



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 322 267**

(51) Int. Cl.:

**A61K 39/395** (2006.01)

**C07K 16/28** (2006.01)

(12)

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Número de solicitud europea: **04759142 .5**

(96) Fecha de presentación : **06.04.2004**

(97) Número de publicación de la solicitud: **1613350**

(97) Fecha de publicación de la solicitud: **11.01.2006**

(54) Título: **Terapia de una enfermedad autoinmunológica en un paciente que presenta una respuesta inadecuada a un inhibidor de TNF- $\alpha$ .**

(30) Prioridad: **09.04.2003 US 461481 P**

(73) Titular/es: **Genentech, Inc.**  
**1 DNA Way**  
**South San Francisco, California 94080-4990, US**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**18.06.2009**

(72) Inventor/es: **Benyunes, Mark**

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**18.06.2009**

(74) Agente: **Ponti Sales, Adelaida**

**ES 2 322 267 T3**

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

Terapia de una enfermedad autoinmunológica en un paciente que presenta una respuesta inadecuada a un inhibidor de TNF- $\alpha$ .

5

### Campo de la invención

La presente invención se refiere a terapia con antagonistas que se unen al marcador CD20 de superficial de las células B. En particular, la invención se refiere a la utilización de dichos antagonistas para tratar la artritis reumatoide (AR) en un mamífero que experimenta una respuesta inadecuada a un inhibidor de TNF- $\alpha$ .

10

### Antecedentes de la invención

Los linfocitos son uno de los muchos tipos de glóbulos blancos producidos en la médula ósea durante el proceso de hematopoyesis. Existen dos poblaciones importantes de linfocitos: los linfocitos B (células B) y los linfocitos T (células T). Los linfocitos de interés particular en la presente invención son las células B.

15

Las células B maduran dentro de la médula ósea y dejan la médula expresando un anticuerpo ligante de antígeno sobre la superficie celular de las mismas. En el caso de que una célula B no expuesta se encuentre con el antígeno para el que el anticuerpo unido a membrana del mismo es específico, la célula empieza a dividirse rápidamente y su progenie se diferencia en células B de memoria y células efectoras denominadas "células plasmáticas". Las células B de memoria presentan una duración de vida más prolongada y continúan expresando el anticuerpo unido a membrana con la misma especificidad que la célula parental original. Las células plasmáticas no producen anticuerpo unido a membrana sino que producen el anticuerpo en una forma que puede secretarse. Los anticuerpos secretados son la molécula efectora principal de la inmunidad humoral.

20

El antígeno CD20 (también denominado antígeno humano de diferenciación restringido a linfocitos B, Bp35) es una proteína transmembranal hidrofóbica con un peso molecular de aproximadamente 35 kD situada en linfocitos pre-B y B maduros (Valentine *et al.*, J. biol. Chem. 264(19):11282-11287, 1989; y Einfeld *et al.*, EMBO J. 7(3):711-717, 1988). El antígeno también se expresa sobre más de 90% de los linfomas no de Hodgkin de células B (NHL) (Anderson *et al.*, Blood 63(6):1424-1433, 1984), pero no se encuentra sobre las células madre hematopoyéticas, células pro-B, células plasmáticas normales ni en otros tejidos normales (Teder *et al.*, J. Immunol. 135(2):973-979, 1985). CD20 regula una o más etapas tempranas en el proceso de activación para el inicio del ciclo celular y la diferenciación (Teder *et al.*, *supra*) y posiblemente funciona como un canal de iones calcio (Teder *et al.*, J. Cell. Biochem. 14D:195, 1990).

25

Debido a que CD20 se expresa en linfomas de células B, este antígeno puede ser candidato al "reconocimiento" de dichos linfomas. En esencia, este reconocimiento puede generalizarse de la manera siguiente: anticuerpos específicos para el antígeno de superficie CD20 de las células B se administran en un paciente. Estos anticuerpos anti-CD20 se unen específicamente al antígeno CD20 de células B (ostensiblemente) tanto normales como malignas; el anticuerpo unido al antígeno de superficie CD20 puede conducir a la destrucción y reducción del número de células B neoplásicas. Además, pueden conjugarse agentes químicos o marcas radioactivos que presentan el potencial de destruir el tumor al anticuerpo anti-CD20 de manera que el agente se "administra" específicamente a las células B neoplásicas. Con independencia del enfoque, un objetivo primario es destruir el tumor; el enfoque específico puede determinarse puede determinarse a partir del anticuerpo anti-CD20 particular que se utilice y, de esta manera, los enfoques disponibles para el reconocimiento del antígeno CD20 pueden variar considerablemente.

30

CD19 es otro antígeno que se expresa sobre la superficie de las células del linaje B. Al igual que CD20, se encuentra CD19 sobre las células durante toda la diferenciación del linaje, desde la etapa de célula madre hasta el punto inmediatamente anterior a la diferenciación terminal en células plasmáticas (Nadler, L., Lymphocyte Typing II 2:3-37, y Apéndice, Renling *et al.*, editores, 1986, por Springer Verlag). Sin embargo, al contrario que CD20, la unión de anticuerpos a CD19 causa la internalización del antígeno CD19. El antígeno CD19 es identificado por el anticuerpo HD237-CD19 (también denominado anticuerpo "B4") (Kiesel *et al.*, Leukemia Research II, 12:1119, 1987), entre otros. El antígeno CD19 se encuentra presente en 4% a 8% de las células mononucleares de sangre periférica y en más de 90% de las células B aisladas a partir de sangre periférica, bazo, nódulo linfático o amígdala. CD19 no se detecta en células T de la sangre periférica, monocitos o granulocitos. Prácticamente la totalidad de las leucemias linfoblásticas agudas no de células T (ALL), de las leucemias linfocíticas crónicas de células B (CLL) y los linfomas de células B expresan CD19 detectable por el anticuerpo B4 (Nadler *et al.*, J. Immunol. 131:244, 1983; y Nadler *et al.*, en: Progress in Hematology, vol. XII, páginas 187 a 206, Brown, E., editor, 1981, por Grune y Stratton, Inc.).

35

Se han identificado anticuerpos adicionales que reconocen antígenos específicos de estadios de diferenciación expresados por células del linaje de las células B. Entre estos se encuentran el anticuerpo B2 dirigido contra el antígeno CD21, el anticuerpo B3 dirigido contra el antígeno CD22 y el anticuerpo J5 dirigido contra el antígeno CD10 (también denominado CALLA) (ver la patente US nº 5.595.721, publicada el 21 de enero de 1997; Kaminski *et al.*).

40

El anticuerpo rituximab (RITUXAN<sup>®</sup>) es un anticuerpo monoclonal químérico murino/humano manipulado genéticamente dirigido contra el antígeno CD20. El rituximab es el anticuerpo denominado "C2B8" en la patente US nº 5.736.137, publicada el 7 de abril de 1998 (Anderson *et al.*). El RITUXAN<sup>®</sup> se encuentra indicado para el tratamiento

de pacientes con linfoma no de Hodgkin en recaída o refractario de células B positivo para CD20 de grado bajo o folicular. Los estudios mecanísticos de acción *in vitro* han demostrado que el RITUXAN® se une al complemento humano y lisa las líneas de células B linfoides a través de citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) (Reff *et al.*, *Blood* 83(2):435-445, 1994). Además, presenta una actividad significativa en ensayos para citotoxicidad celular

5 dependiente de anticuerpos (ADCC). Más recientemente se ha demostrado que el RITUXAN® presenta efectos anti-proliferativos en ensayos de incorporación de timidina tritiada y que induce la apoptosis directamente, mientras que otros anticuerpos anti-CD19 y CD20 no los presentan (Maloney *et al.*, *Blood* 88(10):637a, 1996). También se ha observado experimentalmente sinergia entre el RITUXAN® y las quimioterapias y toxinas. En particular, el RITUXAN® sensibiliza las líneas celulares de linfoma de células B humanas resistentes a fármaco frente a los efectos citotóxicos 10 de la doxorubicina, el CDDP, el VP-16, la toxina diftérica y la ricina (Demidem *et al.*, *Cancer Chemotherapy & Radiopharmaceuticals* 12(3):177-186, 1997). Los estudios preclínicos *in vivo* han demostrado que el RITUXAN® reduce el número de células B de la sangre periférica, nódulos linfáticos y la médula ósea de los monos cynomolgus, presumiblemente a través de procesos mediados por el complemento y por células (Reff *et al.*, *Blood* 83(2):435-445, 1994).

15 Entre las patentes y publicaciones de patente referentes a los anticuerpos de CD20 se incluyen las patentes US nº 5.776.456, nº 5.736.137, nº 6.399.061 y nº 5.843.439, así como las solicitudes de patente US nº 2002/0197255A1 y nº 2003/0021781A1 (Anderson *et al.*), las patentes US nº 6.455.043B1 y WO nº 00/44788 (Braslawsky *et al.*), WO nº 01/10462 (Rastetter, W.), WO nº 01/10461 (Rastetter y White), WO nº 01/10460 (White y Grillo-Lopez), la solicitud de patente US nº 2002/0006404 y la patente WO nº 02/04021 (Hanna y Hariharan), la solicitud de patente US nº 2002/0012665 A1 y la patente WO nº 01/74388 (Hanna, N.), la solicitud de patente US nº 2002/0009444A1, y la patente WO nº 01/80884 (Grillo-Lopez, A.), la patente WO nº 01/97858 (White, C.), la solicitud de patente US nº 2002/0128488A1 y la patente WO nº 02/34790 (Reff, M.), las patentes WO nº 02/060955 (Braslawsky *et al.*), nº 02/096948 (Braslawsky *et al.*), nº 02/079255 (Reff y Davies), la patente US nº 6.171.586B1 y WO nº 98/56418 (Lam *et al.*), WO nº 98/58964 (Raju, S.), WO nº 99/22764 (Raju, S.), WO nº 99/51642, las patentes US nº 6.194.551B1, nº 6.242.195B1, nº 6.528.624B1 y nº 6.538.124 (Idusogie *et al.*), WO nº 00/42072 (Presta, L.), WO nº 00/67796 (Curd *et al.*), WO nº 01/03734 (Grillo-Lopez *et al.*), la solicitud de patente US nº 6.090.365B1, nº 6.287.537B1, nº 6.015.542, nº 5.843.398 y nº 5.595.721 (Kaminski *et al.*), las patentes US nº 5.500.362, nº 5.677.180, nº 5.721.108 y nº 6.120.767 (Robinson *et al.*), patente US nº 6.410.391B1 (Raubitschek *et al.*), US nº 6.224.866B1 y WO nº 00/20864 (Barbera-Guillem, E.), WO nº 01/13945 (Barbera-Guillem, E.), WO nº 00/67795 (Goldenberg), WO nº 00/74718 (Goldenberg y Hansen), WO nº 00/76542 (Golay *et al.*), WO nº 01/72333 (Wolin y Rosenblatt), US nº 6.368.596B1 (Ghetie *et al.*), la solicitud de patente US nº 2002/0041847A1 (Goldenberg, D.), la solicitud de patente US nº 2003/0026801A1 (Weiner y Hartmann), la patente WO nº 02/102312 (Engleman, E.). Ver también la patente US nº 5.849.898 y la solicitud de patente EP nº 330.191 (Seed *et al.*), la patente US nº 4.861.579 y EP nº 332.865A1 (Meyer y Weiss) y WO nº 95/03770 (Bhat *et al.*).

Entre las publicaciones referentes a la terapia con rituximab se incluyen: Perotta y Abuel, "Response of chronic relapsing ITP of 10 years duration to Rituximab", resumen nº 3360, *Blood* 10(1)(parte 1-2): página 88B, 1998; Stashi *et al.*, "Rituximab chimeric anti-CD20 monoclonal antibody treatment for adults with chronic idiopathic thrombocytopenic purpura", *Blood* 98(4):952-957, 2001; Matthews, R., "Medical Heretics", *New Scientist* (7 de abril de 2001), Leandro *et al.*, "Clinical outcome in 22 patients with rheumatoid arthritis treated with B lymphocyte depletion", *Ann. Rheum. Dis.* 61:833-833, 2002; Leandro *et al.*, "Lymphocyte depletion in rheumatoid arthritis: early evidence for safety, efficacy and dose response. Arthritis and tosos", *Arthritis & Rheumatism* 46(1):2673-2677, 2002; Edwards and Cambridge, "Sustained improvement in rheumatoid arthritis following a protocol designed to deplete B lymphocytes", *Rheumatology* 40:205-211, 2002; Edwards *et al.*, "B-lymphocyte depletion therapy in rheumatoid arthritis and other autoimmune disorders", *Biochem. Soc. Trans.* 30(4):824-828, 2002; Edwards *et al.*, "Efficacy and safety of Rituximab, a B-cell targeted chimeric monoclonal antibody: A randomized, placebo controlled trial in patients with rheumatoid arthritis", *Arthritis and Rheumatism* 46(9):S 197, 2002; Levine y Pestronk, "IgM antibody-related polyneuropathies: B-cell depletion chemotherapy using Rituximab", *Neurology* 52:1701-1704, 1991; DeVita *et al.*, "Efficacy of selective B cell blockade in the treatment of rheumatoid arthritis", *Arthritis & Rheum.* 46:2029-2033, 2002; Hidashida *et al.*, "Treatment of DMARD-Refractory rheumatoid arthritis with rituximab", presentado en el Annual Scientific Meeting of the American College of Rheumatology, 24 a 29 de octubre de 2002; Ne Orleans, LA; Tuscano, J., "Sucessful treatment of Infliximab-refractory rheumatoid arthritis with rituximab", presentado en el Scientific Meeting of the American College of Rheumatology, 24 a 29 de octubre de 2002, New Orleans, LA.

55 La artritis reumatoide (AR) es un trastorno autoinmunológico de etiología desconocida. La mayoría de pacientes de AR sufren un curso crónico de la enfermedad que, incluso con terapia, puede resultar en la progresiva destrucción articular, deformidad, discapacidad e incluso muerte prematura. Más de 9 millones de visitas médicas y más de 250.000 hospitalizaciones al año resultan de la AR. Los objetivos de la terapia de la AR son la prevención o el control 60 del daño articular, la prevención de la pérdida de función y la reducción del dolor. La terapia inicial de la AR habitualmente implica la administración de uno o más de los fármacos siguientes: fármacos antiinflamatorios no esteroideos (NSAIDs), glucocorticoides (mediante inyección en la articulación) y dosis bajas de prednisona (ver "Guidelines for the management of rheumatoid arthritis", *Arthritis & Rheumatism* 46(2):328-346, febrero de 2002). La mayoría de pacientes con AR nuevamente diagnosticada inician el tratamiento con terapia de fármaco antirreumático modificador 65 de la enfermedad (DMARD) dentro de los 3 meses del diagnóstico. Las DMARDs utilizadas comúnmente en la AR son la hidroxicloroquina, la sulfasalazina, el metotrexato, el leflunomido, el etanercept, el infliximab (más metotrexato oral y subcutáneo), la azatioprina, la D-penicilamina, oro (oral), oro (intramuscular), minociclina, ciclosporina, inmunoadsorción de proteína A estafilocócica.

# ES 2 322 267 T3

Debido a que el cuerpo produce factor alfa de necrosis tumoral (TNF $\alpha$ ) durante la AR, se han utilizado inhibidores de TNF $\alpha$  para la terapia de esta enfermedad.

5 El etanercept (ENBREL $^{\circledR}$ ) es un fármaco inyectable aprobado en los Estados Unidos para la terapia de la AR activa. El etanercept se une a TNF $\alpha$  y sirve para eliminar la mayor parte del TNF $\alpha$  de las articulaciones y de la sangre, evitando de esta manera que el TNF $\alpha$  estimula la inflamación y otros síntomas de la artritis reumatoide. El etanercept es una proteína de fusión “inmunoadhesina” consistente de la parte de unión al ligando extracelular del receptor del factor de necrosis tumoral (TNFR) humano de 75 kD (p75) ligado a la parte Fc de una IgG1 humana. El fármaco se ha asociado a efectos secundarios negativos, incluyendo infecciones graves y sepsis, trastornos del sistema nervioso, 10 tales como la esclerosis múltiple (MS) (ver, por ejemplo, [www.remicade-infliximab.com/pages/enbret\\_embrel.html](http://www.remicade-infliximab.com/pages/enbret_embrel.html)).

15 El infliximab, comercializado bajo el nombre comercial REMICADE $^{\circledR}$ , es un fármaco inmunosupresor prescrito para el tratamiento de la AR y de la enfermedad de Crohn. El infliximab es un anticuerpo monoclonal químérico que se une a TNF $\alpha$  y reduce la inflamación en el cuerpo mediante el reconocimiento y unión a TNF $\alpha$  que produce inflamación. El infliximab se ha ligado a reacciones fatales, tales como el fallo cardíaco e infecciones, incluyendo la tuberculosis, así como desmielinización que resulta en MS.

