencia, elegida entre el grupo constituido por V₁₂K, M₂₀V, A₆₈T, Q₈₂E, T₈₇R, S₉₁T, D₉₃V, y A₁₁₄T,
- 10 (ii) un polipéptido de región variable de cadena ligera, modificado, que tiene la secuencia de residuos de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11, pero que incluye, como mínimo, una substitución de residuos de aminoácidos en dicha secuencia, elegida entre el grupo constituido por L₁₁I, S₁₂T, A₅₉S, S₆₉T, L₇₂M, R₇₆S, y V₇₇L, y
- 15 (iii) una región constante de cadena pesada de IgG humana y una región constante de cadena ligera humana.

2.- Una proteína de fusión de anticuerpo anti-CD20 de la reivindicación 1, en la que la región constante de la IgG es una región constante de la IgG1 humana.

3.- Una proteína de fusión de anticuerpo anti-CD20 de la reivindicación 1 o 2, en la que la región constante de cadena ligera humana es una región constante de
20 cadena ligera kappa humana.

4.- Una proteína de fusión de anticuerpo anti-CD20, de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende una región variable de cadena pesada, que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 10.

5.- Una proteína de fusión de anticuerpo anti-CD20, de conformidad con
25 cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende una región variable de cadena ligera, que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 12.

6.- Una proteína de fusión de anticuerpo anti-CD20, de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende una región variable de cadena pesada, que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 10 y una
30 región variable de cadena ligera, que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 12.

7.- Una proteína de fusión de anticuerpo anti-CD20, de conformidad con

- 42 -

cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que el extremo C de la molécula de anticuerpo está fusionado con el extremo N de la IL-2.

8.- Una proteína de fusión de anticuerpo anti-CD20, de conformidad con la reivindicación 1, codificada por las secuencias de ADN de la SEQ NO: 40 y de la
5 SEQ NO:43.

9.- Una composición farmacéutica, que comprende una proteína de fusión de anticuerpo anti-CD20, de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, junto con un soporte, un excipiente o un diluyente farmacéuticamente aceptable.

10.- La composición farmacéutica de la reivindicación 9, que comprende,
10 además, un fármaco adicional farmacológicamente efectivo.

11.- Una molécula de ADN, que codifica una proteína de fusión de anticuerpo anti-CD20, de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.

12.- Uso de una proteína de fusión de anticuerpo anti-CD20 de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 o de una composición farmacéutica de la reivindicación 9 o
15 10, para la fabricación de un medicamento destinado al tratamiento de cánceres que expresan CD20.

13.- Uso de la reivindicación 12, en el que dicho cáncer es un linfoma de los linfocitos B.

14.- Una composición farmacéutica que comprende la proteína de fusión de anticuerpo anti-CD20 de la reivindicación 8 y rituximab de anticuerpo monoclonal.
20

15.- Una proteína de fusión de anticuerpo anti-CD20, de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, para el uso en el tratamiento de cánceres que expresan CD20.

Siguen veintitrés hojas de dibujos.

Figura 1

2B8VH:

QVQLQQPGAELVKAGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGRGLEWIGAIYPGNGDTSYN
QKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARSTYYGGDTYFNVWGAGTTVTVSA

VhC:

QVQLQQPGAELKKPGASVKVSCCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGRGLEWTGAIYPGNGDTSYN
QKFKGKTTLTADKSSSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARSTYYGGDWYFNVWGAGTTVTVSA

VhD:

QVQLQQPGAELKKPGASVKVSCCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGRGLEWIGAIYPGNGDTSYN
QKFKGKTTLTADKSSSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARSTYYGGDWYFNVWGAGTTVTVSA

Figura 2

2B8VL:

QIVLSQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSVSYIHWFQQKPGSSPKPWIYATSNLASGVVPVRFSGSGSGTSYSLT
ISRVEAEDAATYYCQQWTSNPPTFGGGTKLEIK

VkA:

QIVLSQSPAIITASPGEKVTMTCRASTSASYIHWFQQKPTSSPKPWIYATSNLASGVPSRF
SGSGSGTTYSMTISSLEAEDAATYYCQQWTSNPPTFGGGTKLEIK

VkB:

QIVLSQSPAIITASPGEKVTMTCRASTSVSYIHWFQQKPTSSPKPWIYATSNLASGVPSRF
SGSGSGTTYSMTISSLEAEDAATYYCQQWTSNPPTFGGGTKLEIK

VkC:

QIVLSQSPAIITASPGEKVTMTCRASTSVSYIHWFQQKPGSSPKPWIYATSNLASGVPSRF
SGSGSGTTYSMTISSLEAEDAATYYCQQWTSNPPTFGGGTKLEIK

VkD:

QIVLSQSPAIITASPGEKVTMTCRASSSVSYIHWFQQKPGSSPKPWIYATSNLASGVPSRF
SGSGSGTTYSMTISSLEAEDAATYYCQQWTSNPPTFGGGTKLEIK

- 45 -

Figura 3

Leu-16VH:

EVQLQQSGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGQGLEWIGA
IYPGNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSADYYCARSN
YYGSSYWFFDVWGAGTTTVTVSS

Leu-16VHY:

EVQLQQSGAELKKPGASVKVSCASGYTFTSYNMHWVKQTPGQGLEWIGA
IYPGNGDTSYNQKFKGKTTLTADKSSSTAYMELSSLRSED^TAVYYCARSN
YYGSSYWFFDVWG^TGT^TTVTVSS

Figura 4

Leu-16VL:

DIVLTQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSVNYMDWYQKKPGSSPKPWIYAT
SNLASGVPARFSGSGSGT^SYSLTISRVEAEDAATYYCQQWSFNPPTFGGG
TKLEIK

Leu-16VLZ:

DIVLTQSPAIITASPGEKVTMTCRASSSVNYMDWYQKKPGSSPKPWIYAT
SNLASGVPS^RFSGSGSGT^TYSMT^ISS^LEAEDAATYYCQQWSFNPPTFGGG
TKLEIK

- 46 -

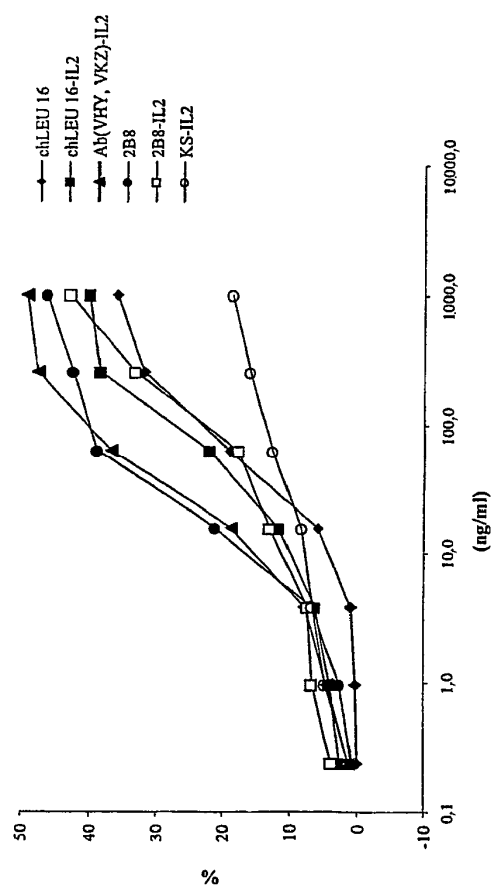


Figure 5

- 47 -

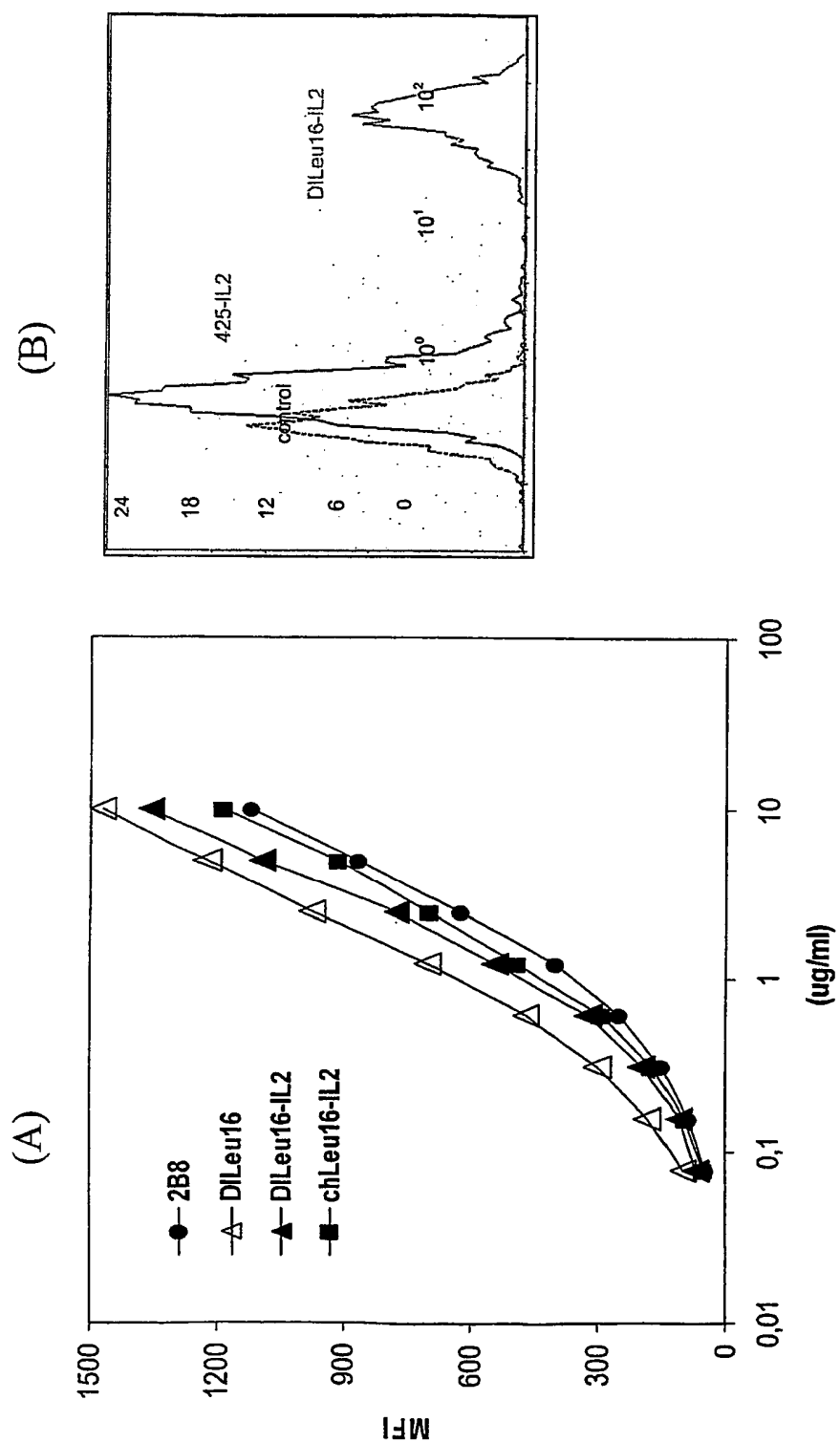


Figure 6

- 48 -

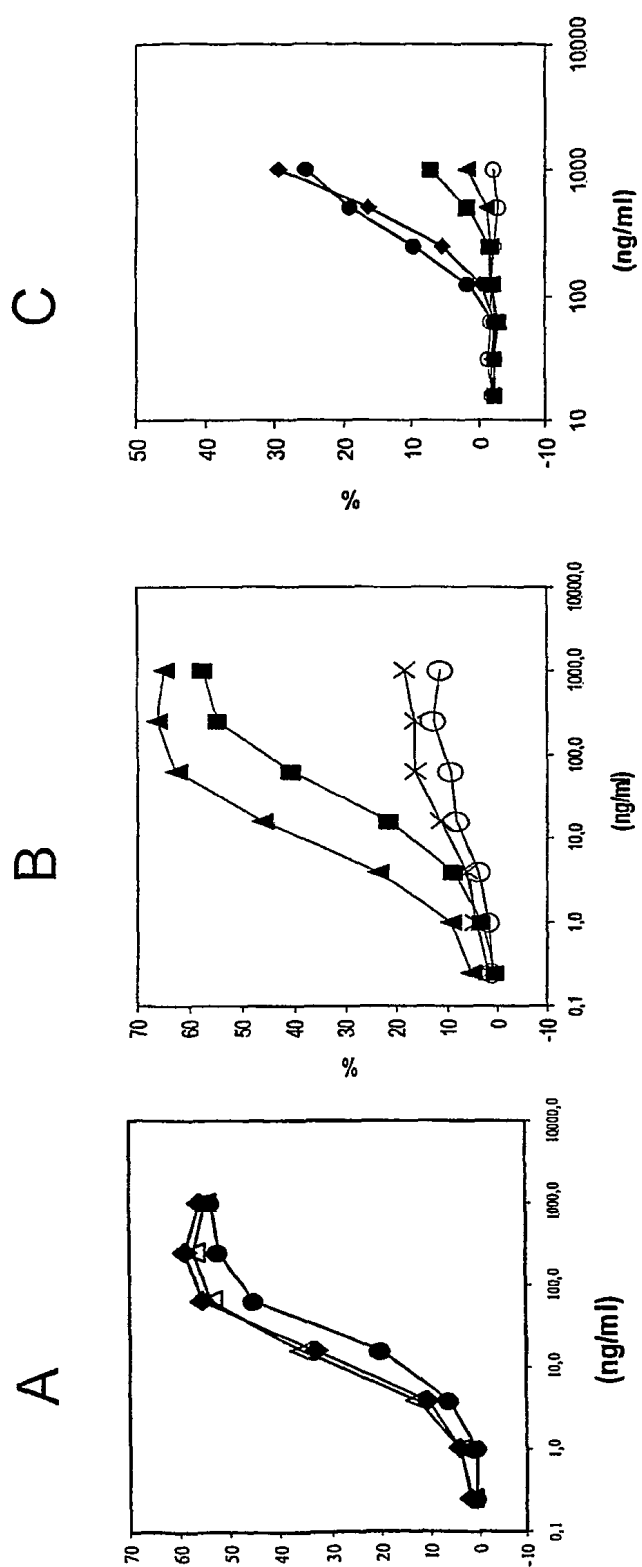
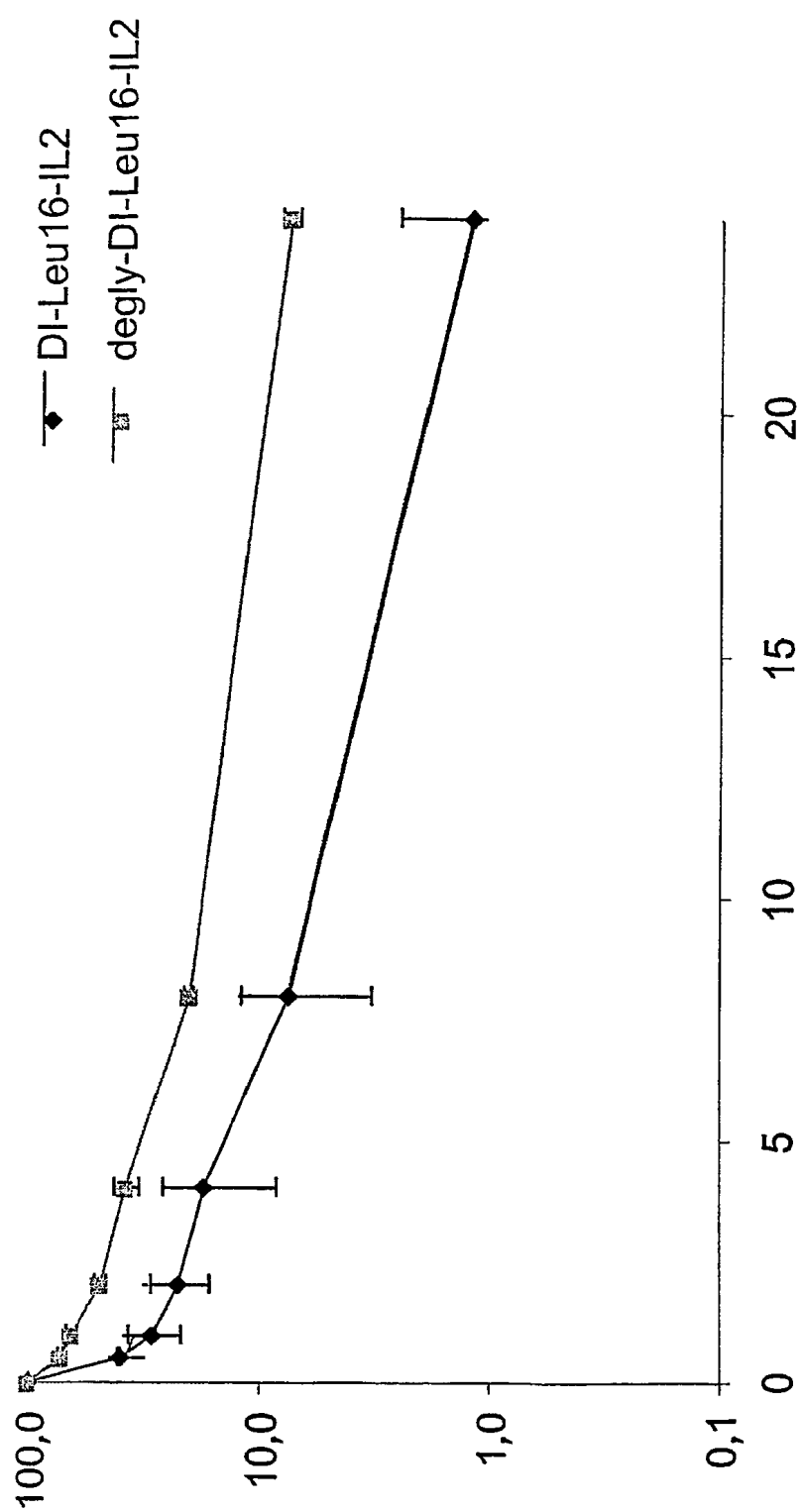


