



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 311 452**

51 Int. Cl.:

C07K 16/00 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

C07K 16/46 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 35/02 (2006.01)

A61P 37/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **00913253 .1**

96 Fecha de presentación : **28.01.2000**

97 Número de publicación de la solicitud: **1157042**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **28.11.2001**

54 Título: **Producción de anticuerpos tetravalentes.**

30 Prioridad: **28.01.1999 US 238741**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.02.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.02.2009

73 Titular/es: **Biogen Idec Inc.**
14 Cambridge Center
Cambridge, Massachusetts 02142, US

72 Inventor/es: **Braslawsky, Gary, Ronald;**
Hanna, Nabil;
Hariharan, Kandasamy;
Labarre, Michael, J. y
Huynh, Tri, B.

74 Agente: **Elzaburu Marquez, Alberto**

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).

DESCRIPCIÓN

Producción de anticuerpos tetravalentes.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere, en general, a un procedimiento de preparación de dímeros de anticuerpos biológicamente activos, y a una composición farmacéuticamente aceptable que contiene tales dímeros. Estos dímeros pueden estar compuestos por dos moléculas de anticuerpos unidas mediante un enlace disulfuro, reducible, o un enlace tioéter no reducible. Los dímeros de la presente invención comprenden dos moléculas de anticuerpos diferentes que poseen especificidad de unión para dos antígenos diferentes (heterodímeros). Los dímeros de anticuerpos objeto de la invención son útiles para inducir el hiper-entrecruzamiento de antígenos de la membrana. La presente invención se refiere, además, al uso de dímeros de anticuerpos biológicamente activos para la muerte preferencial o inhibición de poblaciones celulares seleccionadas, en el tratamiento de enfermedades tales como el cáncer y trastornos autoinmunitarios.

Fundamento de la invención

Una vez se pensó que los anticuerpos monoclonales eran el modo ideal de hacer diana en tejidos malignos, por liberar un agente destructor al tiempo que dejar intacto los tejidos sanos. Sin embargo, su potencial clínico es limitado debido a la necesidad de enlazar covalentemente el agente mortal al anticuerpo monoclonal. Así pues, en un esfuerzo para aliviar tales limitaciones, se desarrollaron anticuerpos biespecíficos, que permanecen bivalentes, pero que son específicos para una célula diana sobre uno de los brazos del anticuerpo y un agente mortal sobre el otro brazo. El agente mortal puede ser una toxina, un fármaco, un radioisótopo quelado o, más probablemente, un célula efectora citotóxica.

El documento WO 96/14339 describe procedimientos para conjugar un anticuerpo a una sustancia tal como un radionucleido, una enzima, un fármaco o una citotoxina por medio de un resto de cisteína expuesto sobre la superficie del anticuerpo.

El documento WO 99/66951 describe anticuerpos biespecíficos y fragmentos de anticuerpos que poseen por lo menos un brazo capaz de unirse a un tejido considerado diana y por lo menos otro brazo que se une específicamente a un conjugado capaz de ser diana.

Los anticuerpos monoclonales pueden poner de manifiesto, también, actividad terapéutica frente a células específicas, por ejemplo, tejidos malignos, basada en la interacción de la parte Fc de la cadena pesada del anticuerpo con otros componentes del sistema inmunitario, tales como la cascada del complemento o por unión a los receptores Fcy o diversos tipos de células efectoras citotóxicas.

Otros medios de llevar a cabo muerte celular comprende inducir el entrecruzamiento de antígenos de la membrana. Estudios previos han indicado que el entrecruzamiento con anticuerpos de marcadores de células B de la membrana (por ejemplo, la IgM de la superficie, Valentine *et al.*, *Eur. J. Immunol.* 22:3141 (1992); y la clase II de MHC, Newell *et al.*, *PNAS* 90:10459 (1993) puede inhibir la proliferación de células B malignas y en muchos casos inducir apoptosis (por ejemplo, la muerte celular programada) *in vitro*.

Shan *et al.* (*Blood* 91:1644-1653) han demostrado que el hiper-entrecruzamiento del antígeno CD20, usando el anticuerpo murino IF5 entrecruzado con una IgG de cabra anti-ratón, inhibía, *in vitro*, el crecimiento de diversas líneas celulares del linfoma B humano. Resultados similares han sido publicados recientemente tanto para el CD19 como para el CD22 cuando el entrecruzamiento de un MAb unido a la membrana era amplificado con una anti- IgG de ratón (Chaouchi *et al.*, *J. Immunol.* 154:3096 (1995)).

Puede ser posible que el hiper-entrecruzamiento de estos marcadores superficiales de la membrana pudieran aumentar las actividades antitumorales existentes de MAbs tales como el C2B8, un anticuerpo monoclonal quimérico específico para el antígeno CD20, y aumentar la eficacia terapéutica. Por consiguiente, las moléculas que pueden inducir muerte celular en una forma farmacéuticamente aceptable, podrían proporcionar, potencialmente, un agente terapéutico atractivo para la inmunoterapia de enfermedades neoplásicas.

Aparentemente, con tal objetivo en mente, Wolff *et al.*, (*Cancer Res.* 53:2560-2565 (1993)) y Ghetie (*PNAS* 94:7509-7514 (1997)) han informado de la síntesis química de varios homodímeros de IgG/IgG para carcinomas asociados con antígenos de superficie (BR96 y HER-2).

Shopes (*Journal of Immunology* 148: 2918-2922 (1992)) describe un método para producir homodímeros de una IgG humana.

Los dímeros de Ghetie incluían también anticuerpos para varios marcadores de células B humanas (CD20, CD19, CD21, CD22). En este enfoque, una parte de la molécula había sido funcionalizada usando un engarce destinado a producir un tiol reactivo sobre el anticuerpo, mientras que la otra parte Ab usaba un engarce para introducir un grupo maleimido. Cuando se purificó partiendo de engarces sin reaccionar y se mezclaron, los dos anticuerpos establecieron

un complejo mediante la formación de un puente de tioéter (no reducible) que enlaza las dos moléculas de IgG, constituyendo una molécula de un anticuerpo tetravalente (C₂H₂)_{2g} de 300 kDa.

Sin embargo, desafortunadamente, los rendimientos del homodímero de IgG de 300 kDa fueron muy bajos (20-25%) y eran similares o inferiores al rendimiento del homodímero de CD19 formado “espontáneamente”, que variaban entre 20 y 30% (Ghetie *et al.*, *PNAS* 94:7509-7514 (1997)). Los geles de la SDS-PAGE reductora del análisis del homodímero purificado mostraron que solamente un pequeño porcentaje estaba enlazado por medio de un puente de tioéter, lo que indica que la mayor parte de los dímeros formados utilizando esta metodología podían haber sido naturales o haberse formado a través de puentes disulfuro. No obstante, la totalidad de los dímeros purificados eran inhibidores del crecimiento, aun cuando se indicaba que solamente el dímero (Her-2) anti-carcinoma y no los homodímeros dirigidos contra los marcadores de células B CD19, CD20, CD21 y CD22, eran apoptóticos. Adicionalmente, el homodímero anti-CD19 fue ensayado en modelos de animal y mostró poseer actividad antitumoral. No obstante, existe la necesidad en la técnica de un método más eficaz para producir homodímeros, en particular homodímeros o heterodímeros capaces de iniciar la apoptosis, por ejemplo, en poblaciones de células B malignas en proliferación.

En la presente invención, se usaron dos anticuerpos monoclonales: un anticuerpo quimérico de ratón/humano específico para el CD20 (C2B8) y un anticuerpo Primatized® específico para el CD23 (p5E8). Las secuencias de los polipéptidos de las cadenas ligera y pesada de las regiones variables de los anticuerpos C2B8 y p5E8 están descritos, respectivamente, en los documentos US 5,736,137 y WO 98/37099. Los linfomas de células B de baja agresividad y agresivos expresan los antígenos de células B CD20 y CD23. El antígeno CD20 es una proteína de la membrana de células B de 35 kDa, no glicosilado, asociado con señalización intracelular, diferenciación de células B y movilización del canal de calcio (Clark *et al.*, *Adv. Cancer Res.* 52:81-149 (1989); Tedder *et al.*, *Immunol Today* 15:450-54 (1994)). El antígeno aparece como un marcador precoz del linaje humano de las células B y se expresa omnipresentemente en diversas densidades de antígeno en células B, tanto normales como malignas. Sin embargo, el antígeno está ausente en poblaciones de células pluripotentes o pre-células B, así como en las células plasmáticas totalmente maduras, constituyendo una buena diana para la terapia por medio de anticuerpos. El CD23 es el receptor de baja afinidad para la IgE. Se ha sugerido que los anticuerpos para CD23 son útiles para tratar respuestas alérgicas e inflamatorias. En efecto, IDEC Pharmaceuticals Inc, el cesionario de esta Solicitud de Patente, tiene una Solicitud pendiente que relaciona el uso de un anticuerpo anti-CD23 del isotipo de la IgG1, para uso terapéutico. De importancia en ella, el CD23 es expresado en células B y en particular por células de linfomas de células B.

Si bien solamente una pequeña fracción del antígeno CD20 está expresada sobre la membrana de la superficie, los MABs que se unen al dominio extracelular han tenido actividades variables en lo referente a promover o inhibir la función de las células B. Por ejemplo, se indicó primitivamente que el MAB 1F5, anti-CD20, activaba las células B en reposo (G₀) a poblaciones en proliferación (G₁/S/G₂) (Clark *et al.*, *PNAS, USA*, 82:1766-70 (1985)). Adicionalmente, Holder *et al.*, (*Eur. J. Immunol.* 25:3160-64 (1995)) han demostrado que el entrecruzamiento del MAB 1F5, del antígeno de superficie CD20 protegía la proliferación de células B tonsulares de experimentar apoptosis (muerte celular programada) *in vitro*. Por el contrario, el anticuerpo B1 anti-CD20 que se une a un epítipo diferente que el 1F5 (Tedder *et al.*, *Immunol. Today* 15:450 (1994)), no era estimulador de poblaciones de células B en reposo (Tedder *et al.*, *Eur. J. Immunol.* 16:881 (1986)).

A pesar de las diferencias de actividad usando poblaciones de células B normales, los MABs murinos anti-CD20 (por ejemplo, los 1F5, B1, B20 y 2H7) no tenían efecto sobre la inhibición del crecimiento de líneas celulares del linfoma humano (CD20+) en proliferación, *in vitro*, pero *in vivo* pusieron de manifiesto inhibición del crecimiento tumoral usando modelos de xenotrasplante en ratón de linfomas humanos (Press *et al.*, *Blood* 69:584-591 (1987); Shan *et al.*, *Blood* 91:1644-1653 (1998); Funakoshi *et al.*, *J. Immunol.* 19:93-101 (1996); Hooijberg *et al.*, *Cancer Res.* 55:840-846 (1995); y Ghetie *et al.*, *PNAS* 94:7509-7514 (1997)). El mecanismo de mediación de la actividad antitumoral permanece sin aclarar claro pero puede ser mediado a través de muerte celular dependiente del complemento (CDC) o muerte celular dependiente de anticuerpos (ADCC), ambas de las cuales son dependientes de la activación de mecanismos de las células huésped a través de la parte Fc del MAB después de la unión de CD20. Sin duda, Funakoshi *et al.*, (*J. Immunol.* 19:93-101 (1996)) ha indicado que la actividad antitumoral de 2H7, *in vivo*, estaba bloqueada cuando el receptor Fc estaba bloqueado o había sido bloqueada con un anticuerpo F(ab)₂.

El MAB quimérico usado en la presente invención (C2B8) ha sido desarrollado en IDEC Pharmaceuticals Corporation para el tratamiento del linfoma humano de células B (Reff *et al.*, *Blood* 83:4350445 (1994)). El C2B8 se originó a partir del anticuerpo murino 2B8 y fue clonado y expresado como un monómero de IgG de 150 kDa en células de Ovario de Hámster Chino. El MAB C2B8 mantiene la región variable del 2B8 murino, copulada a las regiones constantes de la cadena pesada gamma 1 humana y la cadena ligera kappa humana. Al igual que sus contrapartes murinas, el C2B8 no era inhibidor del crecimiento y no induce apoptosis de las líneas celulares del linfoma humano *in vitro*, pero demuestra actividad antitumoral cuando se ensayó *in vivo* usando modelos de xenotrasplantes en animales murinos.

El C2B8 quimérico fija eficazmente el complemento humano, posee fuerte unión de FcR y puede matar eficazmente linfocitos humanos *in vitro* mediante mecanismos tanto dependiente del complemento (CDC), como dependiente de anticuerpos (ADCC) (Reff *et al.*, *Blood* 83:435-445 (1994)). R1 C2B8 era también fuertemente reductor de células B en ensayos clínicos de Fases I/II en el hombre, pero no obstante mostró ser seguro y eficaz con la mayor parte de los efectos secundarios relacionados con la infusión (Maloney *et al.*, *Blood* 84:2457-2466 (1994) y Maloney *et al.*, *JCO* 15 (10):3266 (1997)).

El anticuerpo puso de manifiesto un grado de respuesta global de 48% en pacientes con linfoma de grado bajo o linfoma folicular (McLaughlin *et al.*, *JCO*, en prensa). Sin embargo, el grado de respuesta descendió espectacularmente (34%) en pacientes quimio-resistentes que habían fallado en la respuesta a su último régimen de quimioterapia (McLaughlin *et al.*, *Proc. Am. Soc. Clin. Oncol.* 16:16a (Abstr. 55) (1997)). Adicionalmente, el anticuerpo mostró mala actividad en pacientes con histología de tipo A o con leucemia linfocítica crónica (CLL). Por tanto, subsiste la necesidad de aumentar la eficacia de la inmunoterapia con anticuerpos y, específicamente, usando la terapia con los anticuerpos C2B8 ó anti-CD23, una alta prioridad en el tratamiento de pacientes humanos de leucemia y linfomas. El anticuerpo anti-CD23 puesto de ejemplo en los métodos de esta invención, ha sido desarrollado también por IDEC y es un anticuerpo anti-CD23 primatizado del isotipo de IgG1.

Objetos de la invención

Basado en lo anteriormente expuesto, un objeto de la invención es proporcionar nuevos agentes terapéuticos, en particular dímeros de anticuerpos, para usar en terapias con anticuerpos.

Más específicamente, es un objeto de la invención proporcionar nuevos dímeros de anticuerpos que poseen especificidad para el antígeno CD23 y el antígeno CD20.

Es un objeto de la invención más específico, proporcionar un método eficaz para producir dímeros de anticuerpos estables, en especial dímeros de IgG/IgG.

Es otro objeto de la invención proporcionar nuevas terapias que llevan consigo la administración de dímeros de anticuerpos.

Es un objeto de la invención más específico, proporcionar nuevos métodos para tratar el cáncer y trastornos autoinmunitarios o alérgicos, mediante la administración de dímeros de anticuerpos.