20 En diciembre de 2002, Abbott Laboratories recibió la aprobación de la FDA para comercializar adalimumab (HUMIRA $^{\text{TM}}$ ), conocida anteriormente como D2E7. El adalimumab es un anticuerpo monoclonal humano que se une a TNF $\alpha$  y se encuentra aprobado para la reducción de los indicios y síntomas y para inhibir la progresión de los 25 daños estructurales en adultos con AR moderada a severamente activa que han presentado una respuesta insuficiente a una o más DMARDs modificadores de enfermedad tradicionales.

## Descripción resumida de la invención

25 La presente invención proporciona la materia objeto reivindicada.

## Descripción detallada de las realizaciones preferentes

### I. Definiciones

30 Para los fines de la presente invención, la expresión “factor alfa de necrosis tumoral (TNF $\alpha$ )” se refiere a una molécula de TNF $\alpha$  humano que comprende la secuencia de aminoácidos tal como se describe en Pennica *et al.*, Nature 312:721, 1984, o Aggarwal *et al.*, JBC 260:2345, 1985.

35 Un “inhibidor de TNF $\alpha$ ” en la presente invención es un agente que inhibe, en cierto grado, una función biológica de TNF $\alpha$ , generalmente mediante la unión a TNF $\alpha$  y la neutralización de la actividad del mismo. Los ejemplos de inhibidores de TNF específicamente contemplados en la presente memoria son Etanercept (ENBREL $^{\circledR}$ ), Infliximab (REMICADE $^{\circledR}$ ) y Adalimumab (HUMIRA $^{\text{TM}}$ ).

40 La expresión “respuesta inadecuada a un inhibidor de TNF- $\alpha$ ” se refiere a una respuesta inadecuada al tratamiento anterior o actual con un inhibidor de TNF- $\alpha$  debido a toxicidad y/o eficacia inadecuada. Un médico experto en el tratamiento de la enfermedad en cuestión podrá evaluar la inadecuación de la respuesta.

45 Un mamífero que experimenta “toxicidad” de un tratamiento anterior o actual con el inhibidor de TNF- $\alpha$  experimenta uno o más efectos secundarios negativos asociados al mismo, tales como la infección (especialmente las infecciones graves), la insuficiencia cardíaca congestiva, la desmielinización (que conduce a esclerosis múltiple), la hipersensibilidad, sucesos neurológicos, la autoinmunidad, el linfoma no de Hodgkin, la tuberculosis (TB), autoanticuerpos, etc.

50 Un mamífero que experimenta “eficacia inadecuada” continua presentando una enfermedad activa tras un tratamiento anterior o actual con un inhibidor de TNF- $\alpha$ . Por ejemplo, el paciente puede presentar actividad de enfermedad activa tras 1 ó 3 meses de terapia con el inhibidor de TNF- $\alpha$ .

55 La expresión “reducir el riesgo de un efecto secundario negativo” se refiere a reducir el riesgo de un efecto secundario resultante de la terapia con un antagonista que se une a un marcador de superficie de células B en un grado inferior al observado con la terapia con un inhibidor de TNF $\alpha$ . Entre estos efectos secundarios se incluyen la infección (especialmente las infecciones graves), el fallo cardíaco y la desmielinización (esclerosis múltiple), etc.

60 Un “marcador de superficie de células B” de la presente invención es un antígeno expresado sobre la superficie de una célula B que puede ser reconocido por un antagonista que se une al mismo. Entre los marcadores de superficie de células B se incluyen los marcadores de superficie leucocitaria CD10, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD24, CD37, CD40, CD53, CD72, CD73, CD74, CDw75, CDw76, CD77, CDw78, CD79a, CD79b, CD80, CD81, CD82, CD83, CDw84, CD85 y CD86. El marcador de superficie de las células B de interés particular se expresa sobre células B preferentemente respecto a otros tejidos no de células B de un mamífero, y puede expresarse tanto sobre células B precursoras como sobre células B maduras. En la invención, el marcador es CD20, que se encuentra sobre células B durante toda la diferenciación del linaje, desde la etapa de célula madre hasta un punto inmediatamente anterior a la diferenciación terminal en células plasmáticas.

El antígeno “CD20” es una fosfoproteína no glucosilada de ~35 kDa que se encuentra sobre la superficie de más de 90% de las células B procedentes de sangre periférica o de órganos linfoides. CD20 se expresa durante el desarrollo temprano previo a las células B y continúa hasta la diferenciación en célula plasmática. CD20 se encuentra presente tanto en células B normales como en células B malignas. Entre otros nombres para CD20 en la literatura se incluyen 5 “antígeno restringido a linfocitos B” y “Bp35”. El antígeno CD20 se describe en Clark *et al.*, PNAS (USA) 82:1766, 1985, por ejemplo.

Una “enfermedad autoinmunológica” de la presente invención es una enfermedad o trastorno que surge de los propios tejidos del individuo y se dirige contra los mismos. Entre los ejemplos de enfermedades o trastornos autoinmuno- 10 lógicos se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, la artritis (artritis reumatoide, artritis reumatoide juvenil, osteoartritis, artritis soriásica), soriasis, dermatitis, polimiositis/dermatomiositis, necrolisis epidérmica tóxica, escleroderma sistémico y esclerosis, respuestas asociadas a: enfermedad intestinal inflamatoria, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, síndrome de distrés respiratorio, síndrome del distrés respiratorio adulto (ARDS), meningitis, encefalitis, uveitis, colitis, glomerulonefritis, condiciones alérgicas, eczema, asma, condiciones que implican la infiltración de células T y 15 respuestas inflamatorias crónicas, aterosclerosis, miocarditis autoinmunológica, deficiencia de adhesión de los leucocitos, lupus sistémico eritematoso (SLE), diabetes de aparición juvenil, esclerosis múltiple, encefalomielitis alérgica, respuestas inmunológicas asociadas a hipersensibilidad aguda y retardada mediada por citoquinas y linfocitos T, tuberculosis, sarcoidosis, granulomatosis, incluyendo granulomatosis de Wegener, agranulocitosis, vasculitis (incluyendo ANCA), anemia aplásica, anemia de Blackfan-Diamond, anemia hemolítica inmunológica, incluyendo la anemia hemolítica autoinmunológica (AIHA), anemia perniciosa, aplasia pura de glóbulos rojos (PRCA), deficiencia de factor 20 VIII, hemofilia A, neutropenia autoinmunológica, pancitopenia, leucopenia, enfermedades que implican la diapedesis leucocitaria, trastornos inflamatorios del sistema nervioso central (SNC), síndrome de disfunción orgánica múltiple, *miastenia gravis*, enfermedades mediadas por el complejo antígeno-anticuerpo, enfermedad antimembrana basal glomerular, síndrome del anticuerpo antifosfolípido, neuritis alérgica, enfermedad de Bechet, síndrome de Castleman, 25 síndrome de Goodpasture, síndrome miasténico de Lambert-Eaton, síndrome de Reynaud, síndrome de Sjögren, síndrome de Stevens-Johnson, rechazo del trasplante de órgano sólido, enfermedad de injerto contra huésped (GVHD), penfigoide bulloso, penfigo, poliendocrinopatías autoinmunológicas, enfermedad de Reiter, síndrome de la persona rígida, arteritis de células gigantes, nefritis del complejo inmunológico, nefropatía de IgA, polineuropatías de IgM o neuropatía mediada por IgM, púrpura trombocitopénica idiopática (ITP), púrpura trombocitopénica trombótica (TTP), 30 trombocitopenia autoinmunológica, enfermedad autoinmunológica de los testículos y del ovario, incluyendo orquitis y ooforitis autoinmunológicas, hipotiroidismo primario; enfermedades endocrinas autoinmunológicas, incluyendo tiroiditis autoinmunológica, tiroiditis crónica (tiroiditis de Hashimoto), tiroiditis subaguda, hipotiroidismo idiopático, enfermedad de Addison, enfermedad de Grave, síndromes poliglandulares autoinmunológicos (o síndromes de endocrinopatía poliglandular), diabetes de tipo I, también denominada diabetes mellitus insulino-dependiente (IDDM) 35 y síndrome de Sheehan; hepatitis autoinmunológica, neumonitis intersticial linfoide (HIV), bronquiolitis obliterans (no de trasplante) frente a NSIP, síndrome de Guillain-Barre, vasculitis de los vasos grandes (incluyendo polimialgia reumática y arteritis de células gigantes (de Takayasu), vasculitis de vasos medianos (incluyendo la enfermedad de Kawasaki y la poliarteritis nodosa), espondilitis anquilosante, enfermedad de Berger (nefropatía de IgA), glomerulonefritis de progresión rápida, cirrosis biliar primaria, celiaquía (enteropatía por gluten), crioglobulinemia, esclerosis 40 lateral amiotrófica (ALS), enfermedad arterial coronaria, etc.

Un “antagonista” es una molécula que, tras unirse a un marcador de superficie de células B, destruye o reduce el número de células B en un mamífero. El mamífero preferentemente es capaz de reducir el número de células B (es decir, reducir los niveles de células B circulantes) en un mamífero tratado con dicha molécula. Esta reducción de 45 niveles puede conseguirse mediante diversos mecanismos, tales como la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC) y/o citotoxicidad dependiente del complemento (CDC), inhibición de la proliferación de las células B y/o inducción de la muerte de las células B (por ejemplo mediante apoptosis). Entre los antagonistas incluidos dentro del alcance de la presente invención se encuentran los anticuerpos.

50 La expresión “citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos” y “ADCC” se refieren a una reacción mediada por células en la que las células citotóxicas no específicas que expresan receptores Fc (FcRs) (por ejemplo células asesinas naturales (NK), neutrófilos y macrófagos) reconocen anticuerpos unidos sobre una célula diana y posteriormente causan la lisis de la célula diana. Las células primarias para mediar en la DCC, las células NK, expresan únicamente Fc $\gamma$ RIII, mientras que los monocitos expresan Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RII y Fc $\gamma$ RIII. La expresión de FcR sobre las 55 células hematopoyéticas se resume en la Tabla 3, en la página 464 de Ravetch y Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9:457-92, 1991. Para evaluar la actividad de ADCC de una molécula de interés, puede llevarse a cabo un ensayo ADCC *in vitro*, tal como el descrito en las patentes US nº 5.500.362 o nº 5.821.337. Entre las células efectoras útiles para dichos ensayos se incluyen las células sanguíneas mononucleares de sangre periférica (PBMC) y las células asesinas naturales (NK). Alternativamente, o adicionalmente, la actividad de ADCC de la molécula de interés puede evaluarse 60 *in vivo*, por ejemplo en un modelo animal tal como el dado a conocer en Clynes *et al.*, PNAS (USA) 95:652-656, 1998.

65 Las “células efectoras humanas” son leucocitos que expresan uno o más FcRs y llevan a cabo funciones efectoras. Preferentemente las células expresan por lo menos Fc $\gamma$ RIII y llevan a cabo la función efectora de ADCC. Entre los ejemplos de leucocitos humanos que median en la ADCC se incluyen las células mononucleares de sangre periférica (PBMC), las células asesinas naturales (NK), los monocitos, las células T citotóxicas y los neutrófilos, siendo preferentes las PBMCs y las NK.

Las expresiones “receptor Fc” o “FcR” se utilizan para describir un receptor que se une a la región Fc de un anticuerpo. El FcR preferente es un FcR humano de secuencia nativa. Además, un FcR preferente es uno que se une a un anticuerpo GI (un receptor gamma) e incluye receptores de las subclases Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RII y Fc $\gamma$ RIII, incluyendo las variantes alélicas y las formas alternativamente procesadas de estos receptores. Entre los receptores Fc $\gamma$ RII se incluyen 5 Fc $\gamma$ RIIA (un “receptor activador”) y Fc $\gamma$ RIIB (un “receptor inhibidor”) que presentan secuencias de aminoácidos similares que difieren principalmente en los dominios citoplasmáticos de los mismos. El receptor activador Fc $\gamma$ RIIA contiene un motivo de activación de inmunoreceptor basado en tirosina (ITAM) en el dominio citoplasmático del mismo. El receptor inhibidor Fc $\gamma$ RIIB contiene un motivo de inhibición de inmunoreceptor basado en tirosinas (ITIM) en el dominio citoplasmático del mismo (ver Daëron, *Annu. Rev. Immunol.* 15:203-234, 1997). Los FcR se revisan en 10 Ravetch y Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-92, 1991; Capel *et al.*, *Immunomethods* 4:25-34, 1994; y de Haas *et al.*, *J. Lab. Clin. Med.* 126:330-41, 1995. Otros FcRs, incluyendo aquellos que se identifiquen en el futuro, se encuentran comprendidos en el término “FcR” en la presente invención. El término también incluye el receptor neonatal, FcRn, que es responsable de la transferencia de IgGs maternas al feto (Guyer *et al.*, *J. Immunol.* 117:587, 1976, y Kim *et al.*, *J. Immunol.* 24:249, 1994).

15 La expresión “citotoxicidad dependiente del complemento”, o “CDC”, se refiere a la capacidad de una molécula de lisar una diana en presencia del complemento. La ruta de activación del complemento se inicia mediante la unión del primer componente del sistema de complemento (C1q) a una molécula (por ejemplo un anticuerpo) acomplejado con un antígeno afín. Para evaluar la activación del complemento puede llevarse a cabo un ensayo de CDC, por ejemplo 20 tal como se describe en Gazzano-Santoro *et al.*, *J. Immunol. Methods* 202:163, 1996.

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

30 Los antagonistas que “inducen apoptosis” son aquellos que inducen la muerte celular programada, por ejemplo de una célula B, según se determina mediante ensayos estándares de apoptosis, tales como la unión de anexina V, la fragmentación del ADN, el encogimiento celular, la dilatación del retículo endoplasmático, la fragmentación celular y/o la formación de vesículas membranales (denominadas cuerpos apoptóticos).

35 El término “anticuerpo” en la presente invención se utiliza en el sentido más amplio y cubre específicamente los anticuerpos monoclonales intactos, los anticuerpos policlonales, los anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo los anticuerpos biespecíficos) formados a partir de por lo menos dos anticuerpos intactos, y fragmentos de anticuerpo con la condición de que muestren la actividad biológica deseada.

40 Los “fragmentos de anticuerpo” comprenden una parte de un anticuerpo intacto, preferentemente comprendiendo la región de unión a antígeno o región variable del mismo. Entre los ejemplos de fragmentos de anticuerpo se incluyen Fab, Fab’, F(ab’)<sub>2</sub> y fragmentos Fv; diacuerpos; anticuerpos lineales; moléculas de anticuerpo monocatenario y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpo.

45 Los “anticuerpos nativos” habitualmente son glucoproteínas heterotetraméricas de aproximadamente 150.000 daltons, compuestas de dos cadenas ligeras (L) idénticas y dos cadenas pesadas (H) idénticos. Cada cadena ligera se une a una cadena pesada mediante un enlace covalente disulfuro, mientras que el número de enlaces disulfuro varía según las cadenas pesadas de los diferentes isotipos de inmunoglobulina. Cada cadena pesada y ligera también presenta puentes 50 disulfuro intracadena regularmente espaciados. Cada cadena pesada presenta en un extremo un dominio variable (V<sub>H</sub>) seguido de varios dominios constantes. Cada cadena ligera presenta un dominio variable en un extremo (V<sub>L</sub>) y un dominio constante en el otro extremo; el dominio constante de la cadena ligera se encuentra alineado con el primer dominio constante de la cadena pesada, y el dominio variable de cadena ligera se encuentra alineado con el dominio variable de la cadena pesada. Se cree que residuos aminoácidos particulares forman una interfaz entre los dominios variables de cadena ligera y de cadena pesada.

55 El término “variable” se refiere al hecho de que determinadas partes de los dominios variables difieren extensivamente en su secuencia entre anticuerpos y se utilizan en la unión y especificidad de cada anticuerpo particular para su antígeno particular. Sin embargo, la variabilidad no se encuentra uniformemente distribuida en todos los dominios variables de los anticuerpos. Se encuentra concentrada en tres segmentos denominados regiones hipervariables en los dominios variables tanto de la cadena ligera como de la cadena pesada. Las partes más latamente conservadas de los dominios variables se denominan regiones marco (FRs). Los dominios variables de las cadenas pesadas y 60 ligeras nativas comprenden, cada una, cuatro FRs, adoptando mayoritariamente una configuración de hoja  $\beta$ , conectados mediante tres regiones hipervariables, que forman bucles que conectan la estructura de hoja  $\beta$ , y en algunos casos forman parte de la misma. Las FRs mantienen en estrecha proximidad las regiones hipervariables presentes en cada cadena y, conjuntamente con las regiones hipervariables de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión a antígeno de los anticuerpos (ver Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5a edición, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991). Los dominios constantes 65 no se encuentran implicados directamente en la unión de un anticuerpo a un antígeno, sino que muestran diversas funciones efectoras, tales como la participación del anticuerpo en citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC).