Figura 7

- 49 -

**Figura 8**

- 50 -

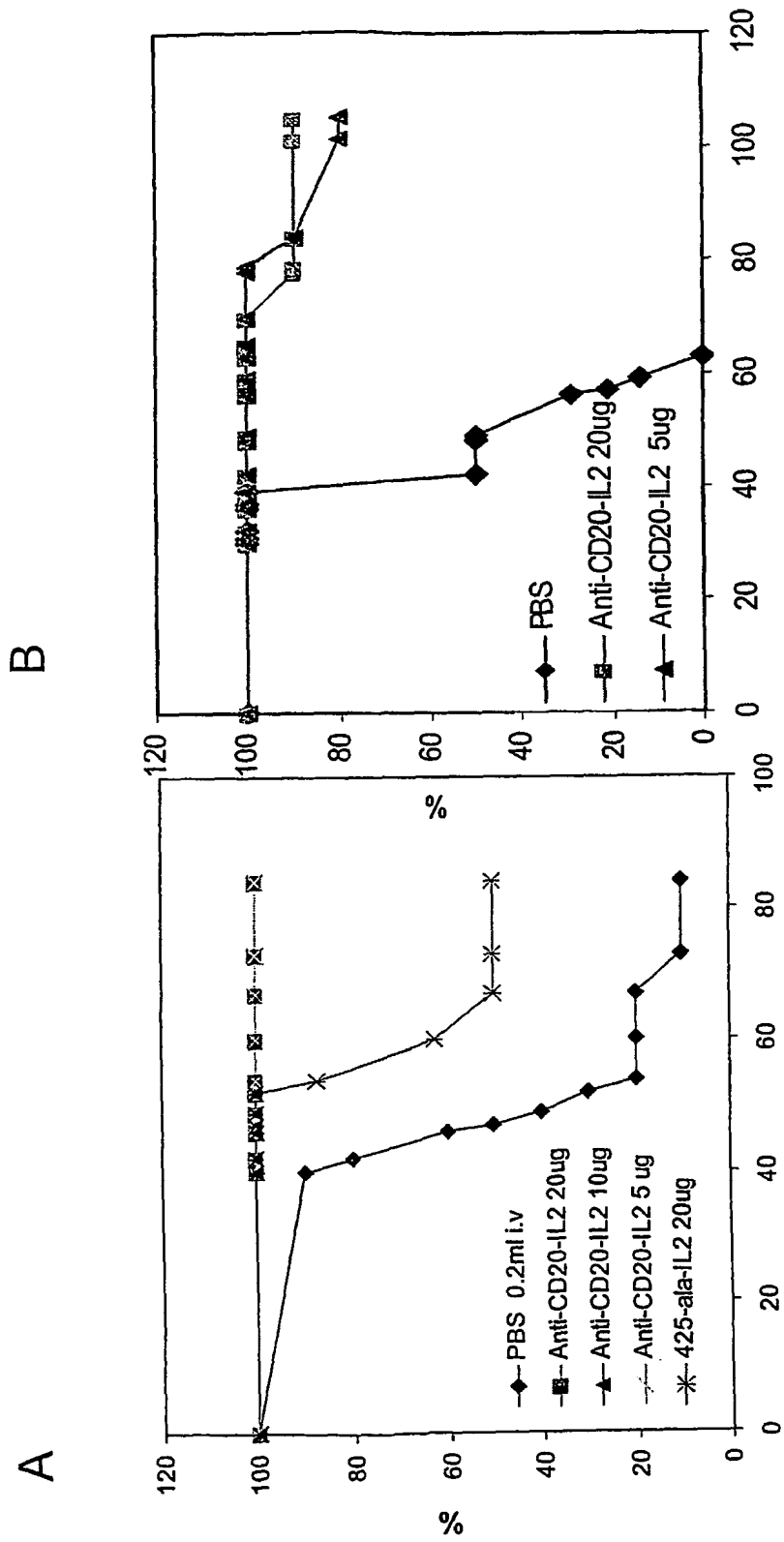
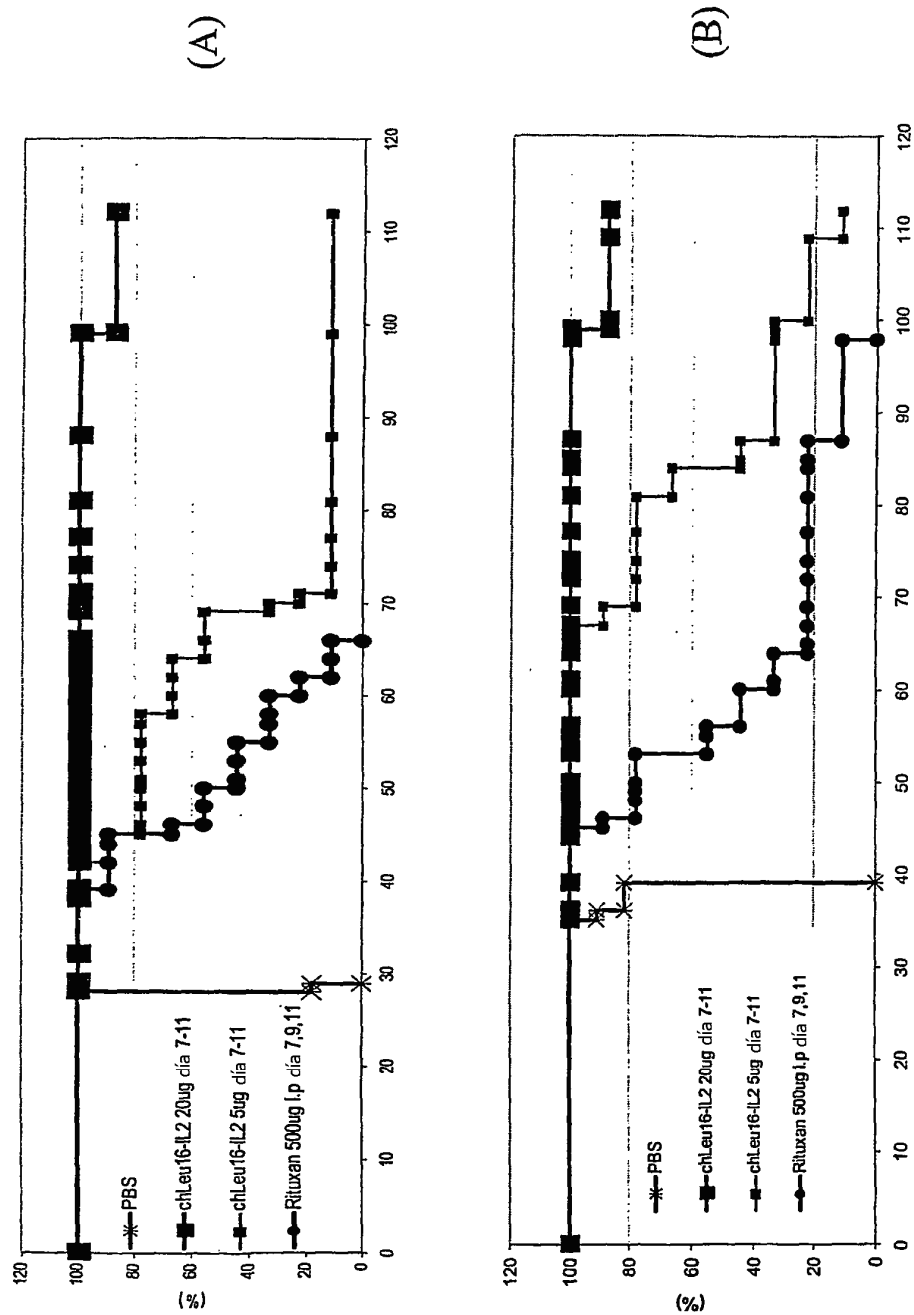
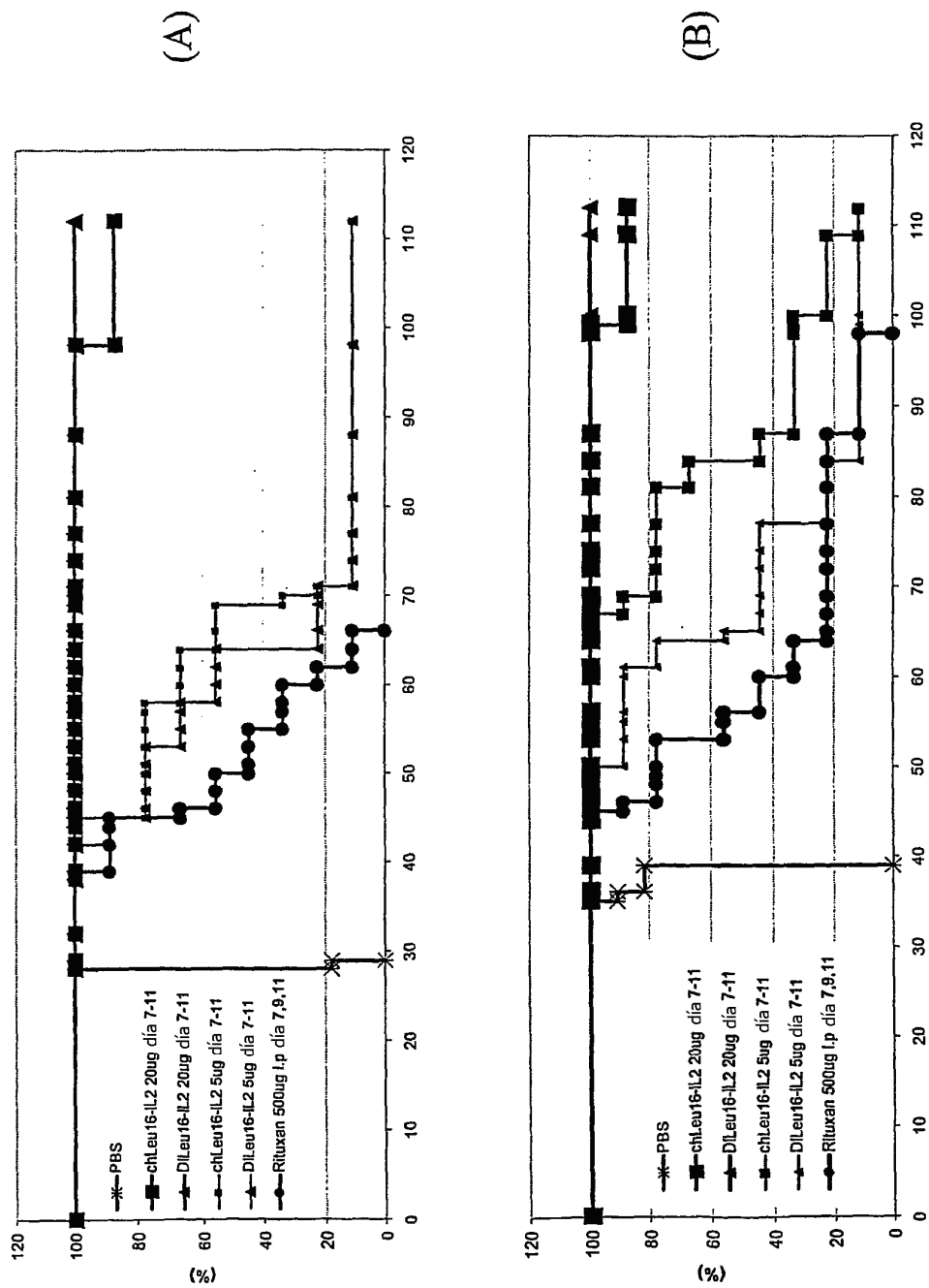