Es otro objeto de la invención proporcionar nuevas composiciones terapéuticas que contienen dímeros de anticuerpos, en particular para el tratamiento de cánceres, trastornos alérgicos y trastornos autoinmunitarios.

Descripción breve de las figuras

La Figura 1 contiene la secuencia de DNA y la secuencia de aminoácidos predichas, de una cadena ligera "dimérica" 1 de anti-CD20 (versión 1).

La Figura 2 contiene la secuencia de DNA y la secuencia de aminoácidos predichas, de una cadena pesada "dimérica" de anti-CD20 (versión 1).

La Figura 3 es un mapa esquemático de una construcción de expresión que se usa para expresar los anticuerpos objeto.

La Figura 4 contiene estructuras del homodímero de C2B8 (α CD20) y del heterodímero de C2B8/p5E8 (α CD20/ α CD23).

La Figura 5 contiene resultados de SDS/PAGE que comparan homodímeros de C2B8 (-s-s-) y heterodímeros de C2B8/p5E8 (-s-) con el material de partida.

La Figura 6 contiene resultados de SDS/PAGE que comparan homodímeros de C2B8 (-s-s- y -s-) y heterodímeros de C2B8/p5E8 con el material de partida.

La Figura 7 contiene el análisis por HPLC de homodímeros de C2B8.

La Figura 8 contiene el análisis por HPLC de heterodímeros de C2B8/p5E8 (dímero α CD20/ α CD23).

La Figura 9 muestra la unión del homodímero de C2B8 (-s-s-) a líneas celulares CD20 positivas (SKW y SB).

La Figura 10 contiene los resultados de un ensayo de unión competitiva de C2B8 y del homodímero de C2B8 (-s-s-) en células SKW.

La Figura 11 muestra la unión del heterodímero α CD20/ α CD23 (C2B8/p5e8) a las líneas celulares SKW y DHL-4.

La Figura 12 muestra la unión del homodímero de C2B8 α CD20 y el heterodímero de C2B8/p5E8 α CD20/ α CD23, a células SKW (CD20+/CD23+).

La Figura 13 muestra la actividad antitumoral de dímeros químicos de C2B8 (-s-s-) sobre xenotrasplantes de tumor de Daudi.

La Figura 14 muestra la actividad antitumoral de dímeros de C2B8 (-s-s-) sobre xenotrasplantes de tumor de Daudi.

La Figura 15 muestra la actividad apoptótica del homodímero de C2B8 (-s-s-).

La Figura 16 muestra la actividad apoptótica del heterodímero de C2B8/p5E8 (-s-).

La Figura 17 muestra la inhibición del crecimiento de líneas celulares (SB y SKW) de linfoma B CD20/CD23 positivas al cabo de 96 horas continuas de exposición a MAb.

Descripción detallada de las realizaciones preferidas

La descripción que sigue permite a los expertos en la técnica a que pertenece esta invención, hacer y usar la invención, y establece los modos mejores contemplado por los inventores, para llevar a cabo su invención.

Como se ha discutido, la presente invención se refiere, en general, a un procedimiento de preparación de dímeros de anticuerpos, biológicamente activos, y una composición farmacéutica que contiene tales dímeros de anticuerpos. La presente invención se refiere, además, al uso de dímeros de anticuerpos, biológicamente activos, para la muerte preferente o inhibición de poblaciones de células seleccionadas, para fabricar una composición farmacéutica para tratar enfermedades tales como el cáncer y trastornos autoinmunitarios.

Anteriormente, los homodímeros fueron generados químicamente a partir de anticuerpos monoclonales presentes de modo natural, usando agentes químicos de entrecruzamiento para introducir un enlace de tioéter entre los dos anticuerpos de IgG (Ghetie, *PNAS* 94:7509-7514 (1997)). Debido a que los dímeros se forman utilizando anticuerpos funcionalizados químicamente, no se puede controlar donde tiene lugar el engarce del tioéter. Como resultado, el método de Ghetie proporcionó una cantidad baja de homodímeros, y dio por resultado una mezcla homodímeros enlazados por puentes disulfuro, presentes de modo natural, y los homodímeros enlazados por puentes de tioéter generados químicamente.

A causa de la necesidad de un método que produzca un rendimiento aumentado y pureza química de los homodímeros de IgG, los Solicitantes dispusieron desarrollar el método descrito en esta memoria. El presente método se distingue del de Ghetie por el uso de anticuerpos monoclonales que han tenido un resto de cisteína logrado por ingeniería genética en un sitio específico sobre el brazo de F_c del anticuerpo, eliminándose con ello la necesidad de introducir químicamente un grupo tiol reactivo.

El método incrementa el rendimiento de la formación del homodímero a 40-50% del material de partida, y es aplicable para preparar homodímeros de anticuerpos enlazados o bien por puentes disulfuro o bien por puentes de tioéter, preferiblemente homodímeros de IgG/IgG.

Adicionalmente, la preparación de homodímeros enlazados por puentes de tioéter fue más eficaz que el método de Ghetie, como se ha determinado mediante geles de SDS-PAGE (reductores) Debido al alto rendimiento y alta eficacia de los homodímeros enlazados por puentes de tioéter, este método, a diferencia del método de Ghetie, puede ser utilizado también para preparar heterodímeros de anticuerpos (preferiblemente heterodímeros de IgG/IgG) en los que cada brazo del anticuerpo está dirigido contra antígenos diferentes.

También, sorprendentemente y bastante inesperadamente, cuando se comparó con los dímeros anti-CD20 de Ghetie usando el MAb 2H7, los dímeros de C2B8 que usan el presente método (homodímeros y heterodímeros) fueron capaces de iniciar la apoptosis en poblaciones en proliferación de células B malignas. De modo más importante, estos dímeros eran fuertemente inhibidores del crecimiento de células de linfoma en cultivo, mostrando un aumento de potencia de 200 veces respecto a los dímeros preparados según el método de Ghetie. Los homodímeros (enlazados por puentes disulfuro) fueron evaluados también en animales y pusieron de manifiesto tener mejor actividad terapéutica que la molécula C2B8 parental.

Según un primer aspecto, la presente invención proporciona un método para producir un heterodímero tetravalente de un anticuerpo que comprende un anticuerpo anti-CD20 y un anticuerpo anti-CD23, cuyo método comprende:

(i) obtener o construir una molécula de DNA que codifica la cadena pesada de la molécula de un anticuerpo, que posee especificidad de unión a un antígeno CD20 ó CD23, cuando dicha cadena pesada está emparejada con la cadena ligera correspondiente, e introducir al menos un codón de cisteína en dicha cadena pesada de la molécula del anticuerpo mediante mutagénesis de DNA recombinante.

(ii) expresar dicha molécula de DNA en una célula huésped adecuada o en un sistema de expresión adecuado, junto con una molécula de DNA que codifica la cadena ligera de la molécula de un anticuerpo que tiene la misma especificidad que la cadena pesada, para producir una primera molécula de anticuerpo anti-CD20 ó anti-CD23 que contiene dicho resto de cisteína;

(iii) purificar dicho primer anticuerpo desde dicha célula huésped o dicho sistema de expresión;

(iv) poner en contacto dicha molécula de anticuerpo purificada, con una cantidad de un agente reductor adecuado, suficiente para reducir parcialmente las uniones disulfuro, intra- o intermoleculares, de dicha molécula de anticuerpo intensificando con ello la dimerización de dicha primera molécula de anticuerpo con una segunda molécula de anticuerpo; y

(v) poner en contacto dicha primera molécula de anticuerpo purificada con una segunda molécula de anticuerpo,

en el que el segundo anticuerpo posee especificidad de unión a CD20 cuando dicho primer anticuerpo es un anticuerpo anti-CD23, o a CD-23 cuando dicho primer anticuerpo es un anticuerpo anti-CD20:

y permitir un período de tiempo suficiente para que proceda la reacción de dimerización.

Según un segundo aspecto, la presente invención proporciona un heterodímero de anticuerpos que comprende un anticuerpo anti-CD-20 y un anticuerpo anti-CD23, producido mediante el método del primer aspecto de la invención.

Todavía, en otros aspectos, la presente invención proporciona el uso del heterodímero de anticuerpos del segundo aspecto de la invención, para fabricar un medicamento para el tratamiento del cáncer, un trastorno alérgico o un trastorno autoinmunitario.

Los anticuerpos monoclonales usados para la presente invención pueden ser cualquier anticuerpo monómero, y no necesita estar limitado a IgG. Además, pueden proceder de cualquier hospedante mamífero. Aun cuando en los ejemplos la cisteína fue situada por ingeniería genética en la posición 444 de la cadena pesada, la situación de la cisteína no está limitada a esta posición, y la invención incluye la incorporación de cisteína en otros sitios. En efecto, otros sitios ubicados sobre el anticuerpo pueden ser más adecuados para la colocación de la cisteína. A este respecto, la colocación de cisteína en la posición 444 puede no ser preferida debido a que la molécula de cisteína (una en cada brazo) está en estrecha proximidad con la cisteína de la cadena pesada vecina, de modo que puede establecerse un puente disulfuro intracadenas. Por consiguiente, puede ser preferible colocar la cisteína en un sitio diferente, por ejemplo, sobre el lazo externo de un dominio en el que las moléculas de cisteína puedan estar, físicamente, mas alejadas. Por tanto, el potencial para la formación de uniones por puente disulfuro intracadenas podría, potencialmente, eliminarse o reducirse al mínimo.

Tres posicionamientos alternativos contemplados específicamente, con el anticuerpo 2B8 anti-CD20 podrían incluir reemplazar el resto de serina en la posición 416, el resto de glutamina en la posición 420 o el resto de glicina en la posición 421. Estos sitios han sido seleccionados siendo conocedores del hecho de que se desea intensificar la formación del dímero reteniendo todavía la afinidad del anticuerpo y las funciones efectoras tanto como sea posible. Asimismo, se anticipa que otros sitios pueden proporcionar también una formación eficaz de dímeros.

Es deseable eliminar las uniones disulfuro intracadenas ya que el tiol de la cisteína estará libre para formar uniones con grupos reactivos con el tiol situados en otros anticuerpos (por medio de enlaces disulfuro o tioéter). Estas reacciones pueden incluir la alquilación del tiol de la cisteína por maleimidadas, la oxidación de dos grupos tiol adyacentes a una unión disulfuro, o mediante uniones disulfuro entre cadenas con disulfuros protegidos con piridilo.

Diversas técnicas de biología molecular (que incluyen, aun cuando no se limitan a ellas), mutagénesis dirigida al sitio, mutagénesis por PCR, mutagénesis aleatoria, subclonación de fragmentos de restricción, síntesis de DNA, etc) pueden ser empleadas por los expertos en la técnica para insertar la cisteína en el sitio apropiado de la molécula de anticuerpo que resulta. En los ejemplos que siguen, se usó mutagénesis dirigida al sitio. La producción del anticuerpo recombinante incluye, por tanto, en general, la introducción de un gen recombinante que codifica la cadena pesada de un anticuerpo, en una célula huésped adecuada, junto con un gen recombinante que codifica la cadena ligera apropiada de un anticuerpo. Las células transfectadas pueden hacerse crecer *in vitro* o *in vivo*.

Como se ha discutido anteriormente, la colocación de la cisteína en la posición 444 de la cadena pesada dio por resultado la formación de una unión disulfuro intracadenas. Por consiguiente, la molécula debe ser reducida parcialmente antes de que pueda tener lugar la dimerización. Se anticipa que el cambio de emplazamiento de la cisteína introducida podría eliminar esta etapa. Sin embargo, para estas moléculas conseguidas por ingeniería genética, la unión disulfuro (S-S) formada entre las moléculas de cisteína vecinas sobre las moléculas de anticuerpo obtenidas por ingeniería genética, debe reducirse al tiol libre. Los Solicitantes han escogido reducir parcialmente las moléculas de anticuerpo usando ditiotreitól (DTT) con objeto de exponer selectivamente tioles específicos. La reducción parcial a 37°C requiere un intervalo de concentraciones del agente reductor desde aproximadamente un exceso 1 a 3 molar.

No obstante, estas condiciones de reacción pueden ser modificadas. Por ejemplo, la reacción puede ser efectuada a temperaturas más bajas o con otros agentes reductores, tales como mercaptoaminas o mercaptoetanol. Estas condiciones de reacción pueden requerir un mayor exceso molar, que puede determinarse fácilmente usando experimentación rutinaria por los expertos en la técnica. En las condiciones de limitación usadas, estos agentes reducirán la primera cisteína más accesible. Por consiguiente, es importante que la molécula de cisteína obtenida por ingeniería genética esté emplazada correctamente y se encuentre disponible con facilidad para la reducción. Esto aumentará la posibilidad de que la cisteína obtenida genéticamente sea la molécula que forma uniones con cisteínas u otros grupos reactivos con tiol situados sobre otras moléculas de anticuerpos. Adicionalmente, la cisteína introducida debe estar ubicada

correctamente sobre la cadena pesada para no interferir con la unión de FcγR o la activación del complemento. Esto puede determinarse mediante experimentación de ensayo y error.

Los métodos de la presente invención producen o bien dímeros formados por uniones disulfuro o dímeros formados por enlace de tioéter. En el caso de uniones disulfuro, las uniones se forman de modo natural entre los grupos tiol existentes en la cisteína. Para el enlace de tioéter un agente de entrecruzamiento maleimido (que es reactivo con el tiol), se añade a los anticuerpos que forman un puente entre las dos moléculas de anticuerpo. Existe una variedad de agentes de entrecruzamiento maleimido de que se dispone en el comercio, que pueden ser utilizados en la presente invención. Estos agentes de entrecruzamiento se fijan por un lado a un grupo tiol y por el otro lado a una de una diversidad de moléculas (por ejemplo, lisina, un grupo carboxilo, etc.) que se encuentran presentes de modo natural en una molécula del anticuerpo. De este modo puede formarse un dímero entre un anticuerpo que haya sido modificado para que contenga una molécula de cisteína en una posición específica, y otro anticuerpo que no haya sido modificado. Usando condiciones especiales (es decir, purificación del MAb reducido selectivamente aplicándole a una columna PD-10 y equilibrando con solución salina normal desoxigenada que contiene citrato sódico (10 mM) y EDTA (1 mM)), que rechaza la formación de homodímeros mediante una unión disulfuro, puede asegurarse que solo se producen dímeros formados por un enlace de tioéter.

A diferencia del método de Ghetie, que da por resultado no solamente dímeros inducidos químicamente sino también dímeros que ocurren de modo natural, el método de la presente invención produce muy pocos dímeros naturales, si es que hay alguno, y por tanto obtiene un rendimiento elevado del dímero deseado. Los dímeros producidos mediante la presente invención también, sorprendentemente, intensifican la actividad apoptótica de células B procedentes de pacientes con leucemia linfocítica crónica (CLL). Anteriormente se había pensado que solo las células de linfoma de células B expresaban suficiente CD20 para atraer la activación del complemento al usar dímeros de anticuerpos. Las células B de CLL expresan niveles bajos de CD20, y los intentos anteriores de activar la muerte de células B de CLL por mediación del complemento, no tuvieron éxito. Por tanto, fue sorprendente descubrir que los dímeros producidos mediante el método de la presente invención eran capaces de inducir la apoptosis de células B procedentes de pacientes con CLL.