La digestión con papaína de los anticuerpos produce dos fragmentos de unión a antígeno idénticos, denominados fragmentos “Fab”, cada uno de los cuales presenta un único sitio de unión a antígeno y un fragmento “Fc” residual, nombre que refleja la capacidad del mismo de cristalizar fácilmente. El tratamiento de pepsina rinde un fragmento F(ab')<sub>2</sub> que presenta dos sitios de unión a antígeno y todavía es capaz de entrecruzar antígeno.

- 5 El término “Fv” se refiere al fragmento mínimo de anticuerpo que contiene un sitio completo de reconocimiento de antígeno y de unión de antígeno. Esta región consiste de un dímero de un dominio variable de cadena pesada y uno de cadena ligera en estrecha asociación no covalente. En esta configuración las tres regiones hipervariables de cada dominio variable interaccionan, definiendo un sitio de unión de antígeno sobre la superficie del dímero V<sub>H</sub>-V<sub>L</sub>.
- 10 10 Colectivamente las seis regiones hipervariables proporcionan especificidad de unión de antígeno al anticuerpo. Sin embargo, incluso un único dominio variable (o la mitad de un Fv que comprenda únicamente tres regiones hipervariables específicas para un antígeno) presenta la capacidad de reconocer y unirse a un antígeno, aunque a una afinidad menor que el sitio de unión completo.
- 15 15 El fragmento Fab también contiene el dominio constante de la cadena ligera y el primer dominio constante (CH1) de la cadena pesada. Los fragmentos Fab' difieren de los fragmentos Fab en la adición de unos cuantos residuos en el extremo carboxi-terminal del dominio CH1 de cadena pesada, incluyendo una o más cisteínas de la región bisagra del anticuerpo. Fab'-SH es la denominación en la presente invención para Fab', en el que el residuo o residuos de cisteína de los dominios constantes portan por lo menos un grupo tiol libre. Se produjeron originalmente fragmentos 20 20 F(ab')<sub>2</sub> de anticuerpo en forma de pares de fragmentos Fab' que presentaban cisteínas de bisagra entre ellos. También se conocen otros acoplamientos químicos de fragmentos de anticuerpo.

Las “cadenas ligeras” de los anticuerpos (inmunoglobulinas) procedentes de cualquier especie de vertebrado pueden asignarse a dos tipos claramente diferentes, denominados kappa (κ) y lambda (λ) basándose en la secuencias de 25 aminoácidos de los dominios constantes de los mismos.

Dependiendo de la secuencia de aminoácidos del dominio constante de las cadenas pesadas, los anticuerpos pueden asignarse a diferentes clases. Existen cinco clases importantes de anticuerpos intactos: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM y varios de ellos pueden dividirse además en subclases (isotipos), por ejemplo IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA e IgA2. 30 30 Los dominios constantes de cadena pesada que corresponden a las diferentes clases de anticuerpos se denominan α, δ, ε, γ y μ, respectivamente. Las estructuras de las subunidades y las configuraciones tridimensionales de las diferentes clases de inmunoglobulinas son bien conocidas.

Los fragmentos de anticuerpo “Fv monocatenario” o “scFv” comprenden los dominios VH y VL del anticuerpo, 35 en los que estos dominios se encuentran presentes en una única cadena polipeptídica. Preferentemente el polipéptido Fv comprende además un linker polipeptídico entre los dominios VH y VL que permite que el scFv forme la estructura deseada para la unión de antígeno (para una revisión de scFv ver Plückthun, en: *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenburg y Moore, editores, Springer-Verlag, New York, páginas 269 a 315, 1994).

40 40 El término “diacuerpos” se refiere a fragmentos pequeños de anticuerpo con dos sitios de unión de anticuerpo, comprendiendo dichos fragmentos un dominio variable de cadena pesada (VH) conectado a un dominio variable de cadena ligera (VUJ) en la misma cadena polipeptídica (VH-VL). Mediante la utilización de un linker excesivamente corto para permitir el apareamiento entre los dos dominios en la misma cadena, se fuerza el apareamiento de los dominios con los dominios complementarios de otra cadena y la creación de dos sitios de unión de antígeno. Se describen 45 45 los diacuerpos más completamente, por ejemplo, en las patentes EP nº 404.097, WO nº 93/11161, y Hollinger *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448, 1993.

La expresión “anticuerpo monoclonal” tal como se utiliza en la presente invención se refiere a un anticuerpo obtenido a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogénea, es decir, los anticuerpos individuales que 50 50 comprende la población son idénticos excepto por posibles mutaciones naturales que pueden encontrarse presentes en cantidades reducidas. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, al dirigirse contra un único sitio antigénico. Además, en contraste con las preparaciones de anticuerpos convencionales (políclonales), que típicamente incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítopos), cada anticuerpo monoclonal se dirige contra un único determinante en el antígeno. Además de su especificidad, los anticuerpos monoclonales resultan 55 55 ventajosos en el aspecto de que se sintetizan mediante el cultivo de hibridoma, no contaminados por otras inmunoglobulinas. El modificador “monoclonal” indica el carácter del anticuerpo, como obtenido a partir de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, y no debe interpretarse como que requiere la producción del anticuerpo mediante cualquier procedimiento particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales que deben utilizarse de acuerdo con la presente invención pueden prepararse mediante el procedimiento de hibridoma descrito por primera vez por Kohler *et al.*, Nature 256:495, 1975, o pueden prepararse mediante procedimientos de ADN recombinante (ver, por ejemplo, la patente US nº 4.816.567). Los “anticuerpos monoclonales” también pueden aislarse a partir de bibliotecas fágicas de anticuerpos utilizando las técnicas descritas en Clackson *et al.*, Nature 352:624-628, 1991, y en Marks *et al.*, J. Mol. Biol. 222:581-597, 1991, por ejemplo.

65 65 Los anticuerpos monoclonales de la presente invención específicamente incluyen anticuerpos “químéricos” (inmunoglobulinas) en las que una parte de la cadena pesada y/o ligera es idéntica u homóloga respecto a secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de una especie particular o perteneciente a una clase o subclase particular de anticuerpos, mientras que el resto de la cadena o cadenas es idéntico u homólogo a las secuencias correspondientes

en anticuerpos derivados de otra especie o perteneciente a otra clase o subclase de anticuerpo, así como fragmentos de dichos anticuerpos, con la condición de que muestren la actividad biológica deseada (patente US nº 4.816.567; Morrison *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851-6855, 1984). Entre los anticuerpos quiméricos de interés de la presente invención se incluyen anticuerpos “primatizados” que comprenden secuencias de dominio variable de unión a un antígeno derivadas de un primate no humano (por ejemplo monos del viejo mundo, tales como babuinos, monos rhesus o mono cynomolgus) y secuencias de región constante humana (patente US nº 5.693.780).

Las formas “humanizadas” de anticuerpos no humanos (por ejemplo murinos) son anticuerpos quiméricos que contienen una secuencia mínima derivada de una inmunoglobulina no humana. Mayoritariamente los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que se han sustituido residuos procedentes de una región hipervariable del receptor por residuos de una región hipervariable de una especie no humana (anticuerpo donante), tal como el ratón, la rata, el conejo o un primate no humano que presente la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, se sustituyen residuos de región marco (FR) de la inmunoglobulina humana por los residuos no humanos correspondientes. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender residuos que no se encuentran en el anticuerpo receptor o en el anticuerpo donante. Estas modificaciones se realizan para afinar adicionalmente el comportamiento del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprende sustancialmente la totalidad de por lo menos un dominio variable, y típicamente de dos, en los que la totalidad o sustancialmente la totalidad de los bucles hipervariables corresponde a los de una inmunoglobulina no humana, y la totalidad o sustancialmente la totalidad de los FRs es de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado opcionalmente también comprende por lo menos una parte de la región constante de una inmunoglobulina (Fc), típicamente la de una inmunoglobulina humana. Para más detalles ver Jones *et al.*, Nature 321:522-525, 1986; Riechmann *et al.*, Nature 332:323-329, 1988, y Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596, 1992.

La expresión “región hipervariable” tal como se utiliza en la presente invención se refiere a los residuos aminoácidos de un anticuerpo que son responsables de la unión de antígeno. La región hipervariable comprende residuos aminoácidos de una “región determinante de complementariedad” o “CDR” (por ejemplo los residuos 24 a 34 (L1), 50 a 56 (L2) y 89 a 97 (L3) en el dominio variable de cadena ligera, y 31 a 35 (H1), 50 a 65 (H2) y 95 a 102 (H3) en el dominio variable de cadena pesada; Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5a edición, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991, y/o aquellos residuos de un “bucle hipervariable” (por ejemplo los residuos 26 a 32 (L1), 50 a 52 (L2) y 91 a 96 (L3) en el dominio variable de cadena ligera, y 26 a 32 (H1), 53 a 55 (H2) y 96 a 101 (H3) en el dominio variable de cadena pesada; Chothia y Lesk, J. Mol. Biol. 196:901-917, 1987). Los residuos “de marco” o “FR” son aquellos residuos de dominio variable diferentes de los residuos de región hipervariable tal como se definen en la presente invención.

Un antagonista que “se une” a un antígeno de interés, por ejemplo a un marcador de superficie de las células B, es un marcador capaz de unirse al antígeno que presente suficiente afinidad y/o avidez, de manera que el antagonista resulte útil como agente terapéutico para el reconocimiento de una célula que expresa el antígeno.

Entre los ejemplos de anticuerpos que se unen al antígeno CD20 se incluyen: “C2B8”, que ahora se denomina “rituximab” (“RITUXAN®”, patente US nº 5.736.137), el anticuerpo murino 2B8 marcado con itrio-[90] denominado “Y2B8” (patente US nº 5.736.137), IgG2a “B1” murino opcionalmente marcado con 131I, generando el anticuerpo “131I-B1” (BEXXAR TM (patente US nº 5.595.721), el anticuerpo monoclonal murino “1F5” (Press *et al.*, Blood 69 (2):584-591, 1987), anticuerpo 2H7 quimérico (patente US nº 5.677.180), 2H7 v16 humanizado (ver posteriormente), huMax-CD20 (Genmab, Dinamarca), AME-133 (Applied Molecular Evolution) y anticuerpo monoclonales L27, G28-2, 93-1B3, B-C1 o NU-B2, disponibles de International Leukocyte Typing Workshop (Valentine *et al.*, en: Leukocyte Typing III (NtchMichael, editor, página 440, Oxford University Press, 1987).

Los términos “rituximab” o “RITUXAN®” en la presente invención se refieren al anticuerpo monoclonal quimérico murino/humano modificado genéticamente dirigido contra el antígeno CD20 y denominado “C2B8” en la patente US nº 5.736.137. El anticuerpo es una inmunoglobulina kappa de IgG1 que contiene secuencias de región variable murinas de cadena ligera y de cadena pesada y secuencias de región constante humana. El rituximab presenta una afinidad de unión para el antígeno CD20 de aproximadamente 8,0 nM.

Puramente para los fines de la presente invención, la expresión “2H7 v16 humanizado” se refiere a un anticuerpo que comprende las secuencias variables ligera y pesada mostradas posteriormente.

El dominio variable de cadena ligera de hu2H7 v16:

60

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITCRASSSVSYMHWYQQKPGKAPKPLIYAPSNL  
ASGVPSRFSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCQQWSFNPPFGQGTKVEIKR (SEQ  
65 ID NO:1)

El dominio variable de cadena pesada de hu2H7 v16:

5                   EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMHWVRQAPGKGLEWVGAI  
 YPGNGDTSYNQKFKGRFTISVDKSNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVYYYSNSYW  
 10                YFDVWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 2)

10 Preferentemente, 2H7 v16 humanizado comprende la secuencia de aminoácidos de cadena ligera siguiente:

15                   DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASSSVSYMHWYQQKPGKAPKPLIYAPSNLASGVP  
 SRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCQQWSFNPPFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFP  
 20                PSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSL  
 STLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 3);

y la secuencia de aminoácidos de cadena pesada siguiente:

25                   EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMHWVRQAPGKGLEWVGAIYPGNG  
 DTSYNNQKFKGRFTISVDKSNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVYYYSNSYWYFDV  
 30                WGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGTAALGCLVKDYFPEPVTVWSNSGALT  
 SGVHTFPVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDK  
 35                THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD  
 GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS  
 KAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT  
 40                PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ  
 ID NO: 4).

45                Un antagonista “aislado” es uno que ha sido identificado y separado y/o recuperado respecto a un componente de su ambiente natural. Los componentes contaminantes de su ambiente natural son materiales que interferirían con los usos diagnósticos o terapéuticos del antagonista, y pueden incluir enzimas, hormonas y otros solutos proteicos o no proteicos. En realizaciones preferentes, el antagonista se purifica (1) hasta más de 95% en peso de antagonista según se determina mediante el procedimiento de Lowry, y más preferentemente hasta más de 99% en peso, (2) hasta un grado suficiente para obtener por lo menos 15 residuos de secuencia de aminoácidos N-terminal o interna mediante la utilización de un secuenciador de taza giratoria, o (3) hasta la homogeneidad mediante SDS-PAGE bajo condiciones 50 reductoras o no reductoras utilizando azul de Coomassie o, preferentemente, tinción de plata. El antagonista aislado incluye el antagonista *in situ* dentro de células recombinantes debido a que por lo menos un componente del ambiente natural del antagonista no se encontrará presente. Sin embargo, habitualmente el antagonista aislado se prepara mediante por lo menos una etapa de purificación.

55                El término “mamífero” para los fines del tratamiento se refiere a cualquier animal clasificado como mamífero, incluyendo seres humanos, animales domésticos y de granja, y animales de zoológico, de competición o de compañía, tales como perros, caballos, gatos, vacas, etc. Preferentemente el mamífero es un ser humano.

60                El término “tratamiento” se refiere tanto al tratamiento terapéutico como a medidas profilácticas o preventivas. Entre aquellos que necesitan tratamiento se incluyen aquellos que ya presentan la enfermedad o trastorno, así como aquellos en los que debe prevenirse la enfermedad o trastorno. Por lo tanto, puede diagnosticarse que el mamífero presenta la enfermedad o trastorno o que se encuentra predispuesto o es susceptible frente a la enfermedad.

65                La expresión “cantidad terapéuticamente eficaz” se refiere a una cantidad del antagonista que resulta eficaz para prevenir, mejorar o tratar la enfermedad autoinmunológica en cuestión.

La expresión “agente inmunosupresor” tal como se utiliza en la presente invención para terapia complementaria se refiere a sustancias que actúan suprimiendo o enmascarando el sistema inmunológico del mamífero bajo tratamiento de la presente invención. Entre éstas se incluyen sustancias que suprimen la producción de citoquinas, regulan negativamente o suprimen la expresión de autoantígenos o enmascaran los antígenos del MHC. Entre los ejemplos de dichos agentes se incluyen pirimidinas 2-amino-6-aryl-5-sustituidas (ver la patente US nº 4.665.077), fármacos anti-inflamatorios no esteroideos (NSAIDs), azatioprina, ciclofosfamida, bromocriptina, danazol, dapsona, glutaraldehído (que enmascara los antígenos del MHC, tal como se describe en la patente US nº 4.120.649), anticuerpos antiidiotípicos para antígenos del MHC y fragmentos del MHC, ciclosporina A, esteroides tales como glucocorticoesteroideos, por ejemplo prednisona, metilprednisolona y dexametasona, metotrexato (oral o subcutáneo), hidroxicloroquina, sulfasalazina, leflunómido, antagonistas de citoquina o de receptor de citoquina, incluyendo anti-interferón  $\gamma$ ,  $\beta$  o  $\alpha$ , anticuerpos anti-factor  $\alpha$  de necrosis tumoral (infliximab y adalimumab), inmunoadhesina anti-TNF $\alpha$  (etanercept), anticuerpos anti-factor  $\beta$  de necrosis tumoral, anticuerpos anti-interleuquina 2 y anticuerpos anti-receptor de IL-2, anticuerpos anti-LFA-1, incluyendo anticuerpos anti-CD3 o anti-CD4/CD4a, péptido soluble que contiene un dominio de unión LFA-3 (patente WO nº 90/08187, publicada el 26 de julio de 1990), estreptoquinasa, TGF- $\beta$ , estreptodornasa, ARN o ADN del huésped, FK506, RS-61443, desoxispergualina, rapamicina, receptor de células T (Cohen *et al.*, patente US nº 5.114.721), fragmentos de receptor de células T (Offner *et al.*, Science 251:430-432, 1991; patente WO nº 90/11294; Laneway, Nature 341:482, 1989; y patente WO nº 91/01133) y anticuerpos de receptor de células T (patente EP nº 340.109), tales como T10B9.