Figure 9



**Figura 11**

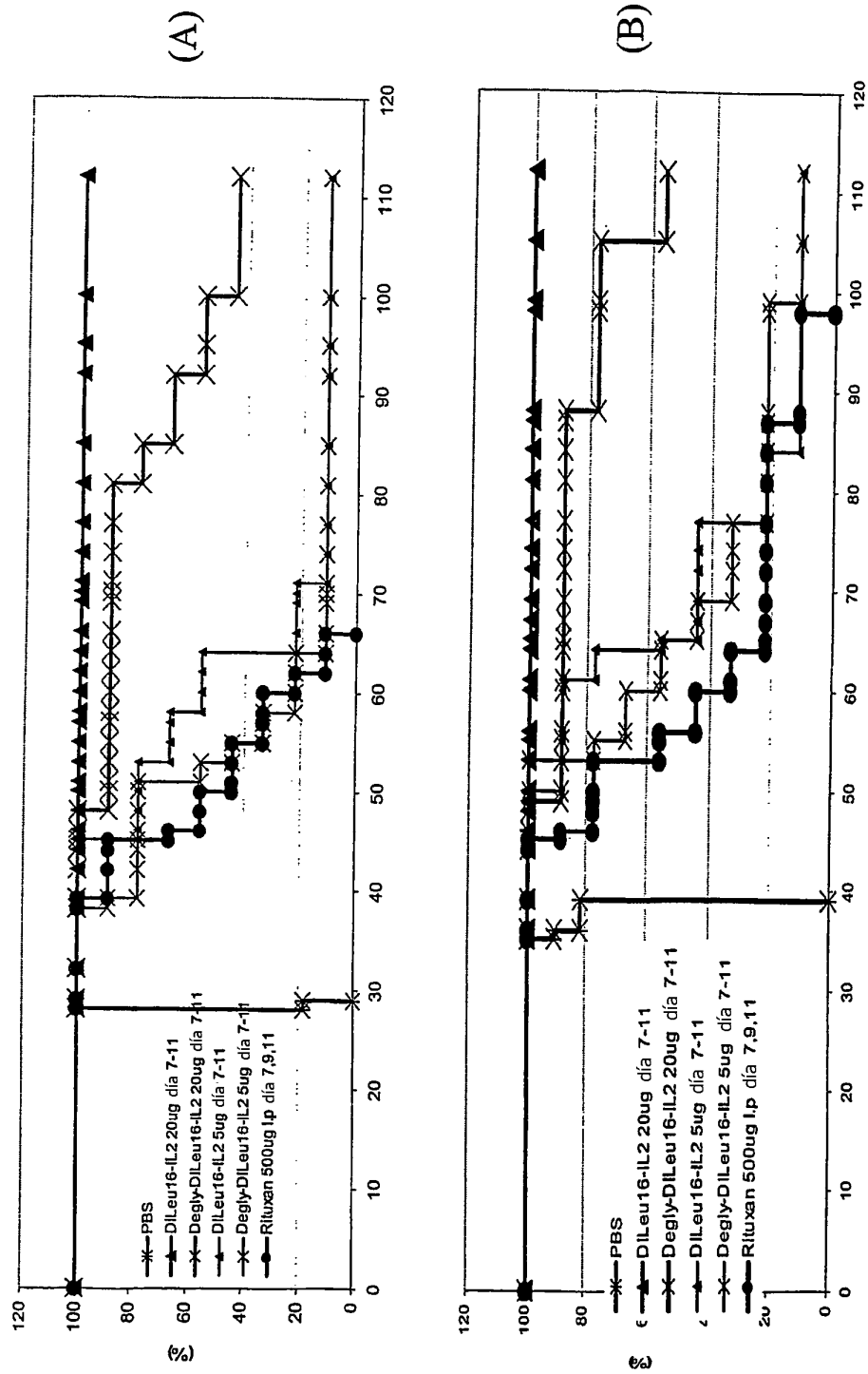


Figura 12

Figura 13

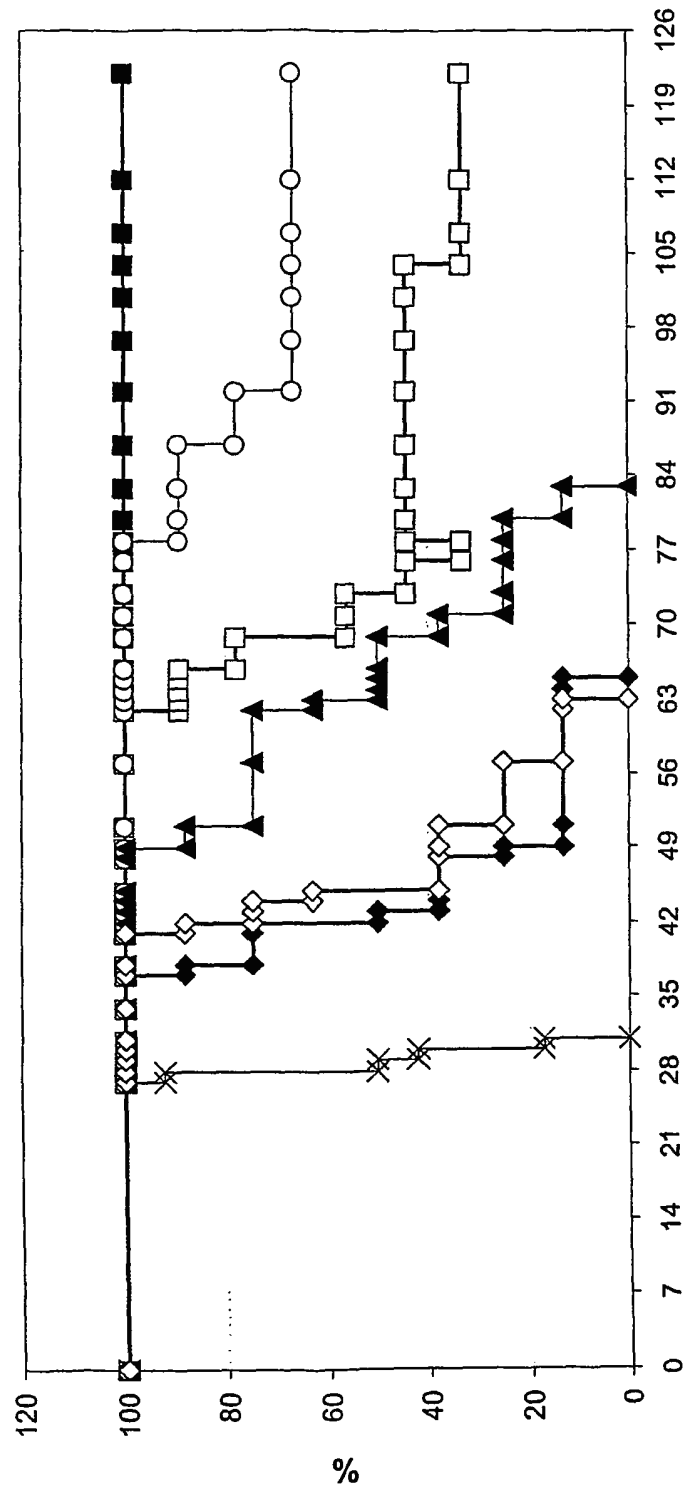