Los anticuerpos anti-CD23 producido mediante la presente invención pueden ser usados para fabricar medicamentos para tratar estados de enfermedad que incluyen los siguientes:

Aspergilosis broncopulmonar alérgica; rinitis alérgica; anemia hemolítica autoinmunitaria; acanthosis nigricans; dermatitis alérgica de contacto; enfermedad de Addison; dermatitis atópica; alopecia areata; alopecia universalis; amiloidosis; púrpura anafilactoide; reacción anafilactoide; anemia aplásica; angioedema, hereditario; angioedema, idiopático; espondilitis anquilosante; arteritis craneal; arteritis de células gigantes; arteritis, de Takayasu; arteritis temporal; asma; ataxiatelangectasia; ooforitis autoinmunitaria; orquitis autoinmunitaria; fallo poliendocrino autoinmunitario; enfermedad de Behcet; enfermedad de Berger; enfermedad de Buerger; bronquitis; pénfigo bulloso; candidiasis, mucocutánea crónica; síndrome de Caplan; síndrome de infarto post-miocárdico; síndrome de post-pericardiotomía; carditis; esprue celiaco; enfermedad de Chagas; síndrome de Chediak-Higashi; enfermedad de Churg-Strauss; síndrome de Cogan; enfermedad de aglutinina fría; síndrome de CREST; enfermedad de Crohn; crioglobulinemia; alveolitis fibrosa criptogénica; dermatitis herpetiformis; dermatomiositis; diabetes mellitus; síndrome de Diamond-Blackfan; síndrome de DiGeorge; lupus eritematoso discoide; fasciitis eosinófila; episcleritis; dritema elevatum diutinum; eritema marginado; eritema multiforme; eritema nodoso; fiebre mediterránea familiar; síndrome de Felty; fibrosis pulmonar; glomerulonefritis, anafilactoidea; glomerulonefritis, autoinmunitaria; glomerulonefritis, post-estreptocócica; glomerulonefritis, post-trasplante; glomerulopatía, membranosa; síndrome de Goodpasture; enfermedad del hospedante frente al injerto; granulocitopenia; medida inmune; granuloma anular; granulomatosis, alérgica; miositis granulomatosa; enfermedad de Grave; tiroiditis de Hashimoto; enfermedad hemolítica del recién nacido; hemocromatosis, idiopática; púrpura de Henoch-Schoenlein; hepatitis, activa crónica y progresiva crónica; histiocitosis X; síndrome hipereosinofílico; púrpura trombocitopénica idiopática; síndrome de Job; dermatomiositis juvenil; artritis reumatoide juvenil; (artritis crónica juvenil); enfermedad de Kawasaki; queratitis; queratoconjuntivitis seca; síndrome de Landry-Guillain-Barre-Strohl; lepra, lepromatosa; síndrome de Loeffler; lúpus; síndrome de Lyell; enfermedad de Lyme; granulomatosis linfomatoidea; mastocitosis, sistémica; enfermedad mixta del tejido conjuntivo; mononeuritis múltiple; síndrome de Muckle-Wells; síndrome de los nódulos linfáticos mucocutáneos; reticulohistiocitosis multicéntrica; escleritis; esclerodermia; miastenia gravis; micosis fungoides; vasculitis necrotizante, sistémica; síndrome nefrótico; síndrome de traslapo; paniculitis; hemoglobinuria fría paroxística; hemoglobinuria nocturna paroxística; pénfigoide; pénfigo; pénfigo eritematoso; pénfigo foliaceo; pénfigo vulgar; enfermedad del criador de palomas; pneumonitis hipersensitiva; poliarteritis nodosa; polimialgia reumática; polimiositis; polineuritis, idiopática; polineuropatías familiares portuguesas; pre-eclampsia/eclampsia; cirrosis biliar primaria; esclerosis sistémica progresiva (escleroderma); psoriasis; artritis psoriática; proteinosis alveolar pulmonar; fibrosis pulmonar; síndrome/fenómeno de Raynaud; tiroiditis de Reidel; síndrome de Reiter; policondritis recidivante; fiebre reumática; artritis reumatoide; sarcoidosis; escleritis; colangitis esclerosante; enfermedad sérica; síndrome de Sezary; síndrome de Sjogren; síndrome de Stevens-Johnson; enfermedad de Still; panencefalitis esclerosante subaguda; oftalmia simpática; lupus eritematoso sistémico; rechazo de trasplantes; colitis ulcerosa; enfermedad indiferenciada del tejido conjuntivo; urticaria, crónica; urticaria, fría; uveítis; vitíligo; enfermedad de Weber-Christian; granulomatosis de Wegener; síndrome de Wiskott-Aldrich.

De éstas, las indicaciones preferidas tratables o presentables mediante administración de anticuerpos anti-CD23, incluyen rinitis alérgica, dermatitis atópica; eczema; síndrome de Job, asma; y estados alérgicos; y enfermedades y estados inflamatorios.

Las moléculas de anticuerpos producidas mediante el método de la presente invención pueden ser usadas en composiciones farmacéuticas para cualquier aplicación en que los anticuerpos son terapéuticamente beneficiosos, por ejemplo, el tratamiento del cáncer y trastornos autoinmunitarios de los mamíferos, en especial los seres humanos. Los anticuerpos obtenidos por ingeniería genética, de la presente invención, pueden formularse según métodos conocidos para preparar composiciones útiles desde el punto de vista farmacéutico, tales como por mezcla con un vehículo excipiente farmacéuticamente aceptable. Vehículos adecuados y su formulación están descritos, por ejemplo, en la publicación Remington's Pharmaceutical Sciences (16ª Edición, Osol, A. Ed. Mack Easton PA (1980)). Para formar una composición aceptable desde el punto de vista farmacéutico, adecuada para una administración eficaz, tales composiciones han de contener una cantidad eficaz de anticuerpo, o bien solo, o con una cantidad adecuada de un vehículo excipiente, por ejemplo, una solución salina tamponada.

Las composiciones de la invención serán administradas a un individuo en cantidades terapéuticamente eficaces. Es decir, en una cantidad suficiente para tratar un estado de enfermedad particular, por ejemplo, un cáncer o un trastorno autoinmunitario. La cantidad eficaz variará según el peso, sexo, edad e historia médica del individuo. Otros factores incluyen la gravedad del estado del paciente, el modo de administración y factores semejantes. En general, las composiciones se administrarán en dosis que varían desde aproximadamente 0,01 a aproximadamente 2 picomoles/ml, más generalmente, aproximadamente, 0,0001 a aproximadamente 200 picomoles/ml.

Las composiciones preparadas farmacéuticamente pueden administrarse a un paciente por cualesquiera medios conocidos en la técnica, que incluyen administración oral, intranasal, subcutánea, intramuscular, intravenosa, intraarterial, parenteral, etc.

Habiendo descrito ahora la invención en líneas generales, los ejemplos que siguen se ofrecen a título de ilustración solamente y no están destinados a ser limitativos, a menos que se especifique de otro modo.

25

Ejemplo 1

Producción por ingeniería genética de C2B8/SH (NTB Nos. 2012-85 y 2092/64)

30

a. Generación de la línea celular C2B8/SH Anti-CD20 (Versión 1)

Se ha demostrado anteriormente por Shopes (*J. Immunol.* 148(9):2918-2922 (1992) y Shopes *et al.*, documento WO 91/19515, 26 de Diciembre de 1991) que pueden inducirse moléculas de inmunoglobulina diméricas (L_2H_2)₂ “cola a cola”, mediante la formación de un engarce disulfuro entre moléculas individuales de inmunoglobulina L_2H_2 . Un enfoque similar fue usado por Caron *et al.*, (*J. Exp. Med.* 176:1191-95 (1992)). Ambos grupos introducían artificialmente una cisteína cuatro aminoácidos desde el extremo carboxilo de la cadena pesada, reemplazando el resto de serina en la posición 444 de la cadena H con una cisteína.

En un esfuerzo llevado a cabo para crear una inmunoglobulina dimérica anti-CD20, los Solicitantes introdujeron similarmente un resto de cisteína dentro del anticuerpo quimérico anti-CD20, C2B8. La Figura 1 muestra la secuencia de nucleótidos y la secuencia de aminoácidos predicha, del dominio variable de la cadena ligera murina anti-CD20 humano, fusionada al dominio constante de la cadena ligera kappa humana. La Figura 2 muestra la secuencia de nucleótidos y la secuencia de aminoácidos predicha del dominio variable de la cadena pesada murina anti-CD20 humano, fusionada al dominio constante de la cadena pesada gamma 1 humana.

Mediante el uso de mutagénesis dirigida al sitio, convencional, *in vitro*, los Solicitantes efectuaron una mutación de transversión C a G dentro del DNA plasmídico (Figura 3). Esta construcción de expresión de propiedad de IDEC (Reff *et al.*, Solicitud de Patente de EE.UU. Serie No. 08/819.866, presentada el 14 de Marzo de 1997) codifica las cadenas ligera y pesada de inmunoglobulina anti-CD-20, así como las secuencias necesarias para la integración homóloga en una línea propietaria de células CHO. (Reff *et al.*, referencia indicada), seguido por selección dominante con G418 y/o metotrexato. El efecto de esta mutación de nucleótidos es el cambio de la segunda base del codón, codificando con ello el resto de serina normal en la posición 445 cerca del extremo carboxilo terminal de la cadena pesada gamma 1, por un resto de cisteína (véase la Figura 2).

55

Esta construcción de expresión (Figura 3) fue transfectada en la línea de las células CHO de IDEC, designada 15C9, que había sido derivada originalmente de la DG-44 de CHO (Urlaub *et al.*, *Som. Cell Mol. Gen.* 12(6):555-566, 1986). Después de selección con G418, se aisló un clon que producía un alto nivel de inmunoglobulina, denominado 3F9. El 3F9 produce y secreta en el medio de crecimiento celular, aproximadamente 3,4 pg/célula/día de inmunoglobulina. El ensayo ELISA de productividad de inmunoglobulinas mide las moléculas de inmunoglobulina L_2H_2 independientemente de su configuración monomérica, dimérica u oligomérica. Como evidencia el análisis por transferencia Western, la mayoría de la inmunoglobulina secretada es monomérica (L_2H_2). Sin embargo, un pequeño porcentaje se encuentra en forma dimérica y en formas oligoméricas mayores.

La línea celular 3F9 se seleccionó después en metotrexato 5 nM. El crecimiento en metotrexato puede ser usado para inducir artificialmente amplificación génica (Alt *et al.*, *J. Biol. Chem.* 253:1357-1370 (1978)) y expresión del gen DHFR codificado por plásmido. Simultáneamente, los genes de las cadenas ligera y pesada de la inmunoglobulina enlazados también serán amplificados dando por resultado una expresión génica aumentada de inmunoglobulina y mayor

65

producción de proteína de inmunoglobulina. Mediante amplificación génica, se fue capaz de inducir eficazmente un aumento de los niveles totales de producción de anti-CD20. Después de la selección se identificó el clon designado 3F9-50B11. El clon 3F9-50B11 produce aproximadamente 6,3 pg/célula/día de proteína de anti-CD20.

5 b. *Purificación de C2B8/SH (Ver. 1)*

El C2B8/SH fue purificado desde el medio de crecimiento (12 L a 15 mg/L) usando cromatografía en columna de proteína A (pA). Se añadió azida de sodio (concentración final, 0,01%) al medio que contenía el anticuerpo C2B8/SH y se ajustó el pH a 7,5 con NaOH 10 N. El material se aplicó a una columna de afinidad de pA lavada con PBS (columna de 15 ml, Bioprocess Ltd.) a aproximadamente 3 ml/min en una sala fría 4-8°C, seguido de lavado con 5 volúmenes de columna, por lo menos, de PBS (100 ml). Se eluyó el anticuerpo desde la columna de pA con 100 ml de citrato sódico (0,1 M, pH 3,5) e inmediatamente se neutralizó a pH 7 con Tris Base 1 M. El C2B8/SH (purificado con pA) se sometió a diálisis frente a PBS (1000 ml x 4 cambios durante 3 días), se concentró hasta aproximadamente 10 mg/ml bajo nitrógeno (3,5 kg/cm²) en un concentrador de células Amicón, agitado (MWCO 30.000) y se esterilizó por filtración (filtro de 0,2 µm). El material de C2B8/SH purificado con pA se mantuvo a 4°C. La concentración proteínica se determinó espectrofotométricamente: MAb (mg/ml) = [Absorbancia a DO280] x [factor de dilución]/1,7.

c. *Caracterización del homodímero de C2B8*

20 La IgG de C2B8/SH (150 kDa) que tiene un grupo tiol introducido por ingeniería genética en la cadena pesada del anticuerpo, es capaz de formar un homodímero de IgG/IgG de 300 kDa mediante engarce intermolecular de disulfuro. La cantidad de homodímero que se había formado se determinó usando HPLC analítica y SDS/PAGE no reductora. Se llevó a cabo cromatografía líquida de alta eficacia, analítica, de exclusión por tamaños (SE-HPLC) usando un sistema de HPLC Beckman 126, operando isocráticamente con un caudal de 1,0 ml/ml, usando una fase móvil que consistía en fosfato sódico 100 mM y cloruro de sodio 150 mM, pH 6,8. La separación se llevó a cabo a temperatura ambiente usando una columna BioSil SEC 250-5 de 7,8 x 300 mm (Bio-Rad, No. de catálogo 125-0062) monitorizada por absorbancia a 280 nm. Los pesos moleculares fueron aproximados por comparación con un Patrón de filtración por gel, de Bio-Rad (Bio-Rad, No. de catálogo 151-1901).

30 Los geles de la SDS/PAGE no reductora de CHO que secretaron C2B8/SH (Figura 5, Calle 1) mostraron una banda principal de proteína en 150 kDa (IgG) y el análisis por HPLC de varias preparaciones mostró ≤ 6% de un homodímero de IgG/IgG (300 kDa) en el medio de crecimiento que contenía el MAb. Después de purificar con pA y concentrar, se observaron tres bandas principales de proteínas (Figura 5, calle 2). La determinación de pesos moleculares mediante HPLC mostró picos de las tres proteínas en 150 kDa (80,3%), 300 kDa (14,9%) y ≥ 450 kDa (4,8%). Los resultados de la HPLC obtenidos de varias purificaciones con pA del C2B8/SH mostraron intervalos de cantidades de homodímero desde 12,5 a 17,9% (Figura 7, 8) lo que era comparable con la cantidad de homodímeros de MAb sintetizados por Ghetie *et al.*, (PNAS, USA 49:7509-7514 (1997)), que empleó agentes de entrecruzamiento hetero-bifuncionales para copular químicamente los monómeros de IgG.