La expresión “agente citotóxico” tal como se utiliza en la presente invención se refiere a una sustancia que inhibe o impide la función de las células y/o causa la destrucción de las mismas. El término pretende incluir isótopos radioactivos (por ejemplo At<sup>211</sup>, I<sup>131</sup>, I<sup>125</sup>, Y<sup>90</sup>, Re<sup>186</sup>, Re<sup>188</sup>, Sm<sup>153</sup>, Bi<sup>212</sup>, P<sup>32</sup> e isótopos radioactivos de Lu), agentes quimioterapéuticos y toxinas, tales como toxinas de molécula pequeña o toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, o fragmentos de las mismas.

Un “agente quimioterapéutico” es un compuesto químico que resulta útil en el tratamiento del cáncer. Entre los ejemplos de agentes quimioterapéuticos se incluyen agentes alquilantes, tales como tiotepa y ciclofosfamida (CYTOXAN™), alquilsulfonatos, tales como busulfán, improsulfán y piposulfán; aziridinas, tales como benzodopa, carboquona, meturedopa y uredopa; etileniminas y metilmelaminas, incluyendo altretamina, trietilenmelamina, trietilenfosforamida, trietilenfosfaoramida y trimetilololomelamina; mostazas nitrogenadas, tales como clorambucilo, clornafazina, colofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, hidrocloruro de óxido de mecloretamina, mel-falán, novembichina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, mostaza uracilo; nitrosureas, tales como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina, ranimustina; antibióticos, tales como aclacinomisinas, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, caliqueamicina, carabicina, carminomicina, carzinofilina, cromomicinas, dactinomicina, daunorubicina, detorubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, doxorubicina, epirubicina, esorubicina, idarubicina, marcelomicina, mitomicinas, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomicina, potfiromicina, puromicina, quelamicina, rodrorubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinos-tatina, zorubicina; antimetabolitos, tales como metotrexato y 5-fluorouracilo (5-FU); análogos del ácido fólico, tales como denopterina, metotrexato, pteropterina, trimetrexato; análogos de purina, tales como fludarabina, 6-mercaptopurina, tiamiprina, tioguanina; análogos de pirimidina, tales como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, dideoxiuridina, doxifluridina, enocitabina, floxuridina, 5-FU; andrógenos, tales como calusterona, propionato de dromostanolona, epitiostanol, mepitiostano, testolactona; anti-adrenales, tales como aminoglutetimida, mitotano, trilostano; reabastecedor de ácido fólico, tales como ácido frolínico; aceglatona; glucósido de aldofosfamida; ácido aminolevulínico; amsacxrina; bestrabucilo; bisantreno; edatraxato; defofamina; demelcolcicina; diaziquona; elfornitina; acetato de eliptinio; etoglúcido; nitrato de galio; hidroxiurea; lentinano; lonidamina; mitoguazona; mitoxantrona; mopidamol; nitracrina; pentostatina; fenamet; pirarubicina; ácido podofilínico; 2-etilhidrácido; procarbazina; PSK®; razoxano; sizofirán; espirogermanio; ácido tenuazónico; triaziquona; 2,2',2"-triclorotrietilamina; uretán; vindesina; dacarbazina; manomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobromán; gacitosina; arabinósido (“Ara-C”); ciclofosfamida; tiotepa; taxoides, por ejemplo paclitaxel (TAXOL®, Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, NJ) y doxetaxel (TAXOTERE®, Rh&ocirc;ne-Poulenc Rorer, Antony, Francia); clorambucilo; gemcitabina; 6-tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; análogos del platino, tales como cisplatino y carboplatino; vinblastina; platino; etopósido (VP-16); ifosfamida; mitomicina C; mitoxantrona; vincristina; vinorelbina; navelbina; novantrona; tenipósido; daunomicina; aminopterina; xeloda; ibandronato; CPT-11; inhibidor de topoisomerasa RFS 2000; difluorometilornitina (DMFO); ácido retinoico; esperamicinas; capecitabina y sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los compuestos anteriormente indicados. También se encuentran incluidos en la presente definición agentes antihormonales que actúan regulando o inhibiendo la acción hormonal sobre los tumores, tales como los antiestrógenos, incluyendo, por ejemplo, tamoxifeno, raloxifeno, 4(5)-imidazolas inhibidoras de aromatasa, 4-hidroxiamoxifeno, trioxifeno, queoxifeno, LY117018, onapristona y toremifeno (Fareston) y antiandrógenos, tales como flutamida, nilutamida, bicalutamida, leuprórido y goserelina; y sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los compuestos anteriormente indicados.

El término “citoquina” es un término genérico para las proteínas liberadas por una población celular que actúa sobre otra célula como mediadores intercelulares. Son ejemplos de dichas citoquinas las linfoquinas, monoquinas y hormonas polipeptídicas tradicionales. Se encuentran incluidas entre las citoquinas hormona del crecimiento, tal como hormona del crecimiento humana, N-metionil hormona del crecimiento humana y hormona del crecimiento bovina; hormona paratiroidea; tiroxina; insulina; proinsulina; relaxina; prorelaxina; hormonas glucoproteínas, tales como hormona folículo-estimulante (FSH), hormona estimulante del tiroides (TSH) y hormona luteinizante (LH); factor de crecimiento hepático; factor de crecimiento fibroblástico; prolactina; lactógeno placentario; factores  $\alpha$  y  $\beta$

de necrosis tumoral; sustancia inhibidora mulleriana; péptido asociado a gonadotropina de ratón; inhibina; activina; factor de crecimiento endotelial vascular; integrina; trombopoyetina (TPO); factores de crecimiento nervioso, tales como NGF- $\beta$ ; factor de crecimiento plaquetario; factores de crecimiento transformante (TGFs), tales como TGF- $\alpha$  y TGF- $\beta$ ; factores I y II de crecimiento similares a insulina; eritropoyetina (EPO); factores osteoinductores; interferones, tales como interferón  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ , factores estimulantes de colonias (CSFs), tales como CSF de macrófagos (M-CSF); CSF de granulocitos-macrófagos (GM-CSF) y CSF de granulocitos (G-CSF); interleuquinas (ILs), tales como IL-1, IL-1 $\alpha$ , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-11, IL-12, IL-15; un factor de necrosis tumoral, tal como TNF- $\alpha$  o TNF- $\beta$ , y otros factores polipeptídicos, incluyendo LIF y ligando kit (KL). Tal como se utiliza en la presente invención, el término citoquina incluye proteínas de fuentes naturales o de cultivo celular recombinante y equivalentes biológicamente activos de las citoquinas de secuencia nativa.

El término "profármaco" tal como se utiliza en la presente solicitud se refiere a una forma precursora o derivada de una sustancia farmacéuticamente activa que es menos citotóxica para las células tumorales que el fármaco parental y es capaz de ser activado o convertido enzimáticamente en la forma parental más activa (ver, por ejemplo, Wilman, "Prodrugs in Cancer Chemotherapy", Biochemical Society Transactions 14:375-382, 615th Meeting, Belfast, 1986, y Stella *et al.*, "Prodrugs: A Chemical Approach to Targeted Drug Delivery", Directed Drug Delivery, Borchardt *et al.* (editor), páginas 247 a 267, Humana Press, 1985. Entre los profármacos de la presente invención se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, profármacos que contienen fosfato, profármacos que contienen tiofosfato, profármacos que contienen sulfato, profármacos que contienen péptidos, profármacos de D-aminoácidos modificados, profármacos glucosilados, profármacos que contienen  $\beta$ -lactamo, profármacos que contienen fenoxyacetamida opcionalmente sustituida o profármacos que contienen fenilacetamida opcionalmente sustituida, 5-fluorocitosina y otros profármacos 5-fluorouridina que pueden convertirse en el fármaco libre citotóxico más activo. Entre los ejemplos de fármacos citotóxicos que pueden derivatizarse en una forma profármaco para la utilización en la presente invención se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, aquellos agentes quimioterapéuticos indicados anteriormente.

Un "liposoma" es una vesícula pequeña compuesta de diversos tipos de lípidos, fosfolípidos y/o surfactante que resulta útil para la administración de un fármaco (tal como los antagonistas dados a conocer en la presente invención y, opcionalmente, un agente quimioterapéutico) en un mamífero. Los componentes del liposoma se disponen comúnmente en una formación de bicapa, similar a la disposición de los lípidos de las membranas biológicas.

## II. Producción de antagonistas

Los procedimientos y productos manufacturados de la presente invención utilizan o incorporan un antagonista que se une a un marcador de superficie de las células B. Por consiguiente, en la presente memoria se describen procedimientos para generar dichos antagonistas.

El marcador de superficie de las células B que debe utilizarse para la producción o cribado de uno o más antagonistas puede ser, por ejemplo, una forma soluble del antígeno o una parte del mismo, que contiene el epítopo deseado. Alternativamente, o adicionalmente, las células que expresan el marcador de superficie de las células B en la superficie celular de las mismas pueden utilizarse para generar o cribar uno o más antagonistas. Otras formas del marcador de superficie de las células B que resulta útil para generar antagonistas resultarán evidentes para el experto en la materia. El marcador de superficie de las células B es el antígeno CD20.

El antagonista es un anticuerpo.

A continuación se proporciona una descripción de las técnicas ejemplares para la producción de los antagonistas anticuerpos utilizados de acuerdo con la presente invención.

### (i) Anticuerpos policlonales

Los anticuerpos policlonales preferentemente se cultivan en animales mediante múltiples inyecciones subcutáneas (sc) o intraperitoneales (ip) del antígeno relevante y un adyuvante. Puede resultar útil conjugar el antígeno relevante con una proteína que es inmunogénica en la especie que debe inmunizarse, por ejemplo hemocianina de lapa americana, albúmina sérica, tiroglobulina bovina o inhibidor de tripsina de soja utilizando un agente bifuncional o derivatizante, por ejemplo éster sulfosuccinimida de maleimidobenzoilo (conjugación mediante residuos de cisteína), N-hidroxisuccinimida (a través de residuos de lisina), glutaraldehído, anhídrido succínico,  $\text{SOCl}_2$  o  $\text{R}^1\text{N}=\text{C}=\text{NR}$ , en la que  $\text{R}$  y  $\text{R}^1$  son grupos alquilo diferentes.

Se inmunizan animales frente al antígeno, a conjugados inmunogénicos o a derivados mediante la combinación de, por ejemplo, 100  $\mu\text{g}$  o 5  $\mu\text{g}$  de la proteína o conjugado (para conejos o ratones, respectivamente) con 3 volúmenes de adyuvante completo de Freund e inyectando la solución intradérmicamente en múltiples sitios. Un mes después, los animales reciben un refuerzo de 1/5 a 1/10 de la cantidad original de péptido o conjugado en adyuvante completo de Freund mediante inyección subcutánea en sitios múltiples. Siete a 14 días después, se sangran los animales y se somete a ensayo el suero para el título de anticuerpos. Los animales reciben un refuerzo hasta que el título alcanza la saturación. Preferentemente el animal recibe un refuerzo del conjugado del mismo antígeno, aunque conjugado con una proteína diferente y/o mediante un reactivo de entrecruzamiento diferente. También pueden prepararse conjugados en cultivo celular recombinante en forma de fusiones de proteínas. Además, se utilizan convenientemente agentes agregantes, tales como alum, para incrementar la respuesta inmunológica.

(ii) *Anticuerpos monoclonales*

Se obtienen anticuerpos monoclonales a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogénea, es decir, los anticuerpos individuales que comprende la población son idénticos excepto por posibles mutaciones naturales 5 que pueden encontrarse presentes en cantidades reducidas. De esta manera, el modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo, indicando que no es una mezcla de anticuerpos discretos.

Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales pueden prepararse utilizando el procedimiento del hibridoma, descrito 10 por primera vez por Kohler *et al.*, *Nature* 256:495, 1975, o pueden prepararse mediante procedimientos de ADN recombinante (patente US nº 4.816.567).

En el procedimiento del hibridoma, se inmuniza un ratón u otro animal huésped apropiado, tal como un hámster, 15 tal como se ha descrito anteriormente en la presente memoria, con el fin de inducir los linfocitos que producen o son capaces de producir anticuerpos que se unen específicamente a la proteína utilizada para la inmunización. Alternativamente, los linfocitos pueden inmunizarse *in vitro*. A continuación, los linfocitos se fusionan con células de mieloma utilizando un agente de fusión adecuado, tal como polietilenglicol, para formar una célula de hibridoma (Goding, 20 Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, páginas 59 a 103, Academic Press, 1986).

Las células de hibridoma preparadas de esta manera se siembra y cultivan en un medio de cultivo adecuado que 25 preferentemente contiene una o más sustancias que inhiben el crecimiento o la supervivencia de las células de mieloma parentales no fusionadas. Por ejemplo, si las células de mieloma parentales carecen del enzima hipoxantina guanina fosforibosil transferasa (HGPRT o HPRT), el medio de cultivo para los hibridomas típicamente incluye hipoxantina, aminopterina y timidina (medio HAT), sustancias que evitan el crecimiento de las células deficientes en HGPRT.

Las células de mieloma preferentes son aquéllas que se fusionan eficientemente, soportan una producción de nivel 30 elevado estable de anticuerpo por parte de las células productoras de anticuerpos seleccionadas y son sensibles a un medio, tal como medio HAT. De entre éstas, las líneas celulares de mieloma preferentes son las líneas de mieloma murino, tales como aquéllas derivadas de los tumores de ratón MOPC-21 y MPC-11, disponibles del Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California, USA, y las células SP-2 y X63-Ag8-653, disponible de la American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, USA. Las líneas celulares de mieloma humano y de heteromieloma de ratón-humano también han sido descritas para la producción de anticuerpos monoclonales humanos (Kozbor, J. Immunol. 133:3001, 1984; Brodeur *et al.*, Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, páginas 51 a 63, Marcel Dekker Inc., New York, 1987).

El medio de cultivo en el que se cultivan las células de hibridoma se somete a ensayo para la producción de 35 anticuerpos monoclonales dirigidos contra el antígeno. Preferentemente se determina la especificidad de unión de los anticuerpos monoclonales producidos por las células de hibridoma mediante inmunoprecipitación o mediante un ensayo de unión *in vitro*, tal como el radioinmunoensayo (RIA) o el ensayo de inmunosorción ligada a enzima (RIA).

La afinidad de unión del anticuerpo monoclonal puede determinarse, por ejemplo, mediante el análisis de Scatchard 40 de Munson *et al.*, *Anal. Biochem.* 107:220, 1980.

Tras identificar las células de hibridoma que producen anticuerpos de la especificidad, afinidad y/o actividad deseada, los clones pueden subclonarse mediante procedimientos de dilución limitante y cultivarse mediante procedimientos 45 estándares (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, páginas 59 a 103, Academic Press, 1986). Entre los medios de cultivo adecuados para este fin se incluyen, por ejemplo, medio D-MEM o RPMI-1640. Además, las células de hibridoma pueden cultivarse *in vivo* en forma de tumores ascites en un animal.

Los anticuerpos monoclonales secretados por los subclones se separan convenientemente del medio de cultivo, 50 líquido ascites o suero mediante procedimientos convencionales de purificación de inmunoglobulinas tales como, por ejemplo, proteína A-sefarosa, cromatografía en hidroxilapatito, electroforesis en gel, diálisis o cromatografía de afinidad.

El ADN codificador de los anticuerpos monoclonales se aísla y secuencia fácilmente utilizando procedimientos 55 convencionales (por ejemplo mediante la utilización de sondas oligonucleótidas que son capaces de unirse específicamente a genes codificantes de las cadenas pesadas y ligeras de los anticuerpos murinos). Las células de hibridoma sirven como fuente preferente de dicho ADN. Tras el aislamiento, el ADN puede introducirse en vectores de expresión, que después se transfieren en células huésped, tales como células de *E. coli*, células COS de simio, células de ovario de hámster chino (CHO) o las células de mieloma que de otra manera no producen proteína inmunoglobulina, 60 para obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales en las células huésped recombinantes. Entre los artículos de revisión sobre la expresión recombinante en bacterias de ADN codificador del anticuerpo se incluyen Skerra *et al.*, *Curr. Opinion in Immunol.* 5:256-262, 1993, y Plückthun, *Immunol. Revs.* 130:151-188, 1992.

En una realización adicional, pueden aislarse anticuerpos o fragmentos de anticuerpo a partir de bibliotecas fálicas 65 de anticuerpos generadas utilizando las técnicas descritas en McCafferty *et al.*, *Nature* 348:552-554, 1990. Clackson *et al.*, *Nature* 352:624-628, 1991, y Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.* 222:581-597, 1991, describen el aislamiento de anticuerpos murinos y humanos, respectivamente, utilizando bibliotecas fálicas. Las publicaciones posteriores describen la producción de anticuerpos humanos de elevada afinidad (intervalo en nM) mediante intercambio de cadenas (Marks *et*

*al.*, *Bio/Technology* 10:779-783, 1992), así como la infección combinatorial y recombinación *in vivo* como estrategia para construir bibliotecas fágicas muy grandes (Waterhouse *et al.*, *Nuc. Acids. Res.* 21:2265-2266, 1993). De esta manera, estas técnicas son alternativas viables a las técnicas de hibridoma de anticuerpos monoclonales tradicionales para el aislamiento de anticuerpos monoclonales.