Figura 14

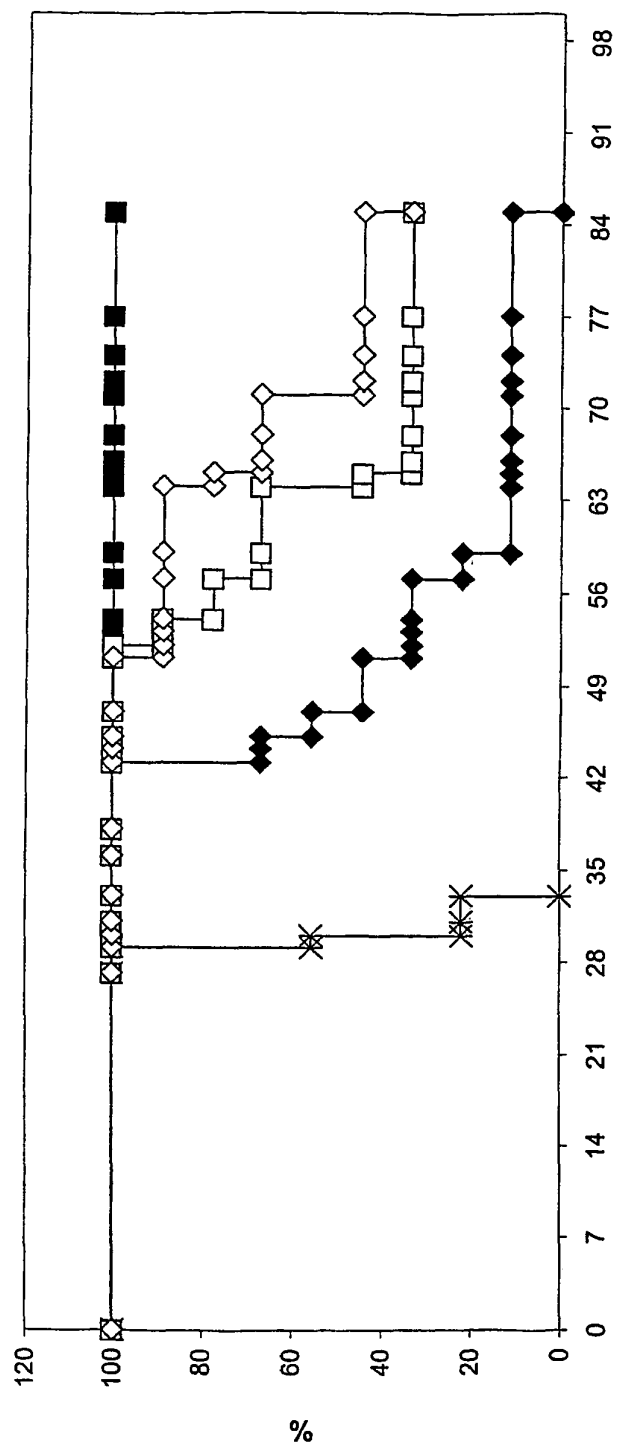
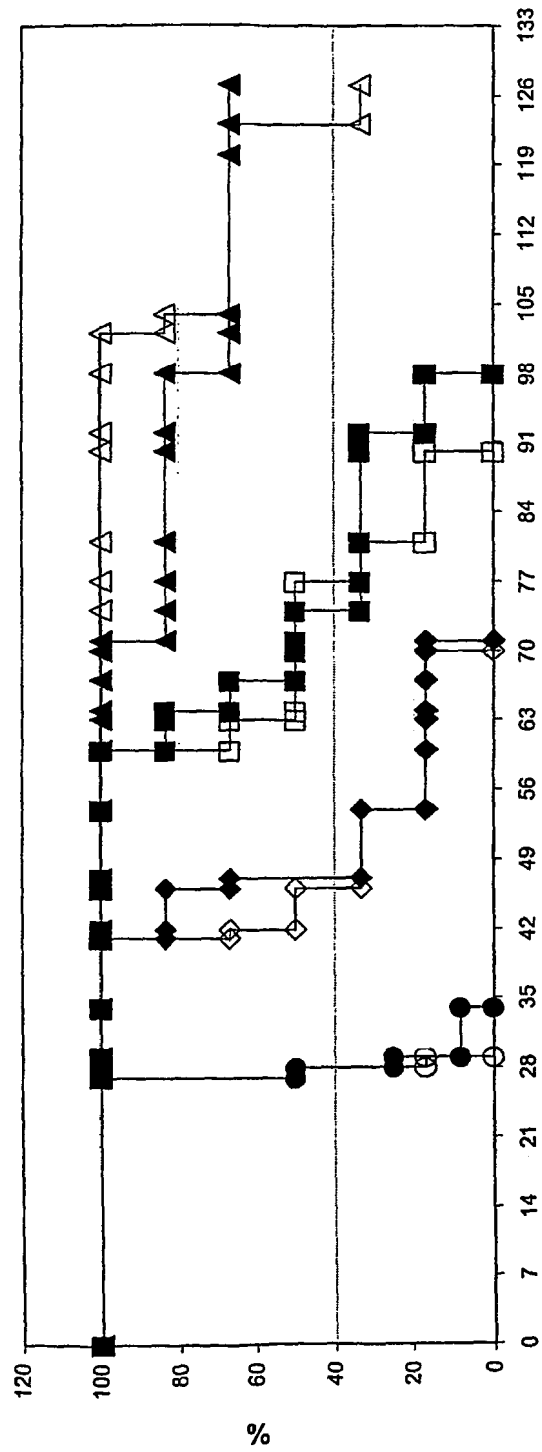