40 La concentración de tiol reactivo (contenido de SH libre) que permanecía después de la dimerización, se estimó utilizando el método de Ellman *et al.*, (Anal. Biochem. 94:75.81 (1979)). A pesar de la observación de que > 80% del C2B8/SH permanecía como monómero después de la dimerización, se detectó muy poco tiol reactivo (< 0,2 grupos SH por MAb), lo que indica que el tiol introducido genéticamente en la cadena pesada de IgG estaba bloqueado, lo más probable mediante la formación de un puente disulfuro intermolecular.

Ejemplo 2

50 (Ntb No. 1966/84); *Reducción Selectiva de C2B8/SH y preparación del homodímero de C2B8 enlazado por puente disulfuro (Figura 4.1)*

Para aumentar el porcentaje de dímero de la preparación de C2B8/SH, el material purificado con pA fue reducido parcialmente con un exceso doble molar de ditioneitol (DTT), se concentró y se dejó formar dímeros del anticuerpo en el seno de PBS, en condiciones atmosféricas normales. Se ha puesto de manifiesto que los MAb's parcialmente reducidos usando DTT, para utilizar en la preparación de columnas de afinidad (Goldenberg *et al.*, Bioconj. Chem. 2:275-280 (1991)) o para preparaciones de inmunconjugados (Siegall *et al.*, Bioconj. Chem. 3:302-307 (1992), Willner *et al.*, Bioconj. Chem. 4:521-527 (1993)), mantienen su integridad molecular (150 kDa), y su capacidad de unión de antígeno.

60 a. *Reducción Selectiva de C2B8/SH*

Este método usó DTT para reducir parcialmente la unión de disulfuro intra- o intermolecular y permitir a los dímeros de IgG/IgG reformarse más eficazmente. 0,045 mg de Ditioneitol (DTT Pierce Product No. 20290) en el seno de PBS exento de calcio y magnesio, (cmfPBS), pH 7,4, se añadió a 21,8 mg del MAb C2B8/SH purificado con pA, en el seno de cmfPBS que contenía 3,5 mM de Na₂-EDTA, dando una relación final de 2,0 moles de DTT por mol de MAb. La reacción fue sometida inmediatamente a desgasificación y se incubó bajo nitrógeno durante tres horas a 37°C. El MAb fue purificado partiendo del material sin reaccionar usando cromatografía en columna de Sephadex G-25 (columna PD-10, Pharmacia Fine Chemicals) que se había equilibrado con PBS. La fracción que contenía MAb se

ES 2 311 452 T3

recogió de conformidad con las instrucciones del fabricante, en un volumen final de 3,0 ml de tampón de equilibrio (PBS). El C2B8/SH reducido selectivamente se incubó posteriormente durante dos horas, a temperatura ambiente, en aire. La reducción se concluyó mediante la adición de 0,1 ml (100 mM) de cisteína, y se concentró usando un concentrador Ultrafuge™ con MWCO 30,00. La concentración de proteínas se determinó mediante absorbancia a 280 nm (1 mg/ml = 1,7 UA).

b. Caracterización del homodímero de C2B8 (-s-s-)

El material se mantuvo a 4°C hasta su análisis, usando SDS/PAGE (Figura 5, calle 4) y HPLC analítica (Figura 7, Tabla I). El homodímero enlazado por puentes disulfuro, había aumentado desde el 17,5% del material de partida, hasta el 39,4% después de reducción selectiva y dimerización. La repetición de la síntesis usando este método mostró dímeros que variaban desde el 39,4% de la población hasta el 51%, del material de partida.

El homodímero enlazado por puente disulfuro (-s-s-), de 300 kDa, fue purificado del monómero y de agregados de mayor peso molecular usando HPLC preparativa. Se llevó a cabo la SE-HPLC preparativa usando un sistema de HPLC Beckman 126 operando isocráticamente con un caudal de 4,0 ml/min, con una fase móvil constituida por fosfato sódico 100 mM y cloruro sódico 150 mM, pH 6,8. La separación se llevó a cabo a temperatura ambiente, usando una columna guarda TSK-Gel SW de TosoHaas de 21,5 x 75 mm unida a una columna TSK-Gel G3000 de TosoHaas, de 21,5 x 300 mm. Se recogieron manualmente fracciones monitorizando la gráfica del ordenador de la absorbancia a 280 nm, en tiempo real. En general, los homodímeros tenían una pureza >95% después de purificar por HPLC.

Ejemplo 3

(Ntb No. 1966/78): Preparación de homodímero de C2B8, enlazado por tioéter (Figura 4.2)

a. Reducción selectiva de C2B8

5,45 mg de C2B8/SH purificado con pA ($7,27 \times 10^{-5}$ M) en el seno de 0,5 ml de cmfPBS/EDTA, se redujo con un exceso molar doble de DTT durante tres horas, a 37°C, empleando las condiciones descritas en el ejemplo 2. El MAb reducido selectivamente se aplicó a una columna PD-10, y se equilibró con solución salina normal desoxigenada que contenía citrato sódico (10 mM) y EDTA (1 mM), tamponada a pH 6,3 usando ácido clorhídrico (Tampón Solución Salina/Citrato). El pico que contenía el primer anticuerpo, en 3,0 ml de tampón de equilibrio (tampón Solución Salina/Citrato) se recogió siguiendo las instrucciones del fabricante. La concentración de proteínas se determinó mediante la absorbancia a 280 nm (1 mg/ml = 1,7 UA).

Se encontró que la concentración de tiol (contenido de SH) estimada usando reactivo de Ellmans era, por término medio, aproximadamente, 2 moles de tiol libre por cada mol de C2B8/SH reducido con DTT. Se confirmó la integridad molecular con este método empleando PAGE-SDS no reductora.

b. Reacción del homodímero (-s-s-)

Bismaleimidoheptano (BMH, Pierce Chemical Co., Producto No. 22319), se diluyó a 10 mM en el seno de DMF y se añadió al C2B8/SH reducido selectivamente dando una relación molar final de 2,5 moles de BMH por mol de MAb. La mezcla se hizo girar durante 2,5 horas a temperatura ambiente en atmósfera de nitrógeno. La reacción se terminó mediante la adición de 0,1 ml de cisteína (100 mM en el seno de PBS) y se mantuvo a 4°C (atmósfera normal) hasta su análisis y purificación usando HPLC.

La mezcla se analizó usando el método de HPLC analítica descrito en el ejemplo 2. La fracción (300 kDa) que contenía el homodímero de C2B8 enlazado por tioéter (-s-s-) representaba el 28% de la proteína total recogida (Figura 7 y Tabla 1). Se empleó HPLC preparativa (según se ha descrito en el ejemplo 2) para purificar el homodímero (-s-s-) partiendo de la mezcla sin purificar con una pureza, típicamente, >95%, según se determinó mediante geles de SDS-PAGE (no reductora) y HPLC analítica (los resultados no están indicados). El análisis del homodímero de C2B8 (-s-s-) purificado mediante SDS/PAGE en condiciones no reductoras, mostró tres bandas principales de proteínas en aproximadamente pesos moleculares de 22 kDa (cadena L), 55 kDa (cadena H) y 110 kDa (dímero H-H) (Figura 6, calle 7). Por el contrario, el homodímero enlazado por disulfuro o el monómero Ab, mostraron las 2 bandas de proteínas esperadas de 22 y 55 kDa.

Ejemplo 4

(Ntb No. 1266/85): Preparación del heterodímero de C2B8/p5E8, enlazado por tioéter (Figura 4.3)

a. Reducción Selectiva de C2B8

C2B8/SH purificado, 10,9 mg en 1,0 ml de cmfPBS ($7,27 \times 10^{-5}$ M), fue reducido usando un exceso doble molar de DTT (tres horas a 37°C, atmósfera de nitrógeno) usando las condiciones descritas en el ejemplo 2, y se purificó usando una columna PD-10 equilibrada con tampón de Solución Salina/Citrato. La relación molar de tiol a MAb,

determinada usando el reactivo de Ellmans, según se ha descrito en el Ejemplo 3, fue 1,2. El C2B8/SH se mezcló inmediatamente con el MAb p5E8 (anti-CD23) que se había modificado previamente con 4-(p-maleimidofenil)-butirato de succinimidilo (SMPB, Pierce Chemical Co., Producto No. 22315).

5 b. p5E8 modificado con SMPB

MAb p5E8 ($4,5 \times 10^{-5}$ M, en el seno de PBS), se funcionalizó por adición de un exceso séxtuple molar de SMPB (10 mM en DMF), y haciendo girar la mezcla durante dos horas a temperatura ambiente. La fracción de MAb se purificó desde el material sin reaccionar usando columnas PD-10 equilibradas con tampón de Solución Salina/Citrato. La concentración de proteína del MAb funcionalizado con SMPB se determinó espectrofotométricamente:

$$\text{MAb (mg/ml)} = [\text{Absorbancia a 280}] \times [\text{factor de dilución}]/1,5.$$

15 c. Formación del heterodímero

Se preparó el heterodímero (anti-CD20/anti-CD23) mezclando 1,5 equivalentes molares de p5E8 (11,37 mg) que contenía SMPB con 1 equivalente recién reducido de C2B8/SH (8,0 mg), durante una hora a temperatura ambiente, en atmósfera de nitrógeno. El heterodímero se analizó y purificó usando HPLC según se ha descrito en el ejemplo 2. La Figura 8 y la Tabla 2 muestran los cromatogramas de HPLC del heterodímero sin purificar y purificado, en comparación con el material de partida. La pureza del heterodímero de 300 kDa era >95% según se determinó mediante HPLC analítica (Tabla 2) y geles de SDS-PAGE no reductora y reductora, Figura 6. La SDS/PAGE reductora (Figura 6, calle 6) mostró también tres bandas principales de proteínas después de la reducción, incluyendo una banda no reducible de 110 kDa, consistente con la formación de dímero H-H enlazado por tioéter.

Ejemplo 5

Actividad de unión del homodímero de C2B8 y del heterodímero de C2B8/p5E8

La unión a diversas células del anticuerpo monomérico y del anticuerpo dimerizado, se evaluó mediante inmunotinción indirecta de IgG anti-humana usando isotiocianato de fluoresceína (FITC), y se analizó usando citometría de flujo (IF indirecta). Células (2×10^6 células viables en el seno de 0,1 ml de cmfPBS/suero fetal de ternera al 2%/Azida de sodio al 0,1%, tampón PBS/FCS) se incubaron durante una hora sobre hielo con 0,1 ml de anticuerpo diluido seriamente 5 veces. Las células fueron lavados dos veces mediante centrifugación (200x g) usando 2 ml de PBS/lavado y se suspendieron en 0,2 ml de IgG de *Cabra* (Fab')₂ anti-humana conjugada con FITC (Jackson Immunoresearch No. 30869, 5 µg/ml en tampón PBS/FCS). Al cabo de 30 minutos de incubar sobre hielo, las células fueron lavadas de nuevo con PBS y suspendidas en 0,2 ml de formaldehído recién diluido al 0,5%, tapadas y guardadas a 4°C hasta realizar el análisis. La cantidad de anticuerpo unido a las células se determinó por citometría de flujo (FACScan, Becton-Dickenson, Mountain View, CA).

a. Homodímero de C2B8

La Figura 9 compara la unión de MABs:homodímero de C2B8 (enlazado por disulfuro), C2B8 y RF-2 en las líneas celulares positivas CD20+/CD23+, SKW y SB. Se usó RF-2 como un testigo de anticuerpo sin unir, equilibrado en isotipos. Se obtuvieron curvas de unión similares para ambos, el monómero y el dímero de C2B8, sobre ambas líneas celulares, lo que sugiere una actividad similar de unión para el antígeno CD20.

La afinidad de unión del homodímero y el monómero de C2B8 para el antígeno CD20, se comparó usando un ensayo de unión competitiva (Figura 10). Células SKW fueron incubadas primeramente durante 30 minutos sobre hielo con diversas cantidades del MAb 2B8 murino (anti-CD20), diluido en serie 5 veces, y por 0,1 ml (a 1 µg/ml) o bien de monómero de C2B8 o bien de homodímero de C2B8. La IF indirecta, según se ha descrito para la Figura 9, evaluó la magnitud de la unión del C2B8. Experimentos anteriores habían demostrado que no hay reactividad de la IgG anti-humana conjugada a FITC para el anticuerpo 2B8 murino. La concentración de C2B8 que proporcionó una inhibición del 50% de unión del anticuerpo 2B8, fue 9,8 µg/ml, y 10,4 µg/ml para el homodímero. Los datos de ambas Figuras 9 y 10, por consiguiente, indican que no hay efecto importante en la afinidad de unión para el antígeno CD20 como resultado de la dimerización a una especie de 300 kDa. Los resultados obtenidos de la tinción directa y el análisis de citometría de flujo, según se describe en la Figura 9, usando el homodímero de C2B8 enlazado por tioéter, fue similar a los resultados obtenidos usando el dímero enlazado por disulfuro (no se indica).

b. Heterodímero de C2B8/p5E8

La unión del heterodímero de C2B8/p5E8, C2B8 y p5E8 sobre las células SKW (CD20+/CD23+) y DHL4 (CD20+/CD23-), se muestra en la Figura 11. Se obtuvieron curvas de unión similares comparando el monómero con el heterodímero sobre ambas líneas celulares, incluyendo células DHL-4 negativas respecto al antígeno CD23. Los resultados obtenidos sugieren fuertemente que el heterodímero, a semejanza de los homodímeros anti-CD20, retenían una unión funcional total para el antígeno CD20.

ES 2 311 452 T3

Para determinar la actividad de unión del heterodímero para el antígeno CD23, células SKW (1×10^6 células en tampón de PBS/FCS) fueron incubadas primeramente con una cantidad a saturación ($10 \mu\text{g/ml}$) del MAb 2B8 murino (anti-CD20), seguido de unión de preparaciones del anticuerpo monómero o del anticuerpo dímero (Figura 12). El 2B8 murino inhibía completamente la unión de ambos anticuerpos, el C2B8 monómero y el C2B8 dimerizado, pero no efectuó la unión ni del p5E8 ni del heterodímero. Los resultados obtenidos sugieren que el heterodímero retenía también la actividad de unión funcional total para el antígeno CD23 después de dimerización con C2B8.

Ejemplo 6

Actividad antitumoral del homodímero de C2B8 en modelos de animal murino

La línea tumoral del linfoma humano de Daudi se estableció en ratones nu/nu BALB/c a partir de cultivo de tejidos y se mantuvo como un xenotrasplante tumoral mediante la inoculación por vía subcutánea de tumor Brie. Medidas con calibre en dos direcciones perpendiculares a intervalos semanales permitieron medir el tamaño del tumor. El volumen tumoral se estimó partiendo de las medidas del tamaño mediante la fórmula:

$$\text{Volumen del tumor (mm}^3\text{)} = \text{Longitud} \times (\text{Anchura})^2 / 2.$$

Los tratamientos de MAb fueron administrados por vía intraperitoneal según diversos programas indicados para cada experimento. El anticuerpo se diluyó en PBS y se administró por vía intraperitoneal como mg por ratón con 8 animales en cada grupo. Los grupos testigo permanecieron sin tratar. Los resultados se indican como volumen tumoral medio para los grupos de animales, testigos o tratados. Se definió una regresión completa como el fallo para detectar tumores durante al menos dos medidas (>2 semanas).