5 El ADN también puede modificarse, por ejemplo mediante la sustitución de la secuencia codificante para los dominios constantes de cadena pesada y ligera humanas en lugar de las secuencias murinas homólogas (patente US nº 4.816.567; Morrison *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:6851, 1984), o uniendo covalentemente a la secuencia codificante de inmunoglobulina la totalidad o parte de la secuencia codificante de un polipéptido no inmunoglobulina.

10 10 Típicamente dichos polipéptidos no inmunoglobulina se sustituyen por los dominios constantes de un anticuerpo, o se sustituyen por los dominios variables de un sitio de unión a antígeno de un anticuerpo para crear un anticuerpo bivalente químérico que comprende un sitio de unión a antígeno que presenta especificidad para un antígeno y otro sitio de unión a antígeno que presenta especificidad para un antígeno diferente.

15 (iii) *Anticuerpos humanizados*

20 Se han descrito en la literatura procedimientos para humanizar anticuerpos no humanos. Preferentemente un anticuerpo humanizado presenta la introducción de uno o más residuos aminoácidos procedentes de una fuente que es no humana. Estos residuos aminoácidos no humanos con frecuencia se denominan residuos "de importación", que típicamente se obtienen de un dominio variable "importado". La humanización esencialmente puede llevarse a cabo siguiendo el procedimiento de Winter y colaboradores (Jones *et al.*, *Nature* 321:522-525, 1986; Riechmann *et al.*, *Nature* 332:323-327, 1988; Verhoeyen *et al.*, *Science* 239:1534-1536, 1988), mediante la sustitución de las secuencias de región hipervariable por las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano. Por consiguiente, dichos anticuerpos "humanizados" son anticuerpos químéricos (patente US nº 4.816.567) en los que se ha sustituido sustancialmente menos que un dominio variable humano intacto por la secuencia correspondiente de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados son típicamente anticuerpos humanos en los que se sustituyen algunos residuos de la región hipervariable y posiblemente algunos residuos de FR por residuos de sitios análogos en anticuerpos de roedor.

30 30 La elección de dominios variables humanos, tanto ligeros como pesados, que deben utilizarse al preparar los anticuerpos humanizados resulta muy importante para reducir la antigenicidad. Según el procedimiento denominado "de ajuste óptimo", la secuencia del dominio variable de un anticuerpo de roedor se criba frente a la biblioteca completa de secuencias de dominio variable humanas conocidas. La secuencia humana más similar a la del roedor seguidamente se acepta como al región marco (FR) humana para el anticuerpo humanizado (Sims *et al.*, *J. Immunol.* 151:2296, 1993; Chothia *et al.*, *J. Mol. Biol.* 196:901, 1987). Otro procedimiento utiliza una región marco particular derivada de la secuencia de consenso de todos los anticuerpos humanos de un subgrupo particular de cadenas ligeras o pesadas. Puede utilizarse el mismo marco para varios anticuerpos humanizados diferentes (Carter *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:4285, 1992; Presta *et al.*, *J. Immunol.* 151:2623, 1993).

40 40 Resulta importante además que los anticuerpos se humanicen reteniendo la afinidad elevada para el antígeno y otras propiedades biológicas favorables. Para alcanzar este objetivo, según un procedimiento preferente, se preparan anticuerpos humanizados mediante un procedimiento de análisis de las secuencias parentales y diversos productos humanizados conceptuales utilizando modelos tridimensionales de las secuencias parentales y humanizadas. Los modelos tridimensionales de inmunoglobulina se encuentran comúnmente disponibles y resultan familiares para el experto en la materia. Se encuentran disponibles programas informáticos que ilustran y muestran estructuras conformacionales tridimensionales probables de secuencias de inmunoglobulina candidatas seleccionadas. La inspección de estas visualizaciones permite analizar el papel probable de los residuos en el funcionamiento de la secuencia candidata de inmunoglobulina, es decir, el análisis de residuos que influyen sobre la capacidad de la inmunoglobulina candidata de unirse a su antígeno. De esta manera, pueden seleccionarse y combinarse residuos de la FR de secuencias del receptor e importadas de manera que se consiga la característica deseada del anticuerpo, tal como afinidad incrementada para el antígeno o antígenos diana. En general, los residuos de la región hipervariable se encuentran directa y más sustancialmente implicados en la influencia sobre la unión del antígeno.

55 (iv) *Anticuerpos humanos*

60 A modo de alternativa de la humanización, pueden generarse anticuerpos humanos. Por ejemplo, ahora resulta posible producir animales transgénicos (por ejemplo ratones) que son capaces, tras la inmunización, de producir un repertorio completo de anticuerpos humanos en ausencia de producción endógena de inmunoglobulinas. Por ejemplo, se ha descrito que la delección homocigótica del gen de la región de unión de cadena pesada (JH) del anticuerpo en ratones mutantes químéricos y de línea germinal resulta en la inhibición total de la producción endógena de anticuerpos. La transferencia de la serie génica de inmunoglobulina de línea germinal humana en dichos ratones mutantes de línea germinal resulta en la producción de anticuerpos humanos tras el reto con antígeno (ver, por ejemplo, Jakobovits *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:2551, 1993; Jakobovits *et al.*, *Nature* 362:255-258, 1993; Brugemann *et al.*, *Year in Immuno.* 7:33, 1993, y las patentes US nº 5.591.669, nº 5.589.369 y nº 5.545.807).

65 Alternativamente, puede utilizarse tecnología de expresión fágica (McCafferty *et al.*, *Nature* 348:552-553, 1990) para producir anticuerpos humanos y fragmentos de anticuerpo *in vitro*, a partir de repertorios génicos de dominio

variable (V) de inmunoglobulina procedentes de donantes no inmunizados. Según esta técnica, se clonian genes de dominio V de anticuerpo en el mismo marco de lectura en un gen de proteína de cubierta menor o mayor de un bacteriófago filamento, tal como m13 o fd, y se expresa en forma de fragmentos de anticuerpo funcionales sobre la superficie de la partícula fágica. Debido a que la partícula filamentosa contiene una copia de ADN monocatenario 5 del genoma fágico, las selecciones basadas en las propiedades funcionales del anticuerpo también resultan en que la selección del gen codificante del anticuerpo muestre dichas propiedades. De esta manera, el fago imita algunas de las propiedades de la célula B. La expresión fágica puede llevarse a cabo en una diversidad de formatos; para una revisión 10 ver, por ejemplo, Johnson, Kevin S. y Chiswell, David J., *Current Opinion in Structural Biology* 3:564-571, 1993. Pueden utilizarse varias fuentes de segmentos de gen de V para la expresión fágica. Clackson *et al.*, *Nature* 352:624- 15 628, 1991, aislaron una serie diversa de anticuerpos anti-oxazolona a partir de una pequeña biblioteca combinatorial aleatoria de genes de V derivados de bazos de ratones inmunizados. Puede construirse un repertorio de genes de V a partir de donantes humanos no inmunizados y pueden aislar anticuerpos contra una serie diversa de antígenos (incluyendo autoantígenos) esencialmente siguiendo las técnicas descritas por Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.* 222:581-597, 1991, o Griffith *et al.*, *EMBO J.* 12:725-734, 1993. Ver también las patentes US nº 5.565.332 y nº 5.573.905.

15 También pueden generarse anticuerpos humanos en células B activadas *in vitro* (ver las patentes US nº 5.567.610 y nº 5.229.275).

20 (v) *Fragmientos de anticuerpo*

25 Se han desarrollado diversas técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpo. Tradicionalmente estos fragmentos se derivaron mediante digestión proteolítica de anticuerpos intactos (ver, por ejemplo, Morimoto *et al.*, *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 24:107-117, 1992, y Brennan *et al.*, *Science* 229:81, 1985). Sin embargo, estos fragmentos ahora pueden producirse directamente en células huésped recombinantes. Por ejemplo, los 30 fragmentos de anticuerpo pueden aislar a partir de las bibliotecas fágicas de anticuerpos comentadas anteriormente. Alternativamente, pueden recuperarse directamente fragmentos Fab'-SH a partir de *E. coli* y acoplarse químicamente para formar fragmentos F(ab')<sub>2</sub> (Carter *et al.*, *Bio/Technology* 10:163-167, 1992). Según otro enfoque, pueden aislar fragmentos F(ab')<sub>2</sub> directamente a partir de un cultivo de células huésped recombinantes. Otras técnicas para la 35 producción de fragmentos de anticuerpo resultarán evidentes para el experto en la materia. En otras realizaciones, el anticuerpo de elección es un fragmento Fv monocatenario (scFv) (ver la patente WO nº 93/16185, las patentes US nº 5.571.894 y nº 5.587.458). El fragmento de anticuerpo también puede ser un "anticuerpo lineal", por ejemplo tal como se describe en la patente US nº 5.641.870, por ejemplo. Dichos fragmentos de anticuerpo pueden ser monoespecíficos o biespecíficos.

35 (vi) *Anticuerpos biespecíficos*

40 Los anticuerpos biespecíficos son anticuerpos que presentan especificidades de unión para por lo menos dos epítopos diferentes. Los anticuerpos biespecíficos ejemplares pueden unirse a dos epítopos diferentes del marcador de superficie de las células B. Otros anticuerpos de este tipo pueden unirse a un primer marcador de células B y además 45 unirse a un segundo marcador de superficie de células B. Alternativamente, puede combinarse un brazo de unión marcador anti-célula B puede combinarse con un brazo que se une a una molécula inductora sobre un leucocito, tal como una molécula receptora de células T (por ejemplo CD2 o CD3) o receptores Fc para IgG (FcγR), tales como FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) y FcγRIII (CD16) de manera que se focalicen los mecanismos de defensa celular en la célula B. También pueden utilizarse anticuerpos biespecíficos para dirigir agentes citotóxicos a la célula B. Estos anticuerpos 50 presentan un brazo de unión a marcador de célula B y un brazo que se une al agente citotóxico (por ejemplo saporina, anti-interferón  $\alpha$ , alcaloide vinca, cadena A de la ricina, metotrexato o hapteno isótopo radioactivo). Pueden prepararse anticuerpos biespecíficos en forma de anticuerpos de longitud completa o fragmentos de anticuerpo (por ejemplo anticuerpos biespecíficos F(ab')<sub>2</sub>).

55 Los procedimientos para preparar anticuerpos biespecíficos son conocidos de la técnica. La producción tradicional de anticuerpos biespecíficos de longitud completa se basa en la coexpresión de dos parejas de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina, en las que las dos cadenas presentan especificidades diferentes (Millstein *et al.*, *Nature* 305:537-539, 1983). Debido a la organización aleatoria de cadenas pesada y ligera de inmunoglobulina, estos hibridomas (cuadromas) producen una mezcla potencial de 10 moléculas de anticuerpo diferentes, de las que únicamente una presenta la estructura biespecífica correcta. La purificación de la molécula correcta, que habitualmente se realiza mediante etapas de cromatografía de afinidad, es bastante laboriosa y los rendimientos de producto son reducidos. Se dan a conocer procedimientos similares en la patente WO nº 93/08829, y en Traunecker *et al.*, *EMBO J.* 10:3655-3659, 1991.

60 Según un enfoque diferente, los dominios variables de anticuerpo con las especificidades de unión deseadas (sitios de unión anticuerpo-antígeno) se fusionan a secuencias de dominio constante de inmunoglobulina. La fusión preferentemente es con un dominio constante de cadena pesada de inmunoglobulina, que comprende por lo menos parte de las regiones de bisagra CH2 y CH3. Resulta preferente que se encuentre presente la primera región constante de cadena pesada (CH1) que contiene el sitio necesario para la unión de la cadena ligera, en por lo menos una de las fusiones. 65 Los ADN codificantes de las fusiones de cadena pesada de inmunoglobulina y, si se desea, la cadena ligera de inmunoglobulina, se insertan en vectores de expresión separados y se cotransfieren en un organismo huésped adecuado. Esto proporciona una gran flexibilidad en el ajuste de las proporciones mutuas de los tres fragmentos de polipéptido en realizaciones en las que proporciones desiguales de las tres cadenas polipeptídicas utilizadas en la construcción

proporcionan los rendimientos óptimos. Sin embargo, resulta posible insertar las secuencias codificantes de dos o de las tres cadenas polipeptídicas en un vector de expresión en el caso de que la expresión de por lo menos dos cadenas polipeptídicas en proporciones iguales resulta en rendimientos elevados o en el caso de que las proporciones no resulten de significación particular.

5 En una realización preferente de este enfoque, los anticuerpos biespecíficos están compuestos de una cadena pesada de inmunoglobulina híbrida con una primera especificidad de unión en un brazo, y una pareja de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina híbrida (que proporciona una segunda especificidad de unión) en el otro brazo. Se encontró que esta estructura asimétrica facilita la separación del compuesto biespecífico deseado de combinaciones de cadenas de inmunoglobulina no deseadas, debido a que la presencia de una cadena ligera de inmunoglobulina en una mitad de la molécula biespecífica proporciona un modo sencillo de separación. Este enfoque se da a conocer en la patente 10 WO nº 94/04690. Para más detalles sobre la generación de anticuerpos biespecíficos ver, por ejemplo, Suresh *et al.*, Methods in Enzymology 121:210, 1986.

15 Según otro enfoque descrito en la patente US nº 5.731.168, la interfaz entre un par de moléculas de anticuerpo puede manipularse para maximizar el porcentaje de heterodímeros que se recuperan a partir del cultivo celular recombinante. La interfaz preferente comprende por lo menos una parte del dominio CH3 de un dominio constante de anticuerpo. En este procedimiento, se sustituyen una o más cadenas laterales pequeñas de aminoácidos de la interfaz de la primera molécula de anticuerpo por cadenas laterales más grandes (por ejemplo de tirosinas o triptófanos). Las 20 "cavidades" compensatorias de tamaño idéntico o similar a la cadena o cadenas laterales grandes se crean en la interfaz de la segunda molécula de anticuerpo sustituyendo las cadenas laterales grandes de aminoácidos con cadenas más pequeñas (por ejemplo alanina o treonina). Esto proporciona un mecanismo para incrementar el rendimiento del heterodímero respecto a otros productos finales no deseados, tales como homodímeros.

25 Entre los anticuerpos biespecíficos se incluyen anticuerpos entrecruzados o "heteroconjugados". Por ejemplo, uno de los anticuerpos en el heteroconjugado puede acoplarse a avidina, el otro a biotina. Este tipo de anticuerpos se ha propuesto, por ejemplo, para dirigir células del sistema inmunológico a células no deseadas (patente US nº 4.676.980) y para el tratamiento de la infección por VIH (patente WO nº 91/00360, WO nº 92/200373 y EP nº 03089). Pueden prepararse anticuerpos heteroconjugados utilizando cualquier procedimiento conveniente de entrecruzamiento. Son 30 bien conocidos de la técnica los agentes de entrecruzamiento adecuados, y se dan a conocer en la patente US nº 4.676.980, junto con varias técnicas de entrecruzamiento.

35 También se han descrito en la literatura técnicas para generar anticuerpos biespecíficos a partir de fragmentos de anticuerpo. Por ejemplo, pueden prepararse anticuerpos biespecíficos utilizando enlace químico. Brennan *et al.*, Science 229:81, 1985, describen un procedimiento en el que se cortan proteolíticamente anticuerpos intactos para generar fragmentos  $F(ab')_2$ . Estos fragmentos se reducen en presencia del agente acomplejante de ditiol, arsenito sódico, para 40 estabilizar los dítoles vecinos e impedir la formación de disulfuros intermoleculares. Los fragmentos Fab' generados seguidamente se convierten en derivados tionitrobenzoato (TNB). A continuación, se reconvierte uno de los derivados Fab'-TNB en el Fab'-tiol mediante reducción con mercaptoetilamina y se mezcla con una cantidad equimolar del otro derivado Fab'-TNB para formar el anticuerpo biespecífico. Los anticuerpos biespecíficos producidos pueden utilizarse como agentes para la inmovilización selectiva de enzimas.

45 Los últimos avances han facilitado la recuperación directa de los fragmentos Fab'-SH a partir de *E. coli*, que pueden acoplarse químicamente para formar anticuerpos biespecíficos. Shalaby *et al.*, J. Exp. Med. 175:217-225, 1992, describen la producción de una molécula de anticuerpo biespecífico  $F(ab')_2$  completamente humanizado. Cada fragmento Fab' se secretó separadamente de *E. coli* y se sometió a acoplamiento químico directo *in vitro* para formar el anticuerpo biespecífico. El anticuerpo biespecífico formado de esta manera era capaz de unirse a células que sobre-expresan el receptor ErbB2 y a células T humanas normales, así como de inducir la actividad lítica de los linfocitos citotóxicos humanos contra dianas de tumor mamario humano.