Figura 15



Secuencias de cadena pesada de anticuerpos anti-CD20

Secuencias de cadena ligera de anticuerpos anti-CD20

Secuencia de cadena ligera de anticuerpos anti-CD20		1	50
2B8VK	QIVLSQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSVSYIHWFOQKPGSSPKPWIYAT		
2B8VKA	QIVLSQSPAIITASPGEKVTMTCRASTSAS ¹ YIHWFOQKPTSSSPKPWIYAT		
2B8VKB	QIVLSQSPAIITASPGEKVTMTCRASTSVSYIHWFOQKPTSSSPKPWIYAT		
2B8VKC	QIVLSQSPAIITASPGEKVTMTCRASTSVSYIHWFOQKPGSSPKPWIYAT		
2B8VKD	QIVLSQSPAIITASPGEKVTMTCRASSSVSYIHWFOQKPGSSPKPWIYAT		
Leu16VK	DIVLTQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSVNYMDWYQKKPGSSPKPWIYAT		
Leu16VKZ	DIVLTQSPAIITASPGEKVTMTCRASSSVNYMDWYQKKPGSSPKPWIYAT		
1H4 VK	QIVLSQSPTILSASPGEKVTMTCRASSSVSYMDWYQKPGSSPKPWIYAT		
		51	100
2B8VL	SNLASGVPVRFSGSGSGTSS ² SLTISRVEAEDAATYYCQOWTSNPPTFGGG		
2B8VKA	SNLASGVP ³ SRFSGSGSGT ⁴ YSMTISSLEAEDAATYYCQOWTSNPPTFGGG		
2B8VKB	SNLASGVP ³ SRFSGSGSGT ⁴ YSMTISSLEAEDAATYYCQOWTSNPPTFGGG		
2B8VKC	SNLASGVP ³ SRFSGSGSGT ⁴ YSMTISSLEAEDAATYYCQOWTSNPPTFGGG		
2B8VKD	NLASGVP ³ SRFSGSGSGT ⁴ YSMTISSLEAEDAATYYCQOWTSNPPTFGGG		
Leu16VK	NLASGVPARFSGSGSGTSS ² SLTISRVEAEDAATYYCQOWSFNPPTFGGG		
Leu16VKZ	SNLASGVP ³ SRFSGSGSGT ⁴ YSMTISSLEAEDAATYYCQOWSFNPPTFGGG		
1H4 VK	SNLASGVPARFSGSGSGTSS ² SLTISRVEAEDAATYYCQOWISNPPTFGAG		
		101	
2B8VL	TKLEIK		
2B8VKA	TKLEIK		
2B8VKB	TKLEIK		
2B8VKC	TKLEIK		
2B8VKD	TKLEIK		
Leu16VK	TKLEIK		
Leu16VKZ	TKLEIK		
1H4 VK	TKLELK		

Figura 17

SEQ ID NO. 1 – Región V de cadena pesada del anticuerpo 2B8

QVQLQQPGAELVKAGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGRGLEWIGAIYPGNGDTSYNQKFKG
KATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARSTYYGGDTYFNVWGAGTTTVTVSA

SEQ ID NO. 2 – Región V de cadena pesada VhC

QVQLQQPGAELKKPGASVKVSKASGYTFTSYNMHWVKQTPGRGLEWTGAIYPGNGDTSYNQKFKG
KTTLTADKSSSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARSTYYGGDWYFNVWGAGTTTVTVSA

SEQ ID NO. 3 – Región V de cadena pesada VhD

QVQLQQPGAELKKPGASVKVSKASGYTFTSYNMHWVKQTPGRGLEWIGAIYPGNGDTSYNQKFKG
KTTLTADKSSSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARSTYYGGDWYFNVWGAGTTTVTVSA

SEQ ID NO. 4 – Región V de cadena ligera del anticuerpo 2B8

QIVLSQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSVSYIHWFQKPGSSPKPWIYATSNLASGVFVRFSGSGS
GTSYSLTISRVEAEDAATYYCQWTSNPPTFGGGTKLEIK

SEQ ID NO. 5 – Región V de cadena ligera Vka

QIVLSQSPAIITASPGEKVTMTCRASTSVSYIHWFQKPTSSPKPWIYATSNLASGVPSRFSGSGS
GTTYSMTISSLEAEDAATYYCQWTSNPPTFGGGTKLEIK

SEQ ID NO. 6 – Región V de cadena ligera VkB

QIVLSQSPAIITASPGEKVTMTCRASTSVSYIHWFQKPTSSPKPWIYATSNLASGVPSRFSGSGS
GTTYSMTISSLEAEDAATYYCQWTSNPPTFGGGTKLEIK

SEQ ID NO. 7 – Región V de cadena ligera Vkc

QIVLSQSPAIITASPGEKVTMTCRASTSVSYIHWFQKPGSSPKPWIYATSNLASGVPSRFSGSGS
GTTYSMTISSLEAEDAATYYCQWTSNPPTFGGGTKLEIK

SEQ ID NO. 8 – Región V de cadena ligera Vkd

QIVLSQSPAIITASPGEKVTMTCRASSSVSYIHWFQKPGSSPKPWIYATSNLASGVPSRFSGSGS
GTTYSMTISSLEAEDAATYYCQWTSNPPTFGGGTKLEIK

Figura 17 (continuación)

SEQ ID NO. 9 – Región V de cadena pesada del anticuerpo Leu-16

EVQLQQSGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGQGLEWIGA
IYPGNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSADYYCARSN
YYGSSYWFFDVWGAGTTTVTVSS

SEQ ID NO. 10 – Región V de cadena pesada VhY

EVQLQQSGAELKKPGASVKVSCASGYTFTSYNMHWVKQTPGQGLEWIGA
IYPGNGDTSYNQKFKGKTTLTADKSSSTAYMELSSLRSED^YAVYYCARSN
YYGSSYWFFDVWG^TGT^TTVTVSS

SEQ ID NO. 11 – Región V de cadena ligera del anticuerpo Leu-16

DIVLTQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSVNYMDWYQKKPGSSPKPWIYAT
SNLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISRVEAEDAATYYCQQWSFNPPTFGGG
TKLEIK

SEQ ID NO. 12 – Región V de cadena ligera VLZ

DIVLTQSPAII^TASPGEKVTMTCRASSSVNYMDWYQKKPGSSPKPWIYAT
SNLASGVPS^RRFSGSGSGT^TYSMT^ISS^LEAEDAATYYCQQWSFNPPTFGGG
TKLEIK

SEQ ID NO. 13 - Región V de cadena pesada del anticuerpo 1H4

1H4 VH QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKTSGYTFTSYNVHWVKQTPGQGLEWIGA
1H4 VH IYPGNGDTSFNQKFKGKATLTADKSSSTVYMQLSSLTSEDSAVYYCARSN
1H4 VH YYGSSYVWFFDVWGAGTTGTGSS

SEQ ID NO. 14 - Región V de cadena ligera del anticuerpo 1H4

QIVLSQSPTILSASPGEKVTMTCRASSSVSYMDWYQKPGSSPKPWIYAT
SNLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISRVEAEDAATYYCQQWISNPPTFGAG
TKLELK

SEQ ID NO. 15 – Un primer segmento de la región V de cadena pesada de un par de región V
anti-CD20

SGAELKKPGAS

- 60 -

Figura 17 (continuación)

SEQ ID NO. 16 – Un segundo segmento de la región V de cadena pesada de un par de región V anti-CD20