La actividad antitumoral del C2B8, ensayada en tumores Daudi establecidos, se muestra en las Figuras 13 y 14. La Figura 13 compara la actividad antitumoral del homodímero de C2B8 a dosis bajas ($200 \mu\text{g/ratón}$) (programa: cada 5 días x 3 inyecciones, Q5dx3) con la actividad de la dosis y el programa optimizado del monómero de C2B8 (1 mg/ratón , Q5dx2). El tratamiento de MAb se inició sobre tumores establecidos, $50\text{--}150 \text{ mm}^3$ al comienzo del tratamiento. A esta dosis y con este programa, el homodímero de C2B8 mostró una inhibición del crecimiento tumoral comparable a la de la dosis optimizada de C2B8. El día 65, el 50% de los animales tratados con $200 \mu\text{g} \times 3$ dosis de homodímero de C2B8 mostraron una regresión completa del tumor. Los animales que habían recibido $1 \text{ mg} \times 2$ dosis de C2B8 tenían el 37,5% de regresiones completas.

La Figura 14 compara la actividad en programas a tono (Q5dx3) de $200 \mu\text{g/ratón}$ de monómero u homodímero de C2B8 sobre tumores establecidos $150\text{--}250 \text{ mm}^3$ de volumen. El crecimiento tumoral de los ratones tratados con el homodímero de C2B8 fue inhibido en mayor extensión que una cantidad comparable del monómero de C2B8. A esta dosis ($0,2 \text{ mg/ratón}$), el 62,5% de los ratones tratados con el homodímero tenían una regresión completa de los tumores, mientras que solo el 25% de los ratones tratados con el monómero mostraban una regresión completa del tumor.

Ejemplo 7

Actividad apoptótica del homodímero de C2B8 enlazado por disulfuro sobre células de linfoma de células B

La aptitud de homodímeros para inducir apoptosis de células de linfoma de células B CD20⁺, se determinó mediante el ensayo TUNEL. Se comparó el homodímero enlazado por un puente disulfuro con C2B8 y RF2 sobre células DHL-4 (CD20⁺), Ramos (CD20⁺, CD23⁺) y SKW (CD20⁺, CD23⁺) (1×10^6 células/ml) en fase log. de crecimiento. Las células fueron propagadas en medio RPMI 1640 (Irvine Scientific) más Suero Fetal Bovino (FBS) al 5%, con L-glutamina (Irvine Scientific) 2 mM y 100 U/ml de penicilina-Estreptomicina (Irvine Scientific), a 37°C en incubador con 5% de CO₂. Como testigos, se incubaron cultivos o bien con monómero de C2B8 o con un testigo de anticuerpo, de igual isotipo, irrelevante, RF2. Al cabo de 72 horas de incubación, las células fueron recolectadas mediante centrifugación a $350 \times g$ durante 5 minutos, y fijadas con etanol de 70% (v/v) (enfriado con hielo) durante 30 minutos. Las células fijadas fueron analizadas para determinar la apoptosis mediante un ensayo TUNEL basado en citometría de flujo, usando el kit APOBRDUTM siguiendo las instrucciones del fabricante (Pharmingen). El tratamiento de las células DHL-4 y SKW por el homodímero de C2B8 mostró evidencia de muerte apoptótica de células dependiente de la dosis de anticuerpo empleada (Figura 15 y Tabla III). Por el contrario, el tratamiento de células con las mismas concentraciones de monómero de C2B8 o el anticuerpo testigo, RF2, no mostró evidencia de apoptosis. Además, con las células Ramos (línea celular del linfoma de Burkitt CD20⁺) que son susceptibles a un mayor grado de apoptosis espontánea en el cultivo, la adición de homodímeros a ese cultivo dio por resultado una apoptosis intensificada (Figura 15).

Ejemplo 8

Actividad apoptótica del heterodímero de C2B8-p5E8 enlazado por tioéter, sobre células de linfoma de células B

La aptitud de heterodímeros para inducir apoptosis de células de linfoma de células B CD20⁺, se determinó mediante el ensayo TUNEL. Se cultivaron células de linfoma B y se evaluó según se ha descrito en el Ejemplo 7. Brevemente, concentraciones variables de heterodímero fueron añadidas a células DHL-4 y SKW en fase-log de crecimiento y se ensayó la inducción de apoptosis según se ha descrito anteriormente en el Ejemplo 7. Como testigos, se incubaron cultivos con monómero de C2B8, monómero de p5E8 y un testigo de anticuerpo irrelevante, RF2. La Figura 16 y la Tabla III indican la inducción de apoptosis en las células DHL-4 y SKW por el heterodímero de C2B de un modo dependiente de la dosis. En células cultivadas con monómeros de C2B8 y p5E8 o el anticuerpo testigo RF2, no se observó evidencia de apoptosis.

Ejemplo 9

Citotoxicidad dependiente de complemento, de células B normales, con mediación de homodímeros de C2B8

Se demostró la aptitud de homodímeros de C2B8 para mediar en la muerte de células B de sangre periférica mediante un mecanismo de citotoxicidad dependiente del complemento (CDC), usando un ensayo modificado basado en citometría de flujo. Células monocleares de sangre periférica (PBMC) fueron aisladas de sangre de donantes humanos sanos por centrifugación con gradiente de Ficoll-Hypaque. Se determinó la viabilidad por exclusión con el colorante azul tripán que fue >98%. Después de aislamiento, 0,5-1x10⁶ PBMCs por tubo fueron incubadas a temperatura ambiente durante 45 minutos con homodímero (-s-s-) de C2B8 ó con el monómero de C2B8., y se lavó con 2 ml de HBSS por centrifugación y aspiración del sobrenadante para separar los anticuerpos sin unir. El glóbulo de células se resuspendió con 100 µl de complemento de conejo (ICN Cappel, No. de catálogo 55866) a diferentes diluciones y se incubó durante 60 minutos a 37°C. Después de incubar, se añadieron 10 µl de anticuerpo anti-CD19-FITC (Pharmingen). Las células fueron incubadas sobre hielo durante 30 minutos, seguido de la adición de 50 µl (20 µg/ml) de yoduro de propidio (PI; Boehringer Mannheim). Quince minutos más tarde se añadió a todos los tubos 400 µl de HBSS y las células se analizaron inmediatamente por FACScan (Becton-Dickinson).

Los resultados obtenidos fueron analizados usando el soporte lógico WinList, según describe el fabricante (Variety Software House). Se encontró que la pureza de la preparación de linfocitos que se usó para el ensayo era superior al 95%, determinada mediante el Leucogate (células CD45 positivas). La población de células CD19⁺ (linaje de células B) de la población total de linfocitos (CD45⁺) fue guardada para su análisis posterior. El porcentaje de células CD19⁺ que incorporaban PI representaban la muerte o población de células teñidas y se determinó usando el soporte lógico WinList. Los datos que figuran en la Tabla I indican que el homodímero de C2B8 es eficaz en la mediación de CDC de células B periféricas CD19⁺. Las células incubadas con complemento solo en diluciones 1:10 y 1:20 (Tabla IV) tenían una citotoxicidad de 20% que aumentó a 34% y 41%, respectivamente, cuando las células fueron incubadas con el homodímero de C2B8 (70% de aumento sobre el testigo). Las células testigo incubadas sin complemento pusieron de manifiesto menos de 10% de citotoxicidad (resultados no indicados).

TABLA I

Citotoxicidad dependiente del complemento, de dímeros de C2B8 sobre células B CD19⁺

Anticuerpo ^a	% de Citotoxicidad ^b	
	Dilución del complemento	
	1:10	1:20
Dímero de C2B8	34,19	41,29
Monómero de C2B8	28,89	23,86
Testigo sin anticuerpo	20,10	20,28

^a El anticuerpo se ensayó a la concentración óptima de 2 µg/ml, determinada partiendo de un experimento anterior.

^b El % de citotoxicidad se determinó como el porcentaje de células CD19⁺ que mostraban adquisición de mancha de yoduro de propidio.

Ejemplo 10

Inhibición del crecimiento de linfomas de células B por homo- y heterodímeros de C2B8

Se determinó la aptitud de homodímeros y heterodímeros para inhibir directamente el crecimiento de las líneas celulares SKW y SB de linfoma B, por un ensayo de inhibición de la proliferación. Brevemente, concentraciones variables de C2B8, p5E8, homodímero de C2B8 y heterodímero de C2B8-p5E8, fueron añadidas a 5×10^5 en placas de fondo plano de 96 pocillos en 200 μ l de medio de crecimiento (medio RPMI-1640 con FBS al 5%) y se incubó durante 96 horas a 37°C con CO₂ al 5%. Durante las últimas 18 horas de incubación se añadió a cada pocillo 50 μ l del colorante redox azul alamar (Biosource International, Cat. DAL 1100). Después de incubar, las placas fueron enfriadas a temperatura ambiente durante 10 minutos, con agitación, se determinó la reducción intracelular del color y se leyó la fluorescencia usando un fluorómetro de 96 pocillos con longitud de onda de excitación de 530 nm y de emisión de 590 nm.

Los resultados se expresan como unidades relativas de fluorescencia/RFU). La inhibición del crecimiento en tanto por ciento se calculó como:

$[1 - (\text{RFU media de la muestra de ensayo} \div \text{RFU media del testigo sin anticuerpo})] \times 100\%$. Como indica la Figura 17, el homodímero de C2B8 y los heterodímeros pusieron de manifiesto inhibición del crecimiento de ambas líneas celulares SKW y SB, *in vitro*, de un modo dependiente de la dosis. De conformidad con nuestros descubrimientos anteriores, los monómeros de C2B8 y p5E8 no inhibían el crecimiento de las células SKW y SB. Por el contrario, ambos, el C2B8 (-s-s-) y el C2B8-p5E8 (-s-) manifestaron inhibición del crecimiento celular dependiente de la dosis. Los valores de IC₅₀ para el homodímero fueron 0,625 μ g/ml para las células SKW y SB, mientras que los valores de IC₅₀ para los heterodímeros aumentaron desde 0,625 μ g/ml a 1,41 μ g/ml.

Ejemplo 11

Inhibición del crecimiento de linfoma de células B por entrecruzamiento de monómeros de C2B8

La aptitud para potenciar la actividad biológica por hiper-entrecruzamiento de CD20 de la membrana, se demostró primeramente usando líneas celulares de linfoma de células B en un ensayo de inhibición de la proliferación. Brevemente, 3×10^4 células DHL-4 ó SB en el seno de medio de crecimiento RPMI-1640 que contenía FCS al 10%, se añadió a cada pocillo de una placa de fondo en U de 96 pocillos y se incubó con concentraciones creciente de C2B8. Después de 1 hora de incubación a 37°C, se añadió a cada pocillo 50 μ l de anticuerpo monoclonal murino anti-IgG1 humana (Sigma Chemical Co.) a 10 μ g/ml de concentración final, y se incubó durante 72 horas más. Durante las últimas 18 horas de incubación, los cultivos fueron irradiados con 1 μ Ci por pocillo de [³H]-timidina. Las células fueron lavadas y recolectadas, y se midió la radiactividad asociada a las células usando un contador de centelleo líquido automatizado.

Una representación de los resultados obtenidos del experimento de proliferación celular se expone en la Figura 18, que indica que el hiper-entrecruzamiento de C2B8 sobre la superficie del linfoma de células B usando un anticuerpo secundario, indicaba una clara inhibición de la proliferación celular dependiente de la dosis, que no se había observado cuando células B CD20⁺ habían sido incubadas con C2B8 monomérico. Anticuerpos ensayados en condiciones similares sobre células HAB CD20⁺ no mostraron efecto, lo que indica que el efecto observado se realizó con mediación de la molécula de CD20 sobre la superficie de linfomas de células B. Además, el entrecruzamiento de C2B8 mediante revestimiento directo de pocillos de cultivo sin anticuerpo secundario, antes de la adición de células, dio por resultado también inhibición del crecimiento celular, lo que confirma, además, la observación anterior (resultados no indicados).

Ejemplo 12

Actividad apoptótica del homodímero de C2B8 enlazado por disulfuro, sobre PBMC aislado de un paciente con CLL

Se determinó también mediante ensayo TUNEL, la aptitud del homodímero de C2B8 para inducir apoptosis usando células B CD20⁺ procedentes de pacientes humanos diagnosticados con leucemia linfocítica crónica (CLL). El homodímero enlazado por puente disulfuro se comparó con el monómero para determinar la inducción de apoptosis sobre linfocitos aislados de un donante al que se había diagnosticado CLL. Los PBMC se cultivaron en medio RPMI 1640 suplementado con plasma del donante al 2%, más L-glutamina 2 mM y 100 U/ml de penicilina-estreptomicina. Como testigos, se incubaron cultivos con monómero de C2B8 y el MAb RF2 que no se une. Al cabo de 120 horas de incubación se recolectaron células, se fijaron con etanol de 70% (v/v), y se analizaron para determinar la apoptosis mediante el ensayo TUNEL, según se ha descrito anteriormente (Ejemplo 7). El tratamiento de células leucémicas mediante el homodímero de C2B8 dio por resultado, aproximadamente, una muerte celular aumentada de 20%, por apoptosis, en comparación con células que estuvieron con las mismas concentraciones de monómero de C2B8 o del anticuerpo testigo RF2 (Tabla II).

En resumen, se observó un alto nivel de muerte celular apoptótica espontánea con células B de CLL, que puede ser el resultado de las condiciones de cultivo subóptimas empleadas en estos estudios.

ES 2 311 452 T3

TABLA II

Inducción de apoptosis por el homodímero de C2B8 de células B CD19⁺/CD20⁺, procedentes de un paciente con CLL

Muestra clínica	Tratamiento	Apoptosis ^a		
		10 µg/ml	2,5 µg/ml	0,625 µg/ml
CSK No. 1	C2B8-C2B8	84%	83%	65%
	C2B8	64%	65%	63%
	RF2	62%	67%	60%

^a Se determinó la apoptosis mediante el ensayo Tunel, según se ha descrito en el Ejemplo 7. El grado de apoptosis se expresó como % de apoptosis por muestra dividido por el % de apoptosis de los testigos. Se llevó a cabo análisis por citometrías de flujo en el FACScan de Becton-Dickinson usando el soporte lógico FACScan Research Software y el análisis final de los resultados se realizó usando el soporte lógico WinList Software (Variety Software House). El tanto por ciento de células positivas para apoptosis se determinó como el tanto por ciento de células que eran positivas por encima de la autofluorescencia de fondo.