50 También se han descrito diversas técnicas para preparar y aislar fragmentos de anticuerpo biespecífico directamente a partir de un cultivo celular recombinante. Por ejemplo, se han producido anticuerpos biespecíficos utilizando cremalleras de leucina (Kostelny *et al.*, J. Immunol. 148(5):1547-1553, 1992). Los péptidos de cremallera de leucina de las proteínas Fos y Jun se unieron a las partes Fab' de dos anticuerpos diferentes mediante fusión génica. Los anticuerpos homodímeros se redujeron en la región bisagra para formar monómeros y después se reoxidaron para 55 formar los anticuerpos heterodímeros. Este procedimiento también puede utilizarse para la producción de anticuerpos homodímeros. La tecnología de "diacuerpos" descrita por Hollinger *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448, 1993, ha proporcionado un mecanismo alternativo para preparar fragmentos de anticuerpo biespecífico. Los fragmentos comprenden un dominio variable de cadena pesada ( $V_H$ ) conectado a un dominio variable de cadena ligera ( $V_L$ ) mediante un linker que es excesivamente corto para permitir el apareamiento entre los dominios en la misma cadena. Por consiguiente, se fuerza el apareamiento entre los dominios  $V_H$  y  $V_L$  de un fragmento con los dominios  $V_L$  y  $V_H$  complementarios de otro fragmento, formando de esta manera dos sitios de unión a antígeno. También se ha informado de otra estrategia para preparar fragmentos de anticuerpo biespecífico mediante la utilización de dímeros Fv monocatenarios (sFv) (ver Gruber *et al.*, J. Immunol. 152:5368, 1994).

65 Se encuentran contemplados anticuerpos con más de dos valencias. Por ejemplo, pueden prepararse anticuerpos triespecíficos (Tutt *et al.*, J. Immunol. 147:60, 1991).

## II. Conjugados y otras modificaciones del antagonista

El antagonista utilizado en los procedimientos o incluido en los productos fabricados de la presente invención se conjuga opcionalmente con un agente citotóxico.

5 Se han descrito anteriormente agentes quimioterapéuticos útiles en la generación de dichos conjugados de antagonista-agente citotóxico.

10 También se encuentran contemplados en la presente invención conjugados de un antagonista y una o más toxinas de molécula pequeña, tal como una cliqueamicina, una maitansina (patente US nº 5.208.020), un tricoteno y CC1065. En una realización de la invención, el antagonista se conjuga con una o más moléculas de maitansina (por ejemplo entre aproximadamente 1 y aproximadamente 10 moléculas de maitansina por cada molécula de antagonista). La maitansina puede convertirse, por ejemplo, en May-SS-Me, que puede reducirse a May-SH3 y hacerse reaccionar con antagonista modificado (Chari *et al.*, Cancer Research 52:127-131, 1992) para generar un conjugado de maytansinoide-antagonista.

15

20 Alternativamente, el antagonista se conjuga con una o más moléculas de caliqueamicina. La familia caliqueamicina de antibióticos era capaz de producir roturas del ADN bícatenario a concentraciones subpicomolares. Entre los análogos estructurales de la caliqueamicina que pueden utilizarse se incluyen, aunque sin limitarse a ellos,  $\gamma_1^1$ ,  $\alpha_2^1$ ,  $\alpha_3^1$ , N-acetil- $\gamma_1^1$ , PSAG y  $\theta_1^1$  (Hinman *et al.*, Cancer Research 53:3336-3342, 1993, y Lode *et al.*, Cancer Research 58:2925-2928, 1998).

25 Entre las toxinas enzimáticamente activas y fragmentos de las mismas que pueden utilizarse se incluyen la cadena A de la toxina diftérica, cadena A de exotoxina (de *Pseudomonas aeruginosa*), cadena A de ricina, cadena A de abrina, cadena A de modeccina, alfa-sarcina, proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas de diantina, proteínas de *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII y PAP-S), inhibidor de *Momordica charantia*, curcina, crotina, inhibidor de *Saponaria officinalis*, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina y los tricotecenos (ver, por ejemplo, la patente WO nº 93/2123, publicada el 28 de octubre de 1993).

30 La presente invención contempla además el antagonista conjugado con un compuesto con actividad nucleolítica (por ejemplo una ribonucleasa o una ADN endonucleasa, tal como una desoxirribonucleasa, ADNasa).

35 Se encuentra disponible una diversidad de isótopos radioactivos para la producción de antagonistas radioconjugados. Entre los ejemplos se incluyen At<sup>211</sup>, I<sup>131</sup>, I<sup>125</sup>, Y<sup>90</sup>, Re<sup>186</sup>, Re<sup>188</sup>, Sm<sup>153</sup>, Bi<sup>212</sup>, P<sup>32</sup> e isótopos radioactivos de Lu.

40 Pueden prepararse conjugados de antagonista y agente citotóxico utilizando una diversidad de agentes acoplantes de proteínas bifuncionales, tales como propionato de N-succinimidil-3-(2-piridilditio) (SPDP), succinimidil-4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato, iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como HCl de dimetil-adipimido), ésteres activos (tales como suberato de disuccinimidilo), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos bis-azido (tales como bis(p-azidobenzoilo) hexanodiamina), derivados bis-diazonio (tales como bis-(p-diazoniobenzoil)-etilendiamina), diisocianatos (tales como tolién-2,6-diisocianato) y compuestos de flúor bis-activos (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenceno). Por ejemplo, puede prepararse una inmunotoxina ricina tal como se describe en Vitetta *et al.*, Science 238:1098, 1987. El ácido 1-isotiocianatobencil-3-metildietilén triaminapentaacético marcado con carbono 14 (MX-DTPA) es un agente quelante ejemplar para la conjugación de un radionucleótido con el antagonista (ver la patente WO nº 94/11026). El linker puede ser un "linker cortable" que facilite la liberación del fármaco citotóxico en la célula. Por ejemplo, puede utilizarse un linker lábil al ácido, un linker sensible a peptidasas, un linker dimetilo o un linker que contenga disulfuro (Chari *et al.*, Cancer Research 52:127-131, 1992).

50 Alternativamente, puede prepararse una proteína de fusión que comprende el antagonista y el agente citotóxico, por ejemplo mediante técnicas recombinantes o síntesis de péptidos.

55 En todavía otra realización, el antagonista puede conjugarse con un "receptor" (tal como estreptavidina) para la utilización en prereconocimiento de tumores, en la que el conjugado antagonista-receptor se administra en el paciente, seguido de la eliminación de la circulación de conjugado no unido utilizando un agente eliminador y después la administración de un "ligando" (por ejemplo avidina) que se conjuga con un agente citotóxico (por ejemplo un radionucleótido).

60 Los antagonistas de la presente invención también pueden conjugarse con un enzima activador de profármaco que convierte un profármaco (por ejemplo un agente quimioterapéutico peptídico, ver la patente WO nº 81/01145) en un fármaco anticáncer activo (ver, por ejemplo, las patentes WO nº 88/07378 y US nº 4.975.278).

65 El componente enzima de dichos conjugados incluye cualquier enzima capaz de actuar sobre un profármaco de manera que lo convierta en su forma citotóxica más activa.

Entre los enzimas que resultan útiles en el procedimiento de la presente invención se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, fosfatasa alcalina útil para convertir los profármacos que contienen fosfato en fármacos libres; arilsulfatasa útil para convertir los profármacos que contienen sulfato en fármacos libres; citosina desaminasa útil para convertir 5-fluorocitosina no tóxica en el fármaco anticáncer, 5-fluorouracilo; proteasas, tales como la proteasa de *Serratia*, termo-

lisina, subtilisina, carboxipeptidasas y catepsinas (tales como las catepsinas B y L), que resultan útiles para convertir los profármacos que contienen péptidos en fármacos libres; D-alanilcarboxipeptidasas, útiles para convertir los profármacos que contienen sustituyentes D-aminoácidos; enzimas que cortan carbohidratos, tales como  $\beta$ -galactosidasa y neuramidasa, útiles para convertir los profármacos glucosilados en fármacos libres;  $\beta$ -lactamasa, útil para convertir 5 fármacos derivatizados con  $\beta$ -lactamos en fármacos libres; y penicilín amidasa, tales como la penicilín V amidasa o la penicilín G amidasa, útiles para convertir fármacos derivatizados en los nitrógenos de amina de los mismos con grupos fenoxiacetilo o fenilacetilo, respectivamente, en fármacos libres. Alternativamente, pueden utilizarse anticuerpos con actividad enzimática, también conocidos de la técnica como "abzimas", para convertir los profármacos de la invención 10 en fármacos activos libres (ver, por ejemplo, Massey, *Nature* 328:457-458, 1987). Los conjugados antagonista-abzima pueden prepararse tal como se describe en la presente invención para la administración del abzima en una población de células tumorales.

Los enzimas de la presente invención pueden unirse covalentemente al antagonista mediante técnicas bien conocidas de la técnica, tales como la utilización de los reactivos de entrecruzamiento heterobifuncionales comentados 15 anteriormente. Alternativamente, pueden construirse proteínas de fusión que comprenden por lo menos la región de unión de antígeno de un antagonista de la invención unida a una parte funcionalmente activa de un enzima de la invención, utilizando técnicas de ADN recombinante bien conocidas de la técnica (ver, por ejemplo, Neuberger *et al.*, *Nature* 312:604-608, 1984).

20 Se contemplan en la presente invención otras modificaciones del antagonista. Por ejemplo, el antagonista puede unirse a uno de entre una diversidad de polímeros no proteicos, por ejemplo polietilenglicol, polipropilenglicol, polioxialquilenos o copolímeros de polietilenglicol y polipropilenglicol.

25 Los antagonistas dados a conocer en la presente invención también pueden formularse como liposomas. Se preparan liposomas que contienen el antagonista mediante procedimientos conocidos de la técnica, tales como los descritos por Epstein *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:3688, 1985; Hwang *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4030, 1980; patentes US nº 4.485.045 y nº 4.544.545 y WO nº 97/38731, publicada el 23 de octubre de 1997. Se dan a conocer liposomas con tiempo de circulación incrementado en la patente US nº 5.013.556.

30 Pueden generarse liposomas particularmente útiles mediante el procedimiento de evaporación en fase reversa con una composición de lípidos que comprende fosfatidilcolina, colesterol y fosfatidiletanolamina derivatizada con PEG (PEG-PE). Los liposomas se extrusionan a través de filtros de tamaño de poro definido, rindiendo liposomas con el diámetro deseado. Pueden conjugarse fragmentos Fab' de un anticuerpo de la presente invención con los liposomas, 35 tal como se describe en Martin *et al.*, *J. Biol. Chem.* 257:286-288, 1982, mediante una reacción de intercambio de disulfuros. Un agente quimioterapéutico se encuentra opcionalmente contenido dentro del liposoma (ver Gabizon *et al.*, *J. National Cancer Inst.* 81(19):1484, 1989).

40 Se encuentran contempladas una o más modificaciones de la secuencia de aminoácidos de las proteínas o péptidos antagonistas descritos en la presente invención. Por ejemplo, puede resultar deseable mejorar la afinidad de unión y/o otras propiedades biológicas del antagonista. Se preparan variantes de secuencia de aminoácidos del antagonista mediante la introducción de cambios de nucleótidos apropiados en el ácido nucleico del antagonista o mediante síntesis 45 de péptidos. Entre estas modificaciones se incluyen, por ejemplo, delecciones y/o inserciones y/o sustituciones de residuos dentro de las secuencias de aminoácidos del antagonista. Se realiza cualquier combinación de delección, inserción y sustitución para conseguir el constructo final, con la condición de que el constructo final presente las características deseadas. Los cambios de aminoácidos también pueden alterar procesos post-traduccionales del antagonista, tal como el cambio del número o posición de los sitios de glucosilación.

50 Un procedimiento útil para identificar determinados residuos o regiones del antagonista que son localizaciones preferentes para la mutagénesis se denomina "mutagénesis por escaneo de alaninas", tal como describen Cunningham y Wells, *Science* 244:1081-1085, 1989. En esta referencia, se identifica un residuo o grupo de residuos diana (por ejemplo residuos cargados, tales como arg, asp, his, lys y glu) y se sustituyen por un aminoácido neutro o de carga negativa (más preferentemente alanina o polialanina) para afectar a la interacción de los aminoácidos con el antígeno. Aquellas localizaciones de aminoácidos que demuestran sensibilidad funcional a las sustituciones, seguidamente se refinan mediante la introducción de variantes adicionales o diferentes en los sitios de sustitución o para crear los 55 mismos. De esta manera, aunque el sitio para introducir una variación de la secuencia de aminoácidos se encuentra predeterminado, la naturaleza de la mutación *per se* no necesita encontrarse predeterminada. Por ejemplo, para analizar el resultado de una mutación en un sitio dado, se lleva a cabo escaneo de ala o mutagénesis aleatoria en el codón o región diana y las variantes de antagonista expresadas se criban para la actividad deseada.

60 Entre las inserciones de secuencia de aminoácidos se incluyen fusiones aminoterminales y/o carboxiterminales de longitud comprendida entre un residuo y polipéptidos que contienen cien o más residuos, así como inserciones intrasecuencia de uno o múltiples residuos aminoácidos. Entre los ejemplos de inserciones terminales se incluyen un antagonista con un residuo metionilo N-terminal o el antagonista fusionado con un polipéptido citotóxico. Entre otras variantes por inserción de la molécula de antagonista se incluyen la fusión del extremo N-terminal o C-terminal del antagonista de un enzima, o un polipéptido que incrementa la vida media en suero del antagonista.

Otro tipo de variante es una variante de sustitución de aminoácido. en estas variantes se ha sustituido por lo menos un residuo aminoácido en la molécula de antagonista por un residuo diferente. Entre los sitios de mayor interés

# ES 2 322 267 T3

para la mutagénesis por sustitución de antagonistas de anticuerpo se incluyen las regiones hipervariables, aunque las alteraciones de la FR también se encuentran contempladas. Se muestran las sustituciones conservativas en la Tabla 1 bajo el título “sustituciones preferentes”. Si estas sustituciones resultan en un cambio de actividad biológica, pueden introducirse más cambios de sustitución, denominados “sustituciones ejemplares” en la Tabla 1, o tal como se describe 5 adicionalmente después en referencia a las clases de aminoácidos, y cribarse los productos.

TABLA 1

	<b>Residuo original</b>	<b>Sustituciones ejemplares</b>	<b>Sustituciones preferentes</b>
10	Ala (A)	val; leu; ile	val
15	Arg (R)	lys; gln; asn	lys
20	Asn (N)	gln; his; asp; lys; arg	gln
25	Asp (D)	glu; asn	glu
30	Cys (C)	ser; ala	ser
35	Gln (Q)	asn; glu	asn
40	Glu (E)	asp; gln	asp
45	Gly (G)	ala	ala
50	His (H)	asn; gln; lys; arg	arg
	Ile (I)	leu; val; met; ala; phe; norleucina	leu
	Leu (L)	norleucina; ile; val; met; ala; phe	ile
	Lys (K)	arg; gln; asn	arg
	Met (M)	leu; phe; ile	leu
	Phe (F)	leu; val; ile; ala; tyr	tyr
	Pro (P)	ala	ala
	Ser (S)	thr	thr
	Thr (T)	ser	ser
	Trp (W)	tyr; phe	tyr
	Tyr (Y)	trp; phe; thr; ser	phe
	Val (V)	ile; leu; met; phe; ala; norleucina	leu

Se consiguen modificaciones sustanciales de las propiedades biológicas del antagonista mediante la selección de sustituciones que difieren significativamente en su efecto sobre el mantenimiento de: (a) la estructura del esqueleto polipéptido en el área de la sustitución, por ejemplo en conformación de hoja o de hélice, (b) la carga o hidrofobicidad 55 de la molécula en el sitio diana, o (c) el volumen de la cadena lateral. Los residuos naturales se clasifican en grupos basándose en las propiedades comunes de las cadenas laterales:

- (1) hidrofóbicos: norleucina, met, ala, val, leu, ile;
- (2) hidrofílicos neutros: cys, ser, thr;
- (3) ácidos: asp, glu;
- (4) básicos: asn, gln, his, lys, arg;
- (5) residuos que influyen sobre la orientación de la cadena: gly, pro, y
- (6) aromáticos: trp, tyr, phe.

Las sustituciones no conservativas implican intercambiar un miembro de una de dichas clases por uno de otra clase.

5 Cualquier residuo cisteína no implicado en el mantenimiento de la conformación correcta del antagonista también puede sustituirse, generalmente con serina, para mejorar la estabilidad oxidativa de la molécula y evitar el entrecruzamiento aberrante. A la inversa, pueden añadirse uno o más enlaces de cisteína al antagonista para mejorar su estabilidad (particularmente en el caso de que el antagonista sea un fragmento de anticuerpo, tal como un fragmento Fv).