VSCKASGYT

SEQ ID NO. 17 – Un tercer segmento de la región V de cadena pesada de un par de región V anti-CD20

LEWTGAIY

SEQ ID NO. 18 – Un cuarto segmento de la región V de cadena pesada de un par de región V anti-CD20

YNQKFKGKT

SEQ ID NO. 19 – Un quinto segmento de la región V de cadena pesada de un par de región V anti-CD20

FKGKTTLTA

SEQ ID NO. 20 – Un sexto segmento de la región V de cadena pesada de un par de región V anti-CD20

YMELSSLRS

SEQ ID NO. 21 – Un séptimo segmento de la región V de cadena pesada de un par de región V anti-CD20

SSLRSEDVAV

SEQ ID NO. 22 – Un primer segmento de la región V de cadena ligera de un par de región V anti-CD20

DWGTGTTVT

SEQ ID NO. 23 – Un segundo segmento de la región V de cadena ligera de un par de región V anti-CD20

IITASPGEKV

SEQ ID NO. 24 – Un tercer segmento de la región V de cadena ligera de un par de región V anti-CD20

CRASTSASY

SEQ ID NO. 25 – Un cuarto segmento de la región V de cadena ligera de un par de región V anti-CD20

QQKPTSSP

Figura 17 (continuación)

SEQ ID NO. 26 – Un quinto segmento de la región V de cadena ligera de un par de región V anti-CD20
LASGVPSRF

SEQ ID NO. 27 – Un sexto segmento de la región V de cadena ligera de un par de región V anti-CD20
FSGSGSGTT

SEQ ID NO. 28 – Un séptimo segmento de la región V de cadena ligera de un par de región V anti-CD20
YSMTISSLE

SEQ ID NO. 29
CEPANPSEKNPSTQYC

SEQ ID NO. 30
MSCKASGYT

SEQ ID NO. 31
YNQKFKGKA

SEQ ID NO. 32
FKGKATLTA

SEQ ID NO. 33
YMLSSLRS

SEQ ID NO. 34
ILSASPGEKV

SEQ ID NO. 35
LASGVPVARF

SEQ ID NO. 36
FSGSGSGTS

Figura 17 (continuación)

SEQ ID NO. 37

YSLTISRVE

SEQ ID NO. 38

CEPSNSSEKNSPSTQYC

SEQ ID NO. 39.

Secuencia de ADN que codifica la cadena ligera madura de Leu16, que comprende Leu16VK
gacatcgttctgacccagtcctccagcaatcttgtctgcatctccaggggagaagggtcaccatga
cctgcagagccagctcaagtgtaaattacatggactgggtaccagaagaagccagggtcctcccc
caaacccttgatttatgccacatccaacctggcttctggagtccttctcgcttctctggcagt
gggtctgggacctcttactctctcacaatcagcagagtcgaggctgaagatgctgccacttatt
actgccagcagtgaggcttcaaccacccacgttcggtgggtgggaccaagctggagatcaaacg
taagtggatcccgcaattctaaactctgagggggtcggatgacgtggccattctttgcctaaag
cattgagtttactgcaaggctcagaaaagcatgcaaagccctcagaatggctgcaaagagctcca
acaaaacaatttagaactttattaaggaataggggggaagctagggaagaaactcaaaacatcaag
attttaaacacgcttcttgggtctccttgctataattatctgggataagcatgctgttttctgtc
tgtccctaacatgccctgtgattatccgcaaacaacacaccaagggcagaactttgttactta
aacaccatcctgtttgcttctttcctcaggaactgtgggtgcaccatctgtcttcatcttcccg
ccatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgttgtgtgcctgctgaataaacttctatc
ccagagaggccaaagtacagtgggaaggtggataacgccctccaatcgggtaactcccaggagag
tgtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcacctgacgctgagcaaa
gcagactacgagaaaacaaaagtctacgcctgcgaagtaccccatcagggcctgagctcgcccc
tcacaaagagcttcaacaggggagagtgttag

SEQ ID No 40

Secuencia de ADN que codifica una variante empobrecida en epítipo de la cadena ligera
madura de Leu16, que comprende Leu16 VKZ

Gacattgttctcaccagtcctccagcaatcatcacagcatctccaggggagaagggtcacaatga
cttgcagggccagctcaagtgtaaactacatggactgggtaccagaagaagccagggtcctcccc
caaacccttgatttatgccacatccaacctggcttctggagtccttctcgcttcagtggcagt
gggtctgggactacttactctatgaccatcagcagcctcgaggctgaagatgctgccacttatt
actgccagcagtgaggcttcaaccacccacgttcggaggggggaccaagctggaaatcaaacg
taagtggatcccgcaattctaaactctgagggggtcggatgacgtggccattctttgcctaaag
cattgagtttactgcaaggctcagaaaagcatgcaaagccctcagaatggctgcaaagagctcca
acaaaacaatttagaactttattaaggaataggggggaagctagggaagaaactcaaaacatcaag
attttaaacacgcttcttgggtctccttgctataattatctgggataagcatgctgttttctgtc
tgtccctaacatgccctgtgattatccgcaaacaacacaccaagggcagaactttgttactta
aacaccatcctgtttgcttctttcctcaggaactgtgggtgcaccatctgtcttcatcttcccg
ccatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgttgtgtgcctgctgaataaacttctatc
ccagagaggccaaagtacagtgggaaggtggataacgccctccaatcgggtaactcccaggagag
tgtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcacctgacgctgagcaaa

Figura 17 (continuación)

gcagactacgagaaacacaaagtctacgcctgcgaagtaccccatcagggcctgagctcgcccc
tcacaaagagcttcaacaggggagagtgttag

SEQ ID No 41.

Secuencia de ADN que codifica la cadena pesada madura de Leu16, que comprende Leu16VH
gagggtccagctccagcagctctggagctgagctgggtgaagcctggggccttcagtgaagatgtcct
gcaaggcttctggatacacattcactagttataatatgcactgggttaaagcagacacctggaca
gggcctggaatggattggagctatttatccaggaaatggtgatacttcctacaatcagaagttc
aagggcaagggcacactgactgcagacaaatcctccagcacagcctacatgcagctcagcagcc
tgacatctgaagactctgctgactattactgtgcgaggagtaactactacggtagtagctactg
gttcttcgatgtctggggcgcagggaccacggtcaccgtctcttcaggtaagtaagcttttctg
gggcaggccagcctgaccttggctttggggcagggaggggggctaagggtgaggcaggtggcgcc
agccaggtgcacacccaatgcccatgagccagacactggacgctgaacctcgcgagacagttaa
gaacccaggggctctgccccctggggccagctctgtcccacaccgcggtcacatggcaccacc
tctcttgagcctccaccaagggcccatcggtcttccccctggcaccctcctccaagagcacct
ctgggggcacagcggccctgggctgcctgggtcaaggactacttccccgaaccgggtgacggtgtc
gtggaactcaggcgccctgaccagcggcgtgcacaccttccccggtgtcctacagtcttcaggga
ctctactccctcagcagcgtgggtgaccgtgccctccagcagcttgggcacccagacctacatct
gcaacgtgaatcacaagcccagcaacaccaagggtggacaagagagttggtagagggccagcaca
gggagggaggggtgtctgctggaagccaggctcagcgtcctgctgctggacgcatccccggtatgc
agtcccagtcagggcagcaaggcagggcccgctgctgcctcttccccggaggcctctgccccgc
ccactcatgctcagggagaggggtcttctggcttttccccaggctctgggcaggcacagggtag
gtgccccctaacccaggccctgcacacaaaggggcaggtgctgggctcagacctgccaagagcca
tatccgggaggaccctgccccctgacctaaagccacccccaaaggccaaactctccactccctcag
ctcggacaccttctctcctccagattccagtaactcccaatcttctctctgcagagcccaaat
cttgtgacaaaactcacacatgccaccgtgccaggtaagccagccaggcctcgccctccag
ctcaaggcgggacaggtgccctagagttagcctgcatccagggacaggccccagccgggtgctga
cagctccacctccatctcttctcagcacctgaactcctggggggaccgtcagttcttctctc
cccccaaaacccaaggacacctcatgatctccgggacccctgaggtcacatgcgtgggtgg
acgtgagccacgaagacctgaggtcaagttcaactggtagctggacggcggtggaggtgcataa
tgccaagacaaagccgcgggagggagcagtaaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcacc
gtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtaacaagtgaagggtctccaacaaagccctcc
cagcccccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggtgggaccgtgggggtgcgagggccaca
tggaacagagggcggtcgggccacctctgacctgagagtgaaccgtgtaccaacctctgtccc
tacagggcagccccgagaaccacaggtgtacacctgcccccatcccgaggagatgaccaag
aaccaggtcagcctgacctgctgggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtggg
agagcaatgggcagccgggagaacaactacaagaccacgcctcccgtgctggactccgacggctc
cttcttctctatagcaagctcacctgggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctca
tgctcgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtccccgg
gtaaatga