REIVINDICACIONES

1. Un método para producir un heterodímero tetravalente de un anticuerpo que comprende un anticuerpo anti-CD20 y un anticuerpo anti-CD23, cuyo método comprende:
 - (i) obtener o construir una molécula de DNA que codifica una cadena pesada de la molécula del anticuerpo, que posee especificidad de unión a un antígeno CD20 ó CD23 cuando dicha cadena pesada está emparejada con la cadena ligera correspondiente, e introducir al menos un codón de cisteína en dicha cadena pesada de la molécula del anticuerpo mediante mutagénesis de DNA recombinante;
 - (ii) expresar dicha molécula de DNA en una célula huésped adecuada o un sistema de expresión adecuado, junto con una molécula de DNA que codifica la cadena ligera de la molécula del anticuerpo que posee la misma especificidad que la cadena pesada, para producir una primera molécula de anticuerpo anti-CD20 ó anti-CD-23 que contiene dicho resto de cisteína;
 - (iii) purificar dicho primer anticuerpo procedente de dicha célula huésped o dicho sistema de expresión;
 - (iv) poner en contacto dicha molécula de anticuerpo purificado con una cantidad de un agente reductor adecuado, suficiente para reducir parcialmente las uniones disulfuro intra- e intermoleculares de dicha molécula de anticuerpo e intensificar con ello la dimerización de dicha primera de anticuerpo con una segunda molécula de anticuerpo; y
 - (v) poner en contacto dicha primera molécula de anticuerpo purificado con una segunda molécula de anticuerpo, en el que el segundo anticuerpo posee especificidad de unión a CD20 cuando dicho primer anticuerpo es un anticuerpo anti-CD23, ó a CD23 cuando dicho primer anticuerpo es un anticuerpo anti-CD20;
 y permitir un tiempo suficiente para que proceda la reacción de dimerización.
2. Un método según la reivindicación 1, en el que dichos primero y segundo anticuerpos son, ambos, anticuerpos de IgG.
3. Un método según la reivindicación 1 ó la reivindicación 2, en el que el anticuerpo anti-CD20 es un anticuerpo quimérico que consiste en las cadenas ligera y pesada de un anticuerpo de IgG humana en el que las regiones variables están reemplazadas con las regiones variables de las cadenas ligera y pesada del anticuerpo 2B8 murino; y el anticuerpo anti-CD23 es un anticuerpo quimérico que consiste en las cadenas ligera y pesada de un anticuerpo de IgG humana en el que las regiones variables están reemplazadas con las regiones variables de las cadenas ligera y pesada del anticuerpo 5E8 del mono.
4. Un método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la posición de dicha molécula de cisteína es tal que inhibe o evita la formación de un puente disulfuro intramolecular entre cadenas pesadas hermanas sobre la misma molécula de anticuerpo.
5. Un método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la etapa (iv) comprende, además, terminar la reacción de reducción mediante la adición de cisteína o después de un reactivo de bloqueo de tiol.
6. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el segundo anticuerpo no tiene un grupo de cisteína introducido en él, y contiene un grupo reactivo con tiol.
7. El método según la reivindicación 6, en el que grupo reactivo con tiol es un grupo maleimido.
8. El método según la reivindicación 6, en el que el grupo reactivo con tiol es un grupo ditiopiridial.
9. El método según la reivindicación 6, en el que el grupo reactivo con tiol es un grupo tiol reactivo.
10. Un heterodímero de un anticuerpo que comprende un anticuerpo anti-CD20 y un anticuerpo anti-CD23, siendo obtenible dicho heterodímero mediante un método según se define en cualquiera de las reivindicaciones anteriores.
11. Un heterodímero de un anticuerpo según la reivindicación 10, en el que dichos anticuerpo anti-CD20 y anticuerpo anti-CD23 son, ambos, anticuerpos de IgG.
12. Un heterodímero de un anticuerpo según la reivindicación 11, en el que el anticuerpo anti-CD20 es un anticuerpo quimérico que consiste en las cadenas ligera y pesada de un anticuerpo de IgG humana en el que las regiones variables están reemplazadas con las regiones variables de las cadenas ligera y pesada del anticuerpo 2B8 murino; y

ES 2 311 452 T3

el anticuerpo anti-CD23 es un anticuerpo quimérico que consiste en las cadenas ligera y pesada de un anticuerpo de IgG humana en el que las regiones variables están reemplazadas con las regiones variables de las cadenas ligera y pesada del anticuerpo 5E8 del mono.

5 13. Un heterodímero de un anticuerpo según la reivindicación 11 ó la reivindicación 12, que es capaz de activar componentes del sistema del complemento.

14. Un heterodímero de un anticuerpo según la reivindicación 13, que comprende la aptitud de activar y matar células mediante la cascada del complemento.

10 15. Un heterodímero de un anticuerpo según la reivindicación 11 ó la reivindicación 12, que es capaz de unión a receptores Fcγ sobre células efectoras citotóxicas.

15 16. Un heterodímero de un anticuerpo según la reivindicación 13, que se une a los receptores Fcγ sobre células inmunes del huésped.

17. Un heterodímero de un anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 16, que es capaz de iniciar la muerte celular programada (apoptosis).

20 18. Un heterodímero de un anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 17, en el que dichos anticuerpos de IgG son de la misma o diferente subclase de IgG.

19. Un heterodímero de un anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 18, en el que dichos anticuerpos de IgG son anticuerpos monoclonales.

25 20. Un heterodímero de un anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 19, para usar como medicamento.

30 21. El uso de un heterodímero de un anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 19, para fabricar un medicamento para el tratamiento del cáncer.

22. El uso de un heterodímero de un anticuerpo según la reivindicación 21, en el que dicho cáncer es la leucemia linfocítica crónica o el linfoma de células B.

35

40

45

50

55

60

65

Figura 1A
Secuencias de DNA y de aminoácidos predichas de la
cadena ligera "dimérica" de Anti-CD20 (Versión 1)

Comienzo [Secuencia Líder Natural Murina]

ATG GAT TTT CAG GTG CAG ATT ATC AGC TTC CTG GTA ATC AGT GCT TCA GTC ATA
Met Asp Phe Gln Val Gln Ile Ile Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser Val Ile

ATG TCC AGA GGA CAA ATT GTT CTC TCC CAG TCT CCA GCA ATC CTG TCT GCA TCT
Met Ser Arg Gly Gln Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ile Leu Ser Ala Ser

CCA GGG GAG AAG GTC ACA ATG ACT TCC AGG GCC AGC TCA AGT GTA AGT TAC ATC
15 Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Ile
[Cadena variable ligera murina anti-CD20 humano]

CAC TGG TTC CAG CAG AAG CCA GGA TCC TCC CCC AAA GGC TGG ATT TAT GCC ACA
33 His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Ala Thr

TCC AAC CTG GCT TCT GGA GTC CCT GTT CGC TTC AGT GCC AGT GGC TCT GGG ACT
51 Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Val Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr

TCT TAC TCT CTC ACA ATC AGC AGA GTG GAG GCT GAA GAT GCT GCC ACT TAT TAC
69 Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Val Gln Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr

TGC CAG CAG TGG ACT AGT AAC CCA CCC ACG TTC GGA GGG GGG GCC AAG CTG GAA
87 Cys Gln Gln Trp Thr Ser Asn Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Ala Lys Leu Glu

ATC AAA CGT ACG GTG GCT GCA CCA TCT GTC TTC ATC TTC CCG CCA TCT GAT GAG
105 Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu

CAG TTG AAA TCT GGA ACT GCC TCT GTT GTG TGC CTG CTG AAT AAC TTC TAT CCC
123 Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro
[Cadena constante ligera humana kappa]

AGA GAG GCC AAA GTA CAG TGG AAG GTG GAT AAC GCC CTC CAA TCG GGT AAC TCC
141 Arg Gln Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser

Figura 1B

```

      CAG GAG AOT GTC ACA GAG CAG GAC AGC AAG GAG AGC ACC TAC AGC CTC AGC AGC
      --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
159 Gln Glu Ser Val Thr Gln Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser

      ACC CTG ACG CTG AGC AAA GCA GAC TAC GAG AAA CAC AAA GTC TAC GGC TGC GAA
      --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
177 Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu

      GTC ACC CAT CAG GGC CTG AGC TCG CCC GTC ACA AAG ACC TTC AAC AGC GAA CAG
      --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
195 Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu

      Delonidin
      TGT TGA
      --- ---
213 Cys ***

```

La numeración de los restos de aminoácidos es secuencial comenzando con el extremo amino terminal de la proteína final (separado el péptido líder)

Figura 2A

Secuencias de DNA y de aminoácidos predichas de la cadena pesada
"dimérica" de anti-CD20 (Versión 1)

Comienzo	[Líder	sinÁlfa]
ATG GGT TGG AGC CTC ATC TGG CTC TTC CTT GTC GCT GTT GCT ACC CTT GTC CTC				
Met Gly Trp Ser Leu Ile Leu Leu Phe Leu Val Ala Val Ala Thr Arg Val Leu				
TTC CAG GTA CAA CTC CAG CAG CCT GCG CCT CAG CTC CTC AAG CCT GCG GCG TCA				
Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser				
GCG AAG ATG TCG TCG AAG GCT TCT GCG TAC ACA TTT ACC AGT TAC AAT ATG CAC				
15 Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Asn Met His				
TGG CTA AAA CAG ACA CCT GGT CCG GCG CTC GAA TCG ATT GGA GCT ATT TAT CCC				
33 Trp Val Lys Gln Thr Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp Ile Gly Ala Ile Tyr Pro				
[Cadena variable pesada murina anti-CD20 humano]				
GGA AAT GGT GAT ACT TCG TAC AAT CAG AAG TTC AAA GGC AAG GCG ACA TTG ACT				
31 Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr				
GCA GAC AAA TCC TCC AGC ACA GCG TAC ATG CAG CTC AGC AGC CTC ACA TCT GAG				
59 Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu				
GAC TCT GCG GTC TAT TAC TGT GCA AGA TCG ACT TAC TAC GGC GGT GAC TGG TAC				
87 Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Thr Tyr Tyr Gly Gly Asp Trp Tyr				
TTC AAT GTC TGG GCG GCA GCG ACC ACC GTC ACC GTC TCT GCA GCT ACC ACC AAG				
105 Phe Asn Val Trp Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ala Ala Ser Thr Lys				
GGC CCA TCG GTC TTC CCC CTC GCA CCC TCC TTC AAG AGC ACC TCT GCG GCG ACA				
123 Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr				
GCG GCG CTC GCG TCC CTC GTC AAG GAC TAC CTC CCC GAA CCG CTG ACG GTC TCG				
141 Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser				

Figura 2B

```

TGG AAC TCA GGC GCC CTG ACC AGC GGC GTG CAC ACC TTC CCG GCT GTC CTA CAG
--- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
159 Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln

TCC TCA GGA CTC TAC TCC CTC AGC AGC GTG GTG ACC GTG CCC TCC AGC AGC TTG
--- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
177 Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu

GOC ACC CAG ACC TAC ATC TGC AAC GTG AAT CAC AAG CCC AGC AAC ACC AAG GTG
--- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
195 Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val

GAC AAG AAA GTT GAG CCC AAA TCT TGT GAC AAA ACT CAC ACA TGC CCA CCG TGC
--- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
213 Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys

CCA GCA CCT GAA CTC CTG GGG GGA CCG TCA GTC TTC CTC TTC CCC CCA AAA CCC
--- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
231 Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro

[ Cadena constante pesada humana Gamma ]

AAG GAC ACC CTC ATG ATC TCC CGG ACC CCT GAG GTC ACA TGC GTG GTG GTG GAC
--- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
249 Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp

GTG AGC CAC GAA GAC CCT GAG GTC AAG TTC AAC TGG TAC GTG GAC GGC GTG GAG
--- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
267 Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu

GTG CAT AAT GCC AAG ACA AAG CCG CGG GAG GAG CAG TAC AAC AGC ACG TAC CGT
--- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
285 Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg

GTG GTC AGC GTC CTC ACC GTC CTG CAC CAG GAC TGG CTG AAT GGC AAG GAG TAC
--- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
303 Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr

AAG TGC AAG GTC TCC AAC AAA GCC CTC CCA GCC CCC ATC GAG AAA ACC ATC TCC
--- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
321 Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser

AAA GCC AAA GGG CAG CCC CGA GAA CCA CAG GTG TAC ACC CTG CCC CCA TCC CGG
--- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
339 Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Gln Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg

```

Figura 2C

```

GAT GAG GTG ACC AAG AAC CAG GTC AGC CTG ACC GGC CTG GTC AAA GGC TTC TAT
--- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
357 Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr

CCC AGC GAC ATC GGC CTG GAG TGG GAG AGC AAT GGG CAG CCG GAG AAC AAC TAC
--- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
375 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Gln Ser Asn Gly Gln Pro Gln Asn Asn Tyr

AAG ACC ACG CCT CCC GTG CTG GAC TCC GAC GGC TCC TTC TTC CTC TAC AGC AAG
--- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
393 Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys

CTC ACC GTG GAC AAG AGC AGG TGG CAG CAG GGG AAC GTC TTC TCA TCG TCG CTG
--- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
411 Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val

ATG CAT CAG GGT CTG CAC AAC CAC TAC ACC CAG AAG AGC CTC TCC CTG TGT CCG
--- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
429 Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Cys Pro

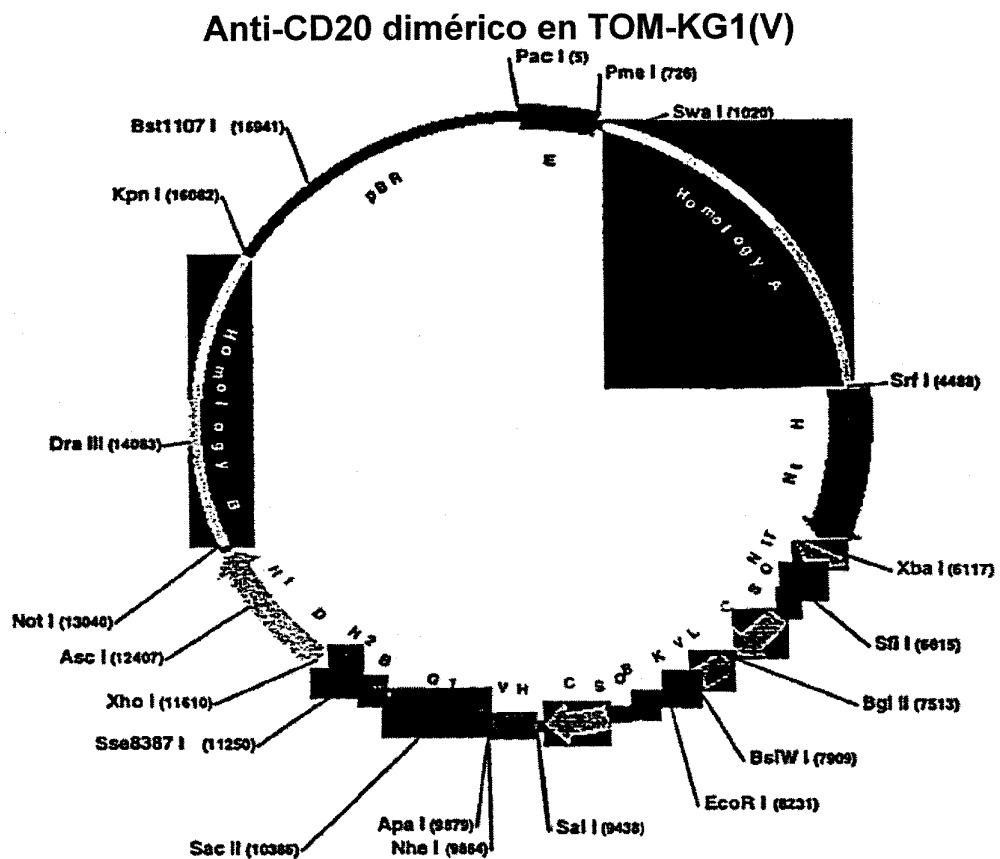
Detención
GGT AAA TGA 3'
--- --- ---
447 Gly Lys ***

```

El punto en **negrita** indica la posición de la mutación de transversión C a G. El codón TCT normal que codifica un resto de serina ha sido cambiado al codón TGT que codifica un aminoácido **cisteína**.