10 Un tipo particularmente preferente de variante por sustitución implica sustituir uno o más residuos de región hipervariable de un anticuerpo parental. Generalmente, la variante o variantes resultantes seleccionadas para el desarrollo adicional presentarán propiedades biológicas mejoradas comparado con el anticuerpo parental a partir del que se generaron. Una manera conveniente de generar dichas variantes por sustitución es la maduración por afinidad utilizando la expresión fágica. Brevemente, se mutan varios sitios de región hipervariable (por ejemplo 6 ó 7 sitios) para generar 15 todas las sustituciones posibles de aminoácidos en cada sitio. Las variantes de anticuerpo generadas de esta manera se expresan de una manera monovalente a partir de partículas de fago filamentoso como fusiones al producto del gen III de M13 empaquetado dentro de cada partícula. Las variantes expresadas por fago seguidamente se criban para su actividad biológica (por ejemplo afinidad de unión) tal como se da a conocer en la presente invención. Con el fin de identificar sitios de región hipervariable candidatos para la modificación, puede llevarse a cabo mutagénesis por escaneo de alaninas para identificar residuos de región hipervariable que contribuyen significativamente a la unión del antígeno. Alternativamente, o adicionalmente, puede resultar beneficioso analizar una estructura cristalina del complejo antígeno-anticuerpo para identificar puntos de contacto entre el anticuerpo y el antígeno. Dichos residuos de contacto y los 20 residuos vecinos son candidatos para la sustitución según las técnicas proporcionadas en la presente invención. Tras generar dichas variantes, el panel de variantes se somete a cribado tal como se describe en la presente invención y pueden seleccionarse anticuerpos con propiedades superiores en uno o más ensayos relevantes para el desarrollo posterior.

25 Otro tipo de variante de aminoácido del antagonista lateral el patrón original de glucosilación del antagonista. El término "alteración" se refiere a delecionar uno o más grupos carbohidratos presentes en el antagonista, y/o a añadir uno o más sitios de glucosilación que no se encuentran presentes en el antagonista.

30 La glucosilación de los polipéptidos típicamente se encuentra N-ligada u O-ligada. N-ligada se refiere a la unión del grupo carbohidrato a la cadena lateral de un residuo de asparagina. Las secuencias de tripeptido asparagina-X-serina y asparagina-X-treonina, en las que X es cualquier aminoácido excepto prolina, son las secuencias de reconocimiento para la unión enzimática del grupo carbohidrato a la cadena lateral de la asparagina. De esta manera, la presencia de cualquiera de estas secuencias de tripeptido en un polipéptido crea un sitio de glucosilación potencial. La glucosilación O-ligada se refiere a la unión de uno de los azúcares N-acetilgalactosamina, galactosa o xilosa a un ácido hidroxiamino, 35 más comúnmente serina o treonina, aunque también puede utilizarse 5-hidroxiprolina o 5-hidroxilisina.

40 La adición de sitios de glucosilación al antagonista se consigue convenientemente mediante la alteración de la secuencia de aminoácidos de manera que contenga una o más de las secuencias de tripeptíco anteriormente indicadas (para los sitios de glucosilación N-ligados). La alteración también puede llevarse a cabo mediante la adición, o sustitución, de uno o más residuos de serina o de treonina a la secuencia del antagonista original (para los sitios de glucosilación O-ligados).

45 Las moléculas de ácidos nucleicos codificantes de las variantes de aminoácidos del antagonista se preparan mediante una diversidad de procedimientos conocidos de la técnica. Entre estos procedimientos se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, el aislamiento a partir de una fuente natural (en el caso de variantes de secuencia de aminoácidos naturales) o la preparación mediante mutagénesis mediada por oligonucleótidos (o sitio-dirigida), la mutagénesis por PCR y la mutagénesis por inserción de casete de una variante preparada anteriormente o una versión no variante del antagonista.

50 Puede resultar deseable modificar el antagonista de la invención con respecto a la función efectora, por ejemplo de manera que se incremente la citotoxicidad mediada por células dependiente de antígeno (ADCC) y/o la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) del antagonista. Lo anterior puede conseguirse mediante la introducción de una o más sustituciones de aminoácidos en una región Fc de un anticuerpo antagonista. Alternativamente o adicionalmente, pueden introducirse uno o más residuos de cisteína en la región Fc, permitiendo de esta manera la formación de 55 enlaces disulfuro entre cadenas en esta región. El anticuerpo homodimérico generado de esta manera puede presentar una capacidad de internalización mejorada y/o eliminación celular mediada por el complemento incrementada y citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) (ver Caron *et al.*, *J. Exp. Med.* 176:1191-1195, 1992, y Shope, B. J., *Immunol.* 148:2918-2922, 1992). Pueden prepararse anticuerpos homodiméricos con actividad antitumoral incrementada utilizando entrecruzadores heterobifuncionales tal como se describe en Wolff *et al.*, *Cancer Research* 60 53:2560-2565, 1993. Alternativamente, puede manipularse un anticuerpo que presente regiones Fc duales y que de esta manera puede presentar capacidades incrementadas de lisis por el complemento y de ADCC (ver Stevenson *et al.*, *Anti-Cancer Drug Design* 3:219-230, 1989).

65 Para incrementar la vida media en suero del antagonista, puede incorporarse un epítopo de unión de receptor de reciclaje en el antagonista (especialmente un fragmento de anticuerpo) tal como se describe en la patente US nº 5.739.277, por ejemplo. Tal como se utiliza en la presente invención, la expresión "epítopo de unión de receptor de reciclaje" se refiere a un epítopo de la región Fc de una molécula de IgG (por ejemplo IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub> o IgG<sub>4</sub>) que es responsable del incremento de la vida media en suero *in vivo* de la molécula de IgG.

IV. *Formulaciones farmacéuticas*

Las formulaciones terapéuticas de los antagonistas utilizadas de acuerdo con la presente invención se preparan para el almacenamiento mediante la mezcla de un antagonista que presenta el grado de pureza deseado con portadores, excipientes o estabilizadores farmacéuticamente aceptables opcionales (Remington's Pharmaceutical Sciences, 16a edición, Osol, A. editor, 1980), en la forma de formulaciones liofilizadas o de soluciones acuosas. Los portadores, excipientes o estabilizadores aceptables son no tóxicos para los receptores a las dosis y concentraciones utilizadas, e incluyen tampones, tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes, incluyendo ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbencilmonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio; cloruro de bencetonio; feniol, alcohol butílico o bencílico; alquilparabenos, tales como metil o propilparabén; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 residuos); proteínas, tales como albúmina sérica, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrofílicos, tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos, tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos, y otros carbohidratos, incluyendo glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes, tales como EDTA; azúcares, tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones formadores de sales, tales como sodio; complejos metálicos (por ejemplo complejos de Zn-proteína) y/o surfactantes no iónicos, tales como TWEEN<sup>TM</sup>, PLURONICS<sup>TM</sup> o polietilenglicol (PEG).

Las formulaciones ejemplares de anticuerpo anti-CD20 se describen en la patente WO nº 98/56418. Esta publicación describe una formulación líquida multidosis que comprende 40 mg/ml de rituximab, acetato 25 mM, trehalosa 150 mM, alcohol bencílico al 0,9%, polisorbato 20 al 0,02% a pH 5,0, que presenta una vida de almacenamiento mínima de dos años a una temperatura de entre 2°C y 8°C. Otra formulación anti-CD20 de interés comprende 10 mg/ml de rituximab en 9,0 mg/ml de cloruro sódico, 7,35 mg/ml de citrato sódico dihidrato, 0,7 mg/ml de polisorbato 80 y agua estéril para inyección, pH 6,5.

Las formulaciones liofilizadas adaptadas para la administración subcutánea se describen en la patente WO nº 97/04801. Estas formulaciones liofilizadas pueden reconstituirse con un diluyente adecuado hasta una concentración elevada de proteínas y la formulación reconstituida puede administrarse subcutáneamente en el mamífero que debe tratarse en la presente invención.

La formulación de la presente invención también puede contener más de un compuesto activo según resulte necesario para la indicación particular bajo tratamiento, preferentemente aquellos con actividades complementarias que no se afecten negativamente entre sí. Por ejemplo, puede resultar deseable proporcionar además un agente citotóxico, un agente quimioterapéutico, una citoquina o un agente inmunosupresor (por ejemplo uno que actúe sobre las células T, tal como la ciclosporina o un anticuerpo que se une a las células T, por ejemplo que se une a LFA-1). La cantidad eficaz de dichos otros agentes depende de la cantidad de antagonista presente en la formulación, del tipo de enfermedad, trastorno o tratamiento, y de otros factores comentados anteriormente. Estos generalmente se utilizan en las mismas dosis y con las vías de administración utilizadas en la presente invención anteriormente o en dosis de aproximadamente entre 1% y 99% de las dosis utilizadas hasta el momento en la presente invención.

Los ingredientes activos también pueden atraparse en microcápsulas preparadas, por ejemplo, mediante técnicas de coacervado o mediante polimerización interfacial, por ejemplo microcápsulas de hidroximetilcelulosa o de gelatina y microcápsulas de poli-(metilmacrilato), respectivamente, en sistemas de administración de fármaco coloidal (por ejemplo liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Dichas técnicas se dan a conocer en Remington's Pharmaceutical Sciences, 16a edición, Osol, A. editor, 1980.

Pueden prepararse preparaciones de liberación sostenida. Entre los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida se incluyen matrices semipermeables o polímeros hidrofílicos sólidos que contienen el antagonista, encontrándose las matrices en la forma de productos conformados, por ejemplo películas o microcápsulas. Entre los ejemplos de matrices de liberación sostenida se incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo poli(2-hidroxietil-metacrilato) o poli(alcohol vinílico), poliláctidos (patente US nº 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutámico y γ-etyl-L-glutamato, copolímero etileno-acetato de vinilo no degradable, copolímero degradable ácido láctico-ácido glicólico, tal como LUPRON DEPOT<sup>TM</sup> (microesferas inyectables compuestas de copolímero ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprólico) y ácido poli-D-(-)-3-hidroxibutírico.

Las formulaciones que deben utilizarse para la administración *in vivo* deben ser estériles. Esto se consigue fácilmente mediante filtración a través de membranas de filtración estéril.

60 V. *Tratamiento con el antagonista*

La presente invención se refiere a la terapia de una subpoblación de mamíferos, especialmente seres humanos, que padecen o son susceptibles de padecer AR, que presentan una respuesta inadecuada a un tratamiento anterior o actual con un inhibidor de TNF $\alpha$ . Generalmente el mamífero que debe tratarse de la presente invención se identifica, tras la terapia con uno o más tratamientos con uno o más inhibidores de TNF $\alpha$ , tales como Etanercept (ENBREL<sup>®</sup>), infliximab (REMICADE<sup>®</sup>) o adalimumab (HUMIRA<sup>TM</sup>), como aquél que experimenta una respuesta inadecuada a un tratamiento anterior o actual con un inhibidor de TNF $\alpha$  debido a toxicidad y/o eficacia inadecuada. Sin embargo, la invención no se encuentra limitada a una etapa de terapia anterior con dicho inhibidor de TNF $\alpha$ ; por ejemplo, el

paciente puede considerarse que está predispuesto a experimentar una toxicidad, por ejemplo toxicidad cardíaca, con un inhibidor de TNF $\alpha$  antes de iniciar la terapia con el mismo, o puede determinarse que el paciente es improbable que responda a la terapia con un inhibidor de TNF $\alpha$ .

- 5 La enfermedad autoinmunológica que debe tratarse de la presente invención es la artritis reumatoide.

Generalmente, el mamífero tratado de la presente invención no sufre una malignidad de células B. El enfoque terapéutico puede reducir los efectos secundarios negativos (tales como infecciones, fallo cardíaco y desmielinización) asociados a la terapia con un inhibidor de TNF $\alpha$ .

- 10 La composición que comprende un antagonista que se une a un marcador de superficie de células B se formula, dosifica y administra de un modo consistente con la buena práctica médica. Entre los factores a considerar en el  
15 presente contexto se incluyen la enfermedad o trastorno particular bajo tratamiento, el mamífero particular bajo tratamiento, la condición clínica del paciente individual, la causa de la enfermedad o trastorno, el sitio de administración del agente, el procedimiento de administración, el programa de administración y otros factores conocidos por los médicos. La cantidad terapéuticamente eficaz del antagonista que debe administrarse se encontrará gobernada por estas consideraciones.

El antagonista es un anticuerpo, por ejemplo un anticuerpo, tal como RITUXAN®, que no se encuentra conjugado con un agente citotóxico.

El régimen de dosificación es 1.000 mg x 2 (los días 1 y 15).

- Para obtener los resultados más eficaces, dependiendo de la enfermedad o trastorno, el antagonista se administra en el momento más próximo posible al primer indicio, diagnóstico, aparición o incidencia de la enfermedad o trastorno o durante remisiones de la enfermedad o trastorno.

30 El antagonista se administra mediante cualquier medio adecuado, incluyendo la vía parenteral, subcutánea, intraperitoneal, intrapulmonar e intranasal y, si se desea para el tratamiento inmunosupresor local, la administración intralesional. Entre las infusiones parenterales se incluyen la administración intramuscular, intravenosa, intraarterial, intraperitoneal o subcutánea. Además, el antagonista puede administrarse convenientemente mediante infusión de pulsos, por ejemplo con dosis progresivamente más bajas del antagonista. Preferentemente la dosificación se proporciona mediante inyecciones, más preferentemente inyecciones intravenosas o subcutáneas, dependiendo en parte de si la administración es breve o crónica.

- 35 Pueden administrarse otros compuestos, tales como agentes citotóxicos, agentes quimioterapéuticos, agentes inmunosupresores y/o citoquinas con los antagonistas de la presente invención. La administración combinada incluye la coadministración, la utilización de formulaciones separadas o una única formulación farmacéutica, y la administración consecutiva en cualquier orden, en la que preferentemente existe un periodo de tiempo en el que ambos (o todos) los agentes activos ejercen simultáneamente sus actividades biológicas. Para la AR, el antagonista (por ejemplo el anticuerpo CD20) puede combinarse uno o más cualesquiera de entre los fármacos antirreumáticos modificadores de enfermedad (DMARDs), tales como hidroxicloroquina, sulfasalazina, metotrexato, leflunómido, azatioprina, D-penicilamina, oro (oral), oro (intramuscular), minociclina, ciclosporina, inmunoabsorción de proteína A estafilocílica, inmunoglobulina intravenosa (IVIG), fármacos antiinflamatorios no esteroideos (NSAIDs), glucocorticoide (por ejemplo mediante inyección articular), corticoesteroide (por ejemplo metilprednisolona y/o prednisona), folato, etc. Preferentemente no se administra un inhibidor de TNF $\alpha$  en el mamífero durante el periodo de tratamiento con el antagonista de CD20.

50 Aparte de la administración de antagonistas de proteína en el paciente, la presente solicitud contempla la administración de antagonistas mediante terapia génica. Esta administración de ácidos nucleicos codificantes del antagonista se encuentra comprendida en la expresión “administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un antagonista” (ver, por ejemplo, la patente WO nº 96/07321, publicada el 14 de marzo de 1996, referente a la utilización de terapia génica para generar anticuerpos intracelulares).

- 55 Existen dos enfoques principales para la introducción de ácidos nucleicos (opcionalmente contenidos en un vector) en las células de un paciente: *in vivo* y *ex vivo*. Para la administración *in vivo*, el ácido nucleico se inyecta directamente en el paciente, habitualmente en el sitio en el que se requiere el antagonista. Para el tratamiento *ex vivo*, se extraen las células del paciente, se introducen los ácidos nucleicos en estas células aisladas y se administran las células modificadas en el paciente directamente o, por ejemplo, encapsuladas dentro de membranas porosas que se implantan en el paciente (ver, por ejemplo, las patentes US nº 4.892.538 y nº 5.283.187). Se dispone de una diversidad de técnicas para introducir ácidos nucleicos en células viables. Las técnicas varían dependiendo de si el ácido nucleico se transfiere al interior de células cultivadas *in vitro*, o *in vivo* a células del huésped pretendido. Entre las técnicas adecuadas para la transferencia de ácidos nucleicos en células de mamífero *in vitro* se incluyen la utilización de liposomas, la electroporación, la microinyección, la fusión celular, DEAE-dextrano, el procedimiento de precipitación de fosfato de calcio, etc. Un vector utilizado comúnmente para la administración *ex vivo* del gen es un retrovirus.