SEQ ID No 42

Secuencia de ADN que codifica una variante empobrecida en epitopo de la cadena pesada
madura de Leu16, que comprende Leu16 VHY

Gagggtacaactgcagcagctctggggctgagctgaagaagcctggggcctcagtgaagggtgtcct
gcaaggcttctggctacacatttaccagttacaatatgcactgggtaaaacagacacctgggtca
gggcctggaatggattggagctatttatccccgaaatgggtgatacttcctacaatcagaagttc

Figura 17 (continuación)

aaaggcaagacaacattgactgcagacaaaatcctccagcacagcctacatggaaactcagcagcc
 tgagatctgaggacactgcggtctattactgtgcaagatcgaattactacggcagcagctactg
 gttcttcgatgtctggggcacccgggaccacgggtcacctgtctcttcaggtaagctttctggggca
 ggccaggcctgaccttggctttggggcagggagggggctaaaggtagggcaggtggcgccagcca
 ggtgcacacccaatgcccattgagcccagacactggacgctgaacctcgcgagacagttaagaacc
 caggggcctctgcgccctgggcccagctctgtcccacaccgcggtcacatggcaccacctctct
 tgcagcctccaccaaggggcccatcggtcttccccctggcaccctcctccaagagcacctctggg
 ggcacagcgccctgggctgcctggtcaaggactacttccccgaaccgggtgacggtgtcgtgga
 actcaggcgccctgaccagcggtgcacaccttcccggctgtcctacagtctcaggactcta
 ctccctcagcagcgtggtgacctgacctccagcagcttgggcacccagacctacatctgcaac
 gtgaatcacaaagcccagcaacaccaagggtgggacaagagagtgggtgagaggccagcacaggag
 ggagggtgtctgctggaagccaggctcagcgctcctgctggacgcatcccggctatgcagtc
 cagtcaggggcagcaaggcaggccccgtctgctcttcaaccggaggcctctgcccgcacct
 catgctcaggggagagggtcttctggctttttcccaggctctgggcaggcacaggctagggtgcc
 cctaaccaggccctgcacacaaaggggcaggtgctgggctcagacctgccaagagccatatcc
 gggaggacctgcccctgacctaaagcccaccccaaaggccaaactctccactccctcagctcgg
 acaccttctctcctcccagattccagtaactcccaatcttctctctgcagagcccaaatcttgt
 gacaaaactcacacatgcccacccgtgccaggtaagccagcccaggcctcgccctccagctcaa
 ggcgggacaggtgccctagagtgcctgcatccaggggacagggcccagccgggtgctgacacgt
 ccacctccatctcttctcagcacctgaactcctggggggacgctcagctcttctcttcccccc
 aaaacccaaggacacctcatgatctcccggaacctgaggtcacatgcgtggtggtgggacgtg
 agccacgaagacctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggagggtgcataatgcc
 agacaaaagccgaggaggagcagtaaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcacctcct
 gcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgaaggcttccaacaaagccctccagcc
 cccatcgagaaaacctctccaagccaaagggtgggacccgtgggggtgcgagggccacatggac
 agaggccggctcgccccacctctgcccctgagagtgaccgctgtaccaacctctgtccctacag
 ggcagccccgagaaccacaggtgtacacctgcccccatcacgggaggagatgaccaagaacca
 ggtcagcctgacctgctgggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgaggagc
 aatgggcagccggagaaacaactacaagaccagcctcccgtgctggactccgacggctccttct
 tctctatagcaagctcacctggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctc
 cgtgatgcatgaggctctgcacaacctacacgcagaagagcctctccctgtccccgggtaaa
 tga

SEQ ID No 43

Secuencia de ADN que codifica una proteína de fusión de una variante empobrecida en epitopo de la cadena pesada madura de Leu16, que comprende Leu16 VHY y la citosina IL2

Gaggtacaactgcagcagctctggggctgagctgaagaagcctggggcctcagtgaaagggtgtcct
 gcaaggcttctggctacacatttaccagttacaatatgcactgggtaaaacagacacctggtca
 gggcctggaatggattggagctatattatcccggaaatggtgatacttctacaatcagaagttc
 aaaggcaagacaacattgactgcagacaaaatcctccagcacagcctacatggaaactcagcagcc
 tgagatctgaggacactgcggtctattactgtgcaagatcgaattactacggcagcagctactg
 gttcttcgatgtctggggcacccgggaccacgggtcacctgtctcttcaggtaagctttctggggca
 ggccaggcctgaccttggctttggggcagggagggggctaaaggtagggcaggtggcgccagcca
 ggtgcacacccaatgcccattgagcccagacactggacgctgaacctcgcgagacagttaagaacc
 caggggcctctgcgccctgggcccagctctgtcccacaccgcggtcacatggcaccacctctct
 tgcagcctccaccaaggggcccatcggtcttccccctggcaccctcctccaagagcacctctggg
 ggcacagcgccctgggctgcctggtcaaggactacttccccgaaccgggtgacggtgtcgtgga
 actcaggcgccctgaccagcggtgcacaccttcccggctgtcctacagtctcaggactcta
 ctccctcagcagcgtggtgacctgacctccagcagcttgggcacccagacctacatctgcaac

Figura 17 (continuación)

gtgaatcacaagcccagcaacaccaaggtggacaagagagtgggtgagaggccagcacagggag
 ggaggggtgtctgtggaagccaggtcagcgctcctgcctggaogcatcccggctatgcagtcc
 cagtcaggggcagcaaggcaggccccgtctgcctcttcacccggaggcctctgcccgcctccact
 catgctcaggagaggggtcttctggctttttccccaggctctgggcaggcacaggctaggtgcc
 cctaaccaggccctgcacacaaaggggaggtgctgggctcagacctgccaagagccatatcc
 gggaggaccctgcccctgacctaaagccacccccaaaggccaaactctccactccctcagctcgg
 acaccttctctcctcccagattccagtaactcccaatcttctctctgcagagcccaaactctgt
 gacaaaactcacacatgcccacogtggccaggtaagccagcccaggcctcgccctccagctcaa
 ggcgggacaggtgcccctagagtagcctgcacccagggaacggccccagccgggtgctgacacgt
 ccacctccatctcttctcagcacctgaactcctggggggaccgtcagctcttctcttcccccc
 aaaacccaaggacaccctcatgatctcccgaccctgaggtcacatgcgtgggtggacgtg
 agccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcggtggaggtgcataatgcc
 agacaaagccgcgggaggagcagtaaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcct
 gcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgaaggctctccaacaaagccctcccagcc
 cccatcgagaaaaccatctccaaagccaaaggtgggacccgtgggggtgagaggccacatggac
 agaggccgggtcgggccacccctctgcctgagagtgaccgctgtaccaacctctgtccctacag
 ggcagccccgagaaccacaggtgtacacctgcccccatcacgggaggagatgaccaagaacca
 ggtcagcctgacctgcctggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgggagagc
 aatgggcagccgggagaacaactacaagaccagcctcccgtgctggactccgacggctccttct
 tctctatagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctc
 cgtgatgcatgaggtctgcacaaccactacacgcagaagagcgccaccgcgacccccgggtgca
 gccccaaacttcaagttctacaaagaaaaacacagctgcaactggagcatctcctgctggatctcc
 agatgattctgaatggaattaacaactacaagaatcccaaactcaccaggatgctcacattcaa
 gttctacatgcccagaaggccacagagctcaaacatctccagtgtctagaggaggaaactcaaa
 cctctggaggaagtgtataacctcgctcagagcaaaaaacttccacttaagacctagggaacttaa
 tcagcaatatcaacgtaatatgttctggaactaaagggatccgaaacaacattcatgtgtgaata
 tgctgatgagacagcaaccattgtagaatttctaacagatggattaccttttgtcaaagcatc
 atctcaacactaacttga