La numeración de los restos de aminoácidos es secuencial comenzando con el extremo amino terminal de la proteína final (separado el péptido líder).

Figura 3: Mapa esquemático de construcción de expresión usada para transfectar la línea celular 15C9 de CHO. El plásmido fue linearizado por digestión con endonucleasas de restricción, con Kpn I y PAC I, antes de electroporación



SV40 Nt D = Dihidrofolato reductasa inactiva SO = Origen de replicación de SV40

E = Intensificadores de CMV y SV40

NtH = Histidinol deshidrogenasa de Salmonella inactiva

T = Intensificador de timidina quinasa del Herpes Simplex e intensificador del poliovirus

C = Promotor/Intensificador de Cytomegalovirus B = Hormona del crecimiento bovino

poliadenilación

NI = Exón 1 de neomicina fosfotransferasa M2 = Exón 2 de neomicina fosfotransferasa

K = Constante kappa humana G1 = Constante Gamma 1 humana dimérica

VL = Cadena ligera variable anti-CD20 y líder

VH = Cadena pesada variable anti-CD20 y líder

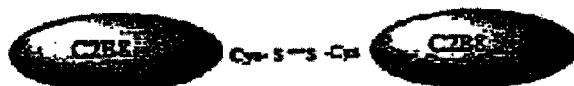
Mapa por Barney Barnett Cnstruido por Tri Huynh 19.056 bp

Nocortadoras = Afl II, Avr II, Hind III, I-Ppo I, I-Sco I, Pml I, Rrs II, SanD I, SgII

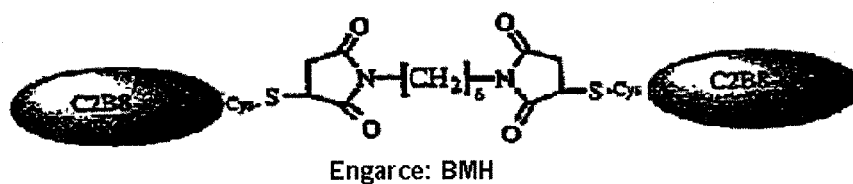
Fig. 4

Estructuras del Homodímero de C28B (α CD20) y del Heterodímero de C2B8/p5E8 (α CD20/ α CD23)

1. Homodímero C2B8(-S-S-)C2B8 [Enlazado por disulfuro]



2. Homodímero C2B8(-S-)C2B8 [Enlazado por tioéter]



3. Heterodímero C2B8(-S-)p5E8 [Enlazado por tioéter]

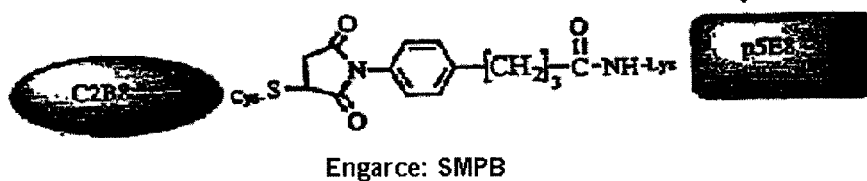


Fig. 5

Gel no reductor de SDS/PAGE que compara homodímeros de C2B8 (-s-s-) y heterodímeros de C2B8/p5E8 (-s-) con el material de partida

La proteína de Mab se analizó usando un gel de SD/Tris-Glicina de 4%-20% en condiciones no reductoras. Excepto para la calle 2, cada pocillo recibió 1 ug/ml de proteína de Mab, Las bandas individuales de las proteínas fueron visualizadas por tinción con XXXazul-

MW : Marcadores MW
1966-76c

Calle 1: Cultivo de Tejidos, C2B8/SH
,Lote 1977-

Calle 2: C2B8/SH, Lote 2058-29
purificado con pA (2 ug/ml)

Calle 3: C2B8/SH, Lote 2058-29
purificado con pA

Calle 4: Homodímero de C2B8 (-s-s), Lote

antes de purificar por HPLC

Calle 6: Heterodímero de C2B8/p5E8 (-s-

76a fracción de HPLC de 300 kDa

Calle 7: C2B8, Lote clínico 0113

Calle 8: Monómero p5Eb, clón H24-31

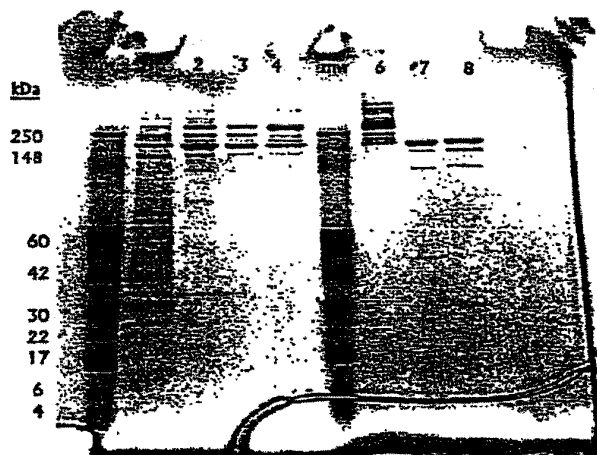


Fig.6

Gel reductor de SDS/PAGE que compara homodímeros de C2B8 (-s-s- y -s-) y heterodímeros de C2B8/p5E8 (-s-) con el material de partida

La proteína del Mab se analizó usando un gel de SDS/Tris-Glicina al 4%-20% en condiciones reductoras. La proteína del Mab se redujo usando 2-mercaptoetanol y calor (90°C, 10 min) antes de someter al análisis de SDS/PAGE. Las bandas individuales de proteínas fueron visualizadas por tinción con azul de Coomassie.

Calles 1: Marcadores MW 1966-76c	Calle 5: Homodímero de C2B8 (-s-s-), Lote Fracción de HPLC de 300 kDa
Calle 2: p5E8 (clon H24-31) 1977-76a	Calle 6: Heterodímero de C2B8/p5E8, Lote Fracción de HPLC de 300 kDa
purificado por pA	Calle 7: Homodímero de C2B8 (-s-), Lote Fracción de HPLC de 300 kDa
Calle 3: C2B8, Lote 2058-29 1966-76b	
purificado por pA	
Calle 4: C2B8/SH, Lote 2058-29 reducido con DTT	

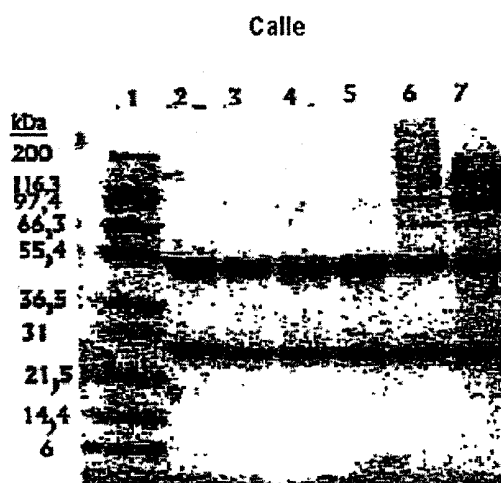


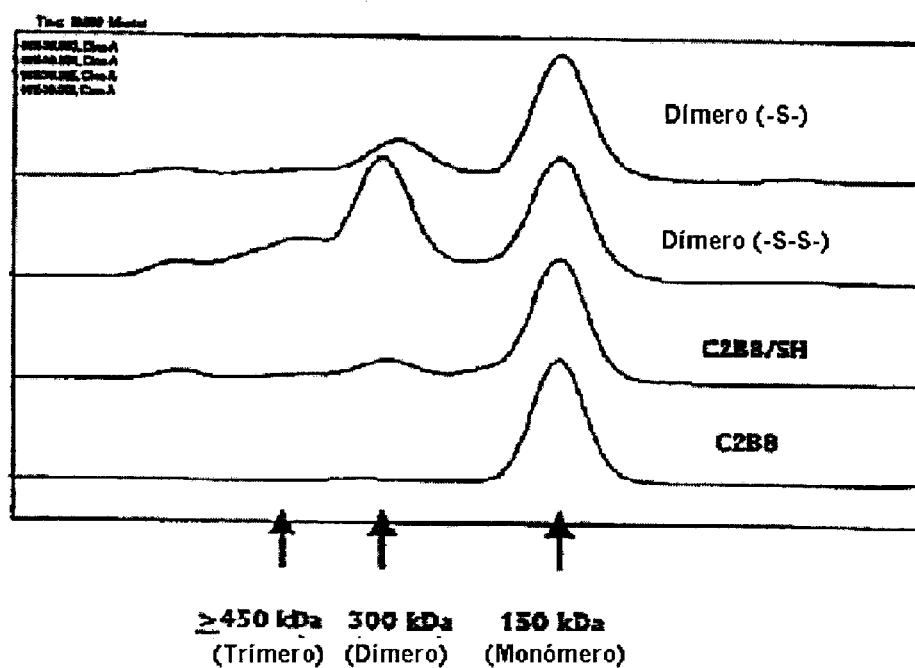
Fig. 7**Análisis por HPLC de homodímeros de C2B8**

Tabla 1

Anticuerpo	Tanto por ciento		
	Monómero	Dímero	Agregado
C2B8	97.2	2.8	
C2B8/SH	77.9	17.5	4.6
Dímero (-s-s-)	40.9	39.4	14.8
Dímero (-s-)	66.2	27.9	3.6

Fig. 8
Análisis por HPLC de heterodímeros de
C2B8/p5E8 (Dímero α CD20/ α CD23)

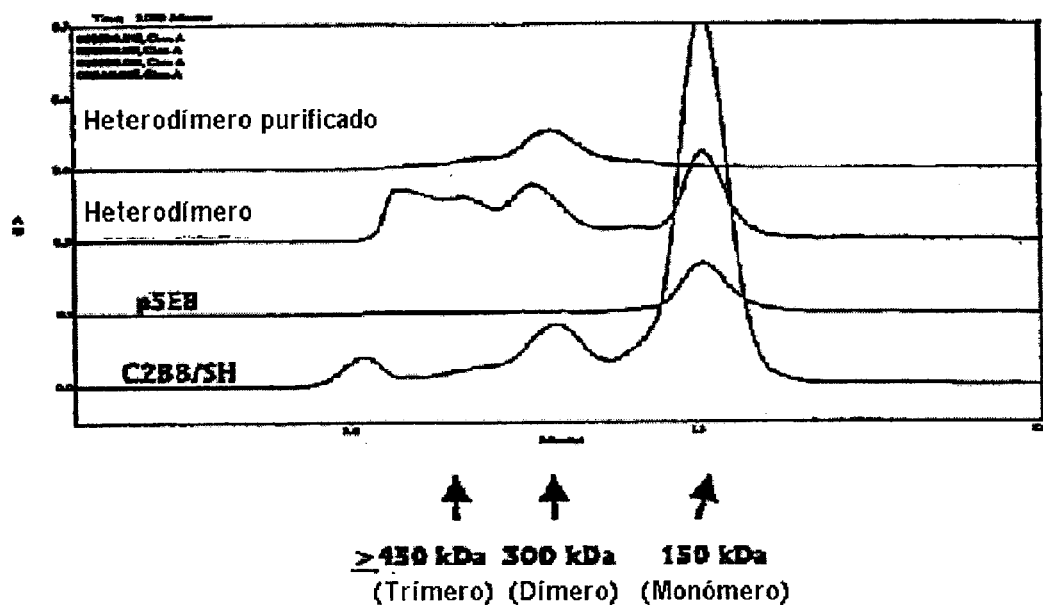


Tabla 2

Anticuerpo	Tanto por ciento		
	Monómero	Dímero	Agregado
C2B8/SH	82.5	12.5	5
p5E8	99.8	0.2	
Heterodímero	34.5	26	39.5
Dímero purificado	3.5	96.5	

Fig. 9

**Unión del homodímero de C2B8 (-s-s-) a
líneas celulares CD20 positivas: SKW y SB**

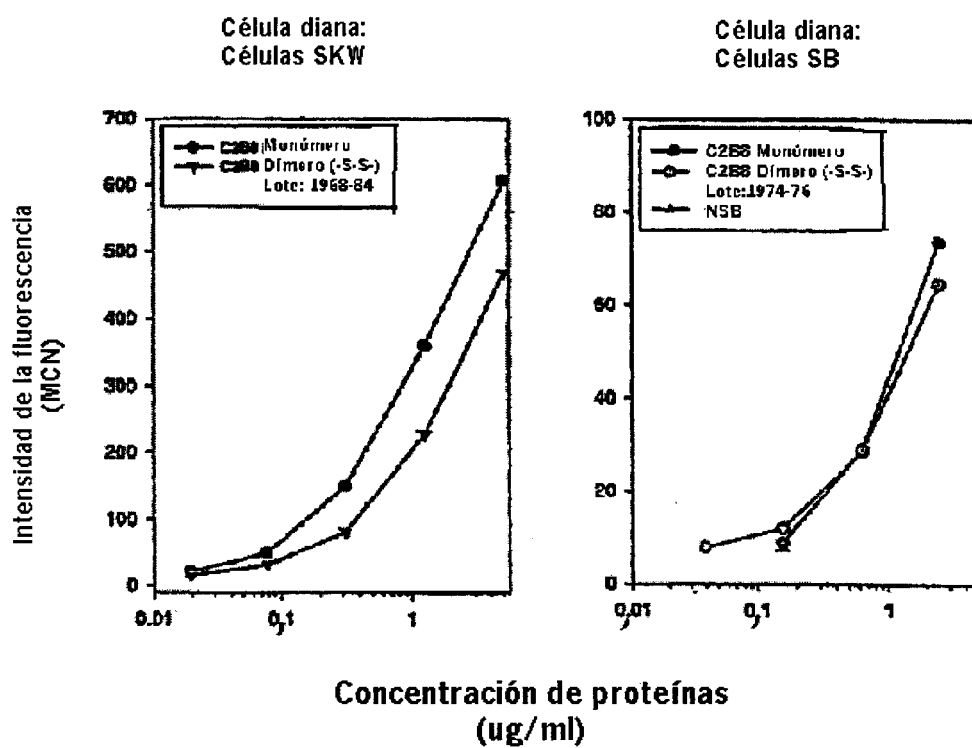


Fig.10

Ensayo de unión competitiva de C2B8 y del homodímero de C2B8 (-s-s-) sobre células SKW

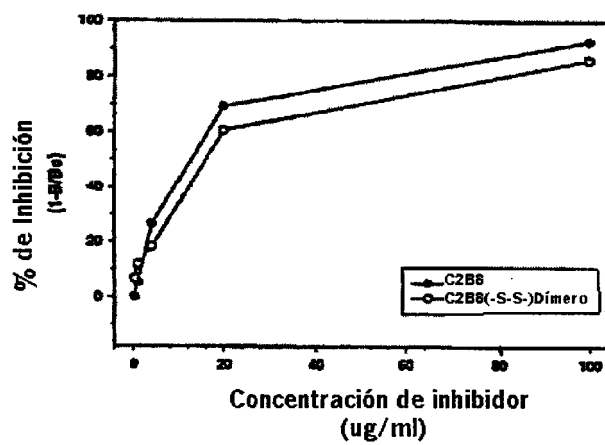


Fig. 11

**Unión del heterodímero α CD20/ α CD23
(C2B8/p5E8, Lote: 1966/84)
a las líneas celulares SKW y DHL-4**

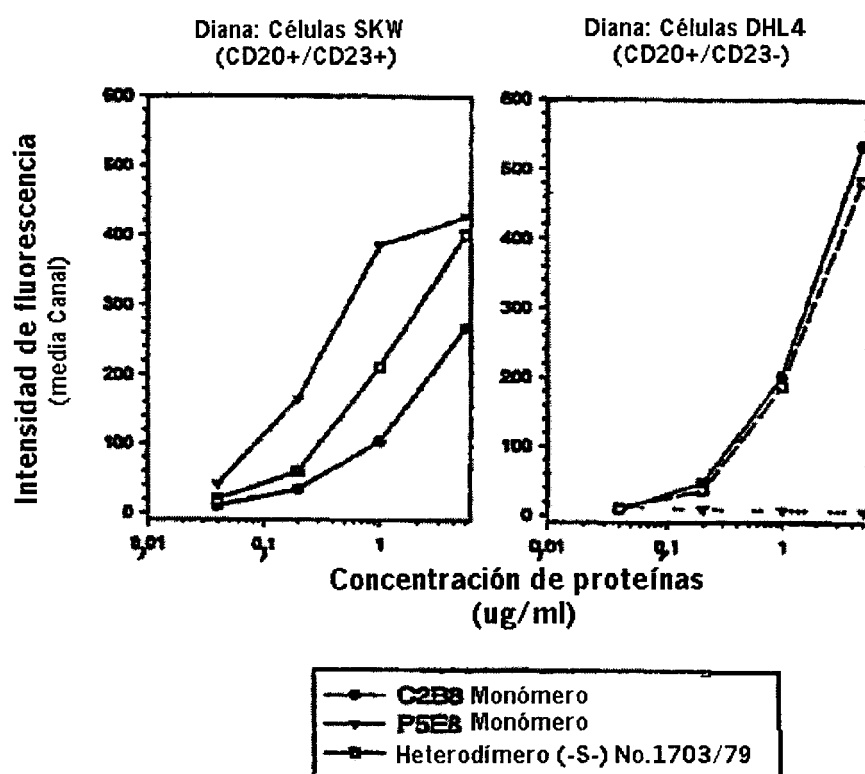


Fig. 12

**Unión del homodímero de C2B8, α CD20, y
del heterodímero de C2B8/p5E8, α CD20/ α CD23,
a células SKW (CD20+/CD23+)**

Fig XX: Unión de Mab a células SKW (CD20+/CD23+)

Las células SKW fueron incubadas sobre hielo o bien con PBS (barra llena) o bien con Mab murino 2B8 (α CD20) (barra de trazos) antes de tinción con Mab, 10 ug/ml, de C2B8, p5E8, homodímero de C2B8 y heterodímero de C2B8/p5E8

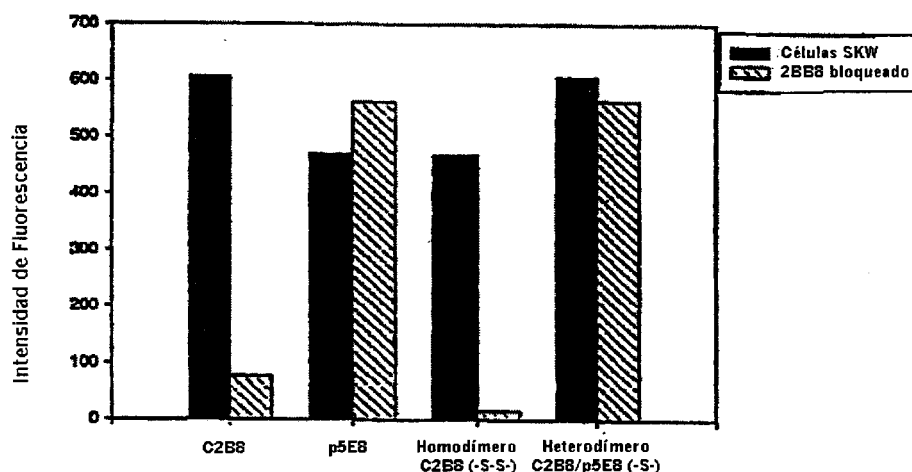


Fig. 13

s279: Actividad antitumoral de dímeros químicos de C2B8 (-s-s-) sobre xenotrasplantes de tumor de Daudi

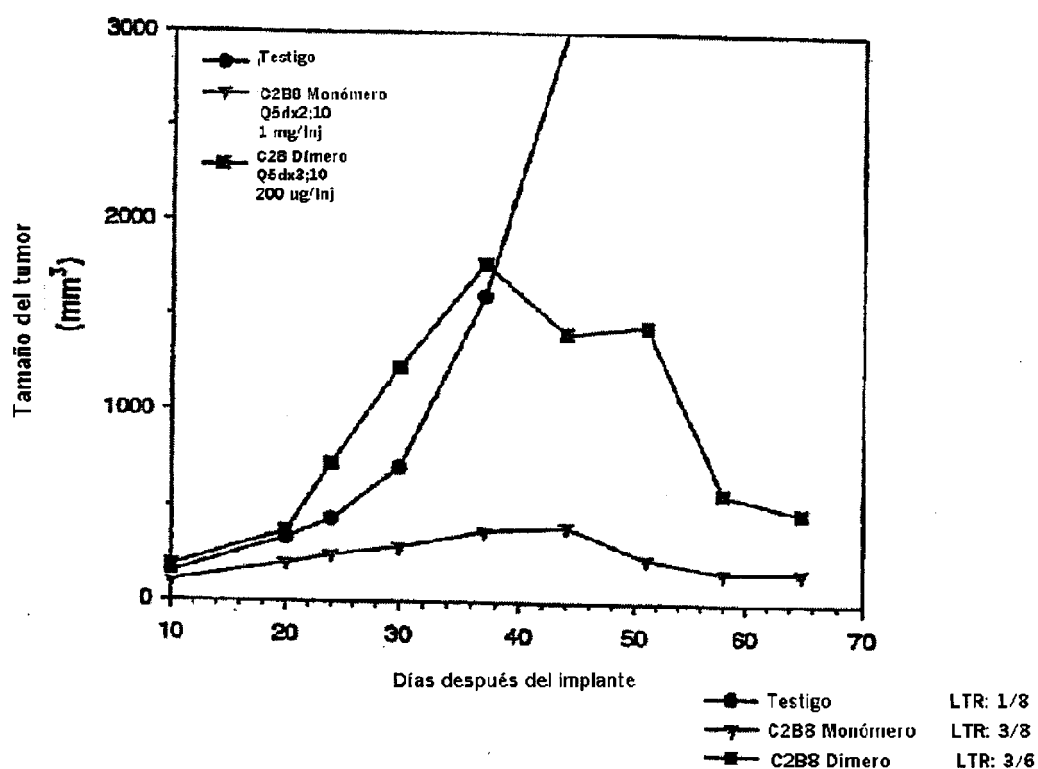


Fig. 14

286: Actividad antitumoral de dímeros de C2B8 (-s-s) sobre xenotrasplantes de tumor de Daudi

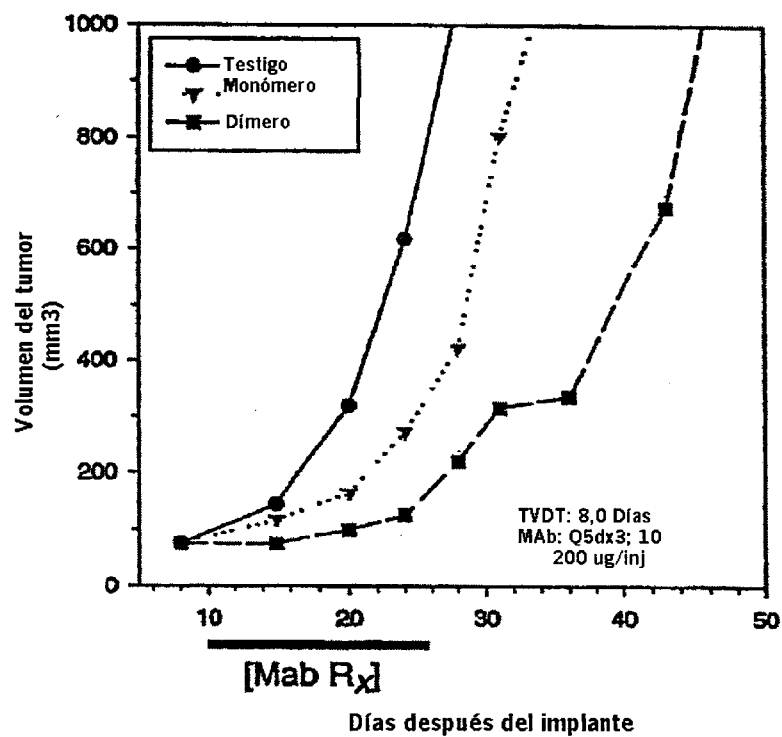


Fig. 15

Actividad apoptótica del homodímero de C2B8 (-s-s-)

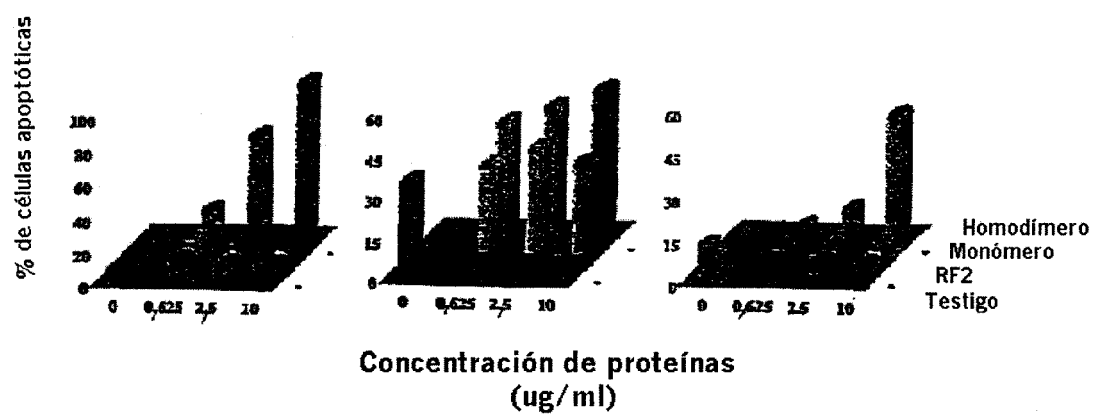


Fig. 16

Actividad apoptótica del heterodímero
de C2B8/p5E8 (-s-)

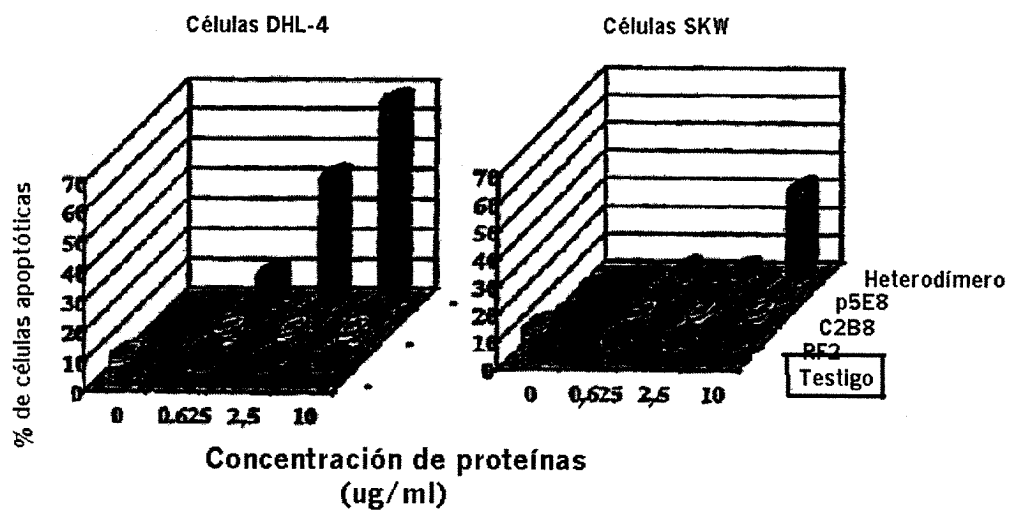
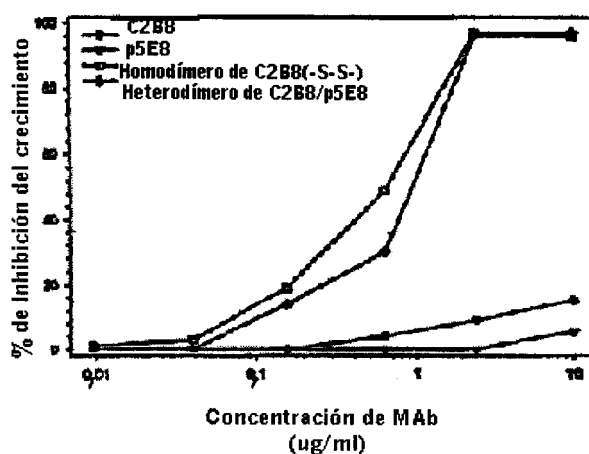


Fig.17
Inhibición del crecimiento de las líneas
celulares de linfoma-B CD20/CD23 positivas
(SB y SKW) después de 96 horas de exposi-
ción continua a MAb

Diana: Células SKW



Diana: Células SB