Entre las técnicas de transferencia *in vivo* de ácidos nucleicos actualmente preferentes se incluyen la transfección con vectores víricos (tales como adenovirus, virus del herpes simplex I o virus adenoasociado) y sistemas basados en

lípidos (por ejemplo, resultan lípidos útiles para la transferencia génica mediada por lípidos: DOTMA, DOPE y DC-Chol). En algunas situaciones resulta deseable proporcionar la fuente de ácidos nucleicos con un agente que reconozca las células diana, tal como un anticuerpo específico para una proteína membranal de superficie celular o la célula diana, un ligando para un receptor sobre la célula diana, etc. En el caso de que se utilicen liposomas, pueden utilizarse para la 5 vectorización y/o para facilitar la incorporación, proteínas que se unen a una proteína membranal de superficie celular asociada con la endocitosis, por ejemplo proteínas de cápside o fragmentos de las mismas trópicas para un tipo celular particular, anticuerpos para proteínas que experimentan internalización durante el ciclado y proteínas que reconocen 10 localizaciones intracelulares e incrementan la vida media intracelular. La técnica de endocitosis mediada por receptor se describe, por ejemplo, en Wu *et al.*, J. Biol. Chem. 262:4429-4432, 1987, y en Wagner *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:3410-3414, 1990. Para una revisión de los protocolos de marcaje y terapia génicos conocidos en la actualidad 15 ver Anderson *et al.*, Science 256:808-813, 1992. Ver también la patente WO nº 93/25673 y las referencias citadas en la misma.

Los siguientes Ejemplos no limitativos ilustran detalles adicionales de la invención.

15

#### Ejemplo 1

Un paciente con artritis reumatoide activa que presenta una respuesta inadecuada a una o más terapias de inhibidor 20 de TNF $\alpha$  se trata con un anticuerpo que se une al antígeno de superficie de las células B, CD20.

Entre los candidatos para la terapia según el presente ejemplo se incluyen aquellos que han experimentado una respuesta inadecuada al tratamiento anterior o actual con etanercept, infliximab y/o adalimumab debido a toxicidad o eficacia inadecuada (etanercept durante  $\geq 3$  meses, 25 mg dos veces por semana o por lo menos 4 infusiones de 25 infliximab a una concentración de  $\geq 3$  mg/kg).

Los pacientes pueden presentar un recuento de articulaciones inflamadas (SJC) $\geq 8$  (recuento de articulaciones: 66) y un recuento de articulaciones dolorosas (TJC) $\geq 8$  (recuento de articulaciones: 68) durante el cribado y la aleatorización, una CRP $\geq 1,5$  mg/dl (15 mg/l) o una ESR $\geq 28$  mm/h y/o evidencia radiográfica de por lo menos una articulación con erosión definida atribuible a la artritis reumatoide, según se determina a partir del sitio central de lectura (puede considerarse cualquier articulación de las manos, muñecas o pies con la excepción de las articulaciones DIP de las manos).

El anticuerpo de CD20 utilizado para la terapia puede ser rituximab (disponible comercialmente de Genentech, 35 Inc.) o 2H7 v16 humanizado.

Los pacientes se tratan con una dosis terapéuticamente eficaz del anticuerpo de CD20, 1.000 mg i.v. los días 1 y 15.

40 Los pacientes también pueden recibir MTX concomitantemente (10 a 25 mg/semana por vía oral (p.o.) o parenteral) conjuntamente con un régimen de corticoesteroides consistente de metilprednisolona 100 mg i.v. 30 minutos antes de las infusiones del anticuerpo de CD20 y prednisona 60 mg p.o. los días 2 a 7, 30 mg p.o. los días 8 a 14, volviendo a la dosis de línea base alcanzado el día 16. Los pacientes también pueden recibir folato (5 mg/semana), administrado en forma de dosis única o en forma de dosis divididas diarias. Los pacientes opcionalmente continúan recibiendo cualquier corticoesteroide de base ( $\leq 10$  mg/día de prednisona o equivalente) durante la totalidad del periodo de tratamiento.

45 El criterio de valoración primario puede ser la proporción de pacientes con una respuesta de ACR20 en la semana 24 utilizando un ensayo de Cochran-Mantel-Haenszel (CMH) para comparar las diferencias entre grupos, ajustado para el factor y región reumatoideas.

Entre los criterios de valoración secundarios potenciales se incluyen:

- 55 1. Proporción de pacientes con ACR50 y 70 respuestas en la semana 24. Éstas pueden analizarse tal como se especifica para el criterio de valoración primario.
2. Cambio en las puntuaciones de actividad de enfermedad (DAS) entre el cribado y la semana 24. Éstas pueden evaluarse utilizando un modelo ANOVA con DAS de línea base, factor reumatoide y tratamiento como términos en el modelo.
3. Respondedores de DAS categórico (respuesta EULAR) en la semana 24. Éstos pueden evaluarse utilizando un ensayo CMH ajustado para el factor reumatoide.
4. Cambios derivados del cribado en el conjunto central de la ACR (SJC, TJC, evaluaciones globales del paciente y del médico, HAQ, dolor, CPR y ESR). Para estos parámetros pueden proporcionarse estadísticos descriptivos.

5 5. Cambios derivados del cribado en SF-36. Pueden proporcionarse estadísticos descriptivos para las puntuaciones de los 8 dominios y de las puntuaciones del componente mental y del componente físico. Además, las puntuaciones del componente mental y del componente físico pueden categorizarse y analizarse adicionalmente.

6 6. Cambios en la puntuación total radiográfica de Sharp modificada, puntuación de erosión y puntuación de estrechamiento del espacio articular. Estas pueden analizarse utilizando metodología continua o categórica, según resulte apropiado.

10 Los criterios de valoración y análisis exploratorios pueden implicar:

15 ACR(20/50/70 y ACR n) y cambio en las respuestas DAS en las semanas 8, 12, 16, 20, 24 y posteriormente se evalúa utilizando un modelo de medidas repetidas binario o continuo, según resulte apropiado. Los análisis radiográficos exploratorios, incluyendo la proporción de pacientes sin progresión erosiva, pueden evaluarse en la semana 24 y en semanas posteriores.

20 Los criterios de valoración exploratoria adicionales (por ejemplo la respuesta clínica completa, el periodo libre de enfermedad) se analizan descriptivamente como parte del periodo de observación extendido.

25 Se analizan los cambios respecto al cribado en fatiga FACIT-F se analizan utilizando estadísticos descriptivos.

La terapia de AR con el anticuerpo de CD20 en pacientes con una respuesta inadecuada a la terapia de inhibidor de TNF $\alpha$  tal como se ha descrito anteriormente resultará en una respuesta clínica beneficiosa según cualquiera de los criterios de valoración indicados anteriormente.

### Referencias citadas en la descripción

30 Esta lista de referencias citadas por el solicitante está prevista únicamente para ayudar al lector y no forma parte del documento de patente europea. Aunque se ha puesto el máximo cuidado en su realización, no se pueden excluir errores u omisiones y la OEP declina cualquier responsabilidad en este respecto.

### Documentos de patente citados en la descripción

- 35 • US 5595721 A, **Kaminski** [0007] [0049]
- US 5736137 A, **Anderson** [0008] [0009] [0049] [0049] [0050]
- 40 • US 5776456 A [0009]
- US 6399061 B [0009]
- US 5843439 A [0009]
- 45 • US 20020197255 A1 [0009]
- US 20030021781 A1, **Anderson** [0009]
- US 6455043 B1 [0009]
- 50 • WO 0009160 A, **Grillo-Lopez**, A. [0009]
- WO 0027428 A, **Grillo-Lopez** and **White** [0009]
- 55 • WO 0027433 A, **Grillo-Lopez** and **Leonard** [0009]
- WO 0044788 A, **Braslawsky** [0009]
- WO 0110462 A, **Rastetter**, W. [0009]
- 60 • WO 0110461 A [0009]
- WO 0110460 A, **White** and **Grillo-Lopez** [0009]
- 65 • US 20020006404 A [0009]
- WO 0204021 A, **Hanna** and **Hariharan** [0009]

- US 20020012665 A1 [0009]
- WO 0174388 A, **Hanna**, N. [0009]
- 5 • US 20020009444 A1 [0009]
- WO 0180884 A, **Grillo-Lopez**, A. [0009]
- 10 • WO 0197858 A, **White**, C. [0009]
- US 20020128488 A1 [0009]
- WO 0234790 A, **Reff**, M. [0009]
- 15 • WO 02060955 A, **Braslawsky** [0009]
- WO 2096948 A, **Braslawsky** [0009]
- WO 02079255 A, **Reff** and **Davies** [0009]
- 20 • US 6171586 B1 [0009]
- WO 9856418 A, **Lam** [0009] [0133]
- 25 • WO 9858964 A, **Raju**, S. [0009]
- WO 9922764 A, **Raju**, S. [0009]
- WO 9951642 A [0009]
- 30 • US 6194551 B1 [0009]
- US 6242195 B1 [0009]
- 35 • US 6528624 B1 [0009]
- US 6538124 B, **Idusogie** [0009]
- WO 0042072 A, **Presta**, L. [0009]
- 40 • WO 0067796 A, **Curd** [0009]
- WO 0103734 A, **Grillo-Lopez** [0009]
- 45 • US 20020004587 A1 [0009]
- WO 0177342 A, **Miller** and **Presta** [0009]
- US 20020197256 A, **Grewal**, I. [0009]
- 50 • US 6090365 B1 [0009]
- US 6287537 B1 [0009]
- 55 • US 6015542 B1 [0009]
- US 5843398 B1 [0009]
- US 5595721 B1, **Kaminski** [0009]
- 60 • US 5500362 A [0009] [0027]
- US 5677180 A [0009] [0049]
- 65 • US 5721108 A [0009]
- US 6120767 A, **Robinson** [0009]

# ES 2 322 267 T3

- US 6410391 B1, **Raubitschek** [0009]
- US 6224866 B1 [0009]
- 5       • WO 0020864 A, **Barbera-Guillem**, E. [0009]
- WO 0113945 A, **Barbera-Guillem**, E. [0009]
- 10       • WO 0067795 A, **Goldenberg** [0009]
- WO 0074718 A, **Goldenberg**, and **Hansen** [0009]
- 15       • WO 0076542 A, **Golay** [0009]
- WO 0172333 A, **Wolin** and **Rosenblatt** [0009]
- 20       • US 6368596 B1, **Ghetie** [0009]
- US 20020041847 A1, **Goldenberg**, D. [0009]
- 25       • US 20030026801 A1, **Weiner** and **Hartmann** [0009]
- WO 02102312 A, **Engleman**, E. [0009]
- 30       • US 5849898 A [0009]
- EP 330191 A, **Seed** [0009]
- US 4861579 A [0009]
- 35       • EP 332865 A2, **Meyer** and **Weiss** [0009]
- WO 9503770 A, **Bhat** [0009]
- 40       • US 5821337 A [0027]
- EP 404097 A [0043]
- WO 9311161 A [0043]
- 45       • US 4816567 A [0044] [0045] [0072] [0082] [0084]
- US 5693780 A [0045]
- 50       • US 4665077 A [0059]
- US 4120649 A [0059]
- WO 9008187 A [0059]
- 55       • US 5114721 A, **Cohen** [0059]
- WO 9011294 A [0059]
- 60       • WO 9101133 A [0059]
- EP 340109 A [0059]
- US 5591669 A [0087]
- 65       • US 5589369 A [0087]
- US 5545807 A [0087]
- US 5565332 A [0088]
- US 5573905 A [0088]

- US 5567610 A [0089]
- US 5229275 A [0089]
- 5      • WO 9316185 A [0090]
- US 5571894 A [0090]
- 10     • US 5587458 A [0090]
- US 5641870 A [0090]
- 15     • WO 9308829 A [0092]
- WO 9404690 A [0094]
- US 5731168 A [0095]
- 20     • US 4676980 A [0096] [0096]
- WO 9100360 A [0096]
- WO 92200373 A [0096]
- 25     • EP 03089 A [0096]
- US 5208020 A [0103]
- 30     • WO 9321232 A [0105]
- WO 9411026 A [0108]
- WO 8101145 A [0111]
- 35     • WO 8807378 A [0111]
- US 4975278 A [0111]
- US 4485045 A [0116]
- 40     • US 4544545 A [0116]
- WO 9738731 A [0116]
- 45     • US 5013556 A [0116]
- US 5739277 A [0131]
- WO 9704801 A [0134]
- 50     • US 3773919 A [0137]
- WO 9607321 A [0148]
- 55     • US 4892538 A [0149]
- US 5283187 A [0149]
- WO 9325673 A [0150]
- 60     • EP 04759142 A [0164]
- US 2004010509 W [0164]
- 65     • US 60461481 B [0164]

**Literatura no de patentes citada en la descripción**

- VALENTINE *et al. J. Biol. Chem.*, 1989, vol. 264 (19), 11282-11287 [0004]
- 5 • EIFELD *et al. EMBO J.*, 1988, vol. 7 (3), 711-717 [0004]
- ANDERSON *et al. Blood*, 1984, vol. 63 (6), 1424-1433 [0004]
- 10 • TEDDER *et al. J. Immunol.*, 1985, vol. 135 (2), 973-979 [0004]
- TEDDER *et al. J. Cell. Biochem.*, 1990, vol. 14D, 195 [0004]
- 15 • Lymphocyte Typing II. NADLER, L. *et al.* Appendix. *Springer Verlag*, 1986, vol. 2, 3-37 [0006]
- KIESEL *et al. Leukemia Research II*, 1987, vol. 12, 1119 [0006]
- 20 • NADLER *et al. J. Immunol.*, 1983, vol. 131, 244 [0006]
- NADLER *et al. Progress in Hematology. Grune & Stratton, Inc*, 1981, vol. XII, 187-206 [0006]
- 25 • REFF *et al. Blood*, 1994, vol. 83 (2), 435-445 [0008] [0008]
- MALONEY *et al. Blood*, 1996, vol. 88 (10), 637<sup>a</sup> [0008]
- 30 • DEMIDEM *et al. Cancer Chemotherapy & Radiopharmaceuticals*, 1997, vol. 12 (3), 177-186 [0008]
- PEROTTA; ABUEL. Response of chronic relapsing ITP of 10 years duration to Rituximab. *Blood*, 1998, vol. 10 (1-2), 88B [0010]
- 35 • STASHI *et al.* Rituximab chimeric anti-CD20 monoclonal antibody treatment for adults with chronic idiopathic thrombocytopenic purpura. *Blood*, 2001, vol. 98 (4), 952-957 [0010]
- MATTHEWS, R. Medical Heretics. *New Scientist*, 07 April 2001 [0010]
- 40 • LEANDRO *et al.* Clinical outcome in 22 patients with rheumatoid arthritis treated with B lymphocyte depletion. *Ann Rheum Dis*, 2002, vol. 61, 833-888 [0010]
- LEANDRO *et al.* Lymphocyte depletion in rheumatoid arthritis: early evidence for safety, efficacy and dose response. *Arthritis and Rheumatism*, 2001, vol. 44 (9), S370 [0010]
- 45 • LEANDRO *et al.* An open study of B lymphocyte depletion in systemic lupus erythematosus. *Arthritis & Rheumatism*, 2002, vol. 46 (1), 2673-2677 [0010]
- EDWARDS; CAMBRIDGE. Sustained improvement in rheumatoid arthritis following a protocol designed to deplete B lymphocytes. *Rheumatology*, 2001, vol. 40, 205-211 [0010]
- 50 • EDWARDS *et al.* B-lymphocyte depletion therapy in rheumatoid arthritis and other autoimmune disorders. *Biochem. Soc. Trans.*, 2002, vol. 30 (4), 824-828 [0010]
- EDWARDS *et al.* Efficacy and safety of Rituximab, a B-cell targeted chimeric monoclonal antibody: A randomized, placebo controlled trial in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis and Rheumatism*, 2002, vol. 46 (9), 197 [0010]
- 55 • LEVINE; PESTRONK. IgM antibody-related polyneuropathies: B-cell depletion chemotherapy using Rituximab. *Neurology*, 1999, vol. 52, 1701-1704 [0010]
- DEVITA *et al.* Efficacy of selective B cell blockade in the treatment of rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheum*, 2002, vol. 46, 2029-2033 [0010]
- 60 • HIDASHIDA *et al.* Treatment of DMARD-Refractory rheumatoid arthritis with rituximab. *Annual Scientific Meeting of the American College of Rheumatology*, 24 October 2002 [0010]
- TUSCANO, J. Successful treatment of Infliximab refractory rheumatoid arthritis with rituximab. *Annual Scientific Meeting of the American College of Rheumatology*, 24 October 2002 [0010]
- 65 • Guidelines for the management of rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatism*, February 2002, vol. 46 (2), 328-346 [0011]

- **PENNICA** *et al.* *Nature*, 1984, vol. 312, 721 [0017]
- **AGGARWAL** *et al.* *JBC*, 1985, vol. 260, 2345 [0017]
- 5     • **CLARK** *et al.* *PNAS (USA)*, 1985, vol. 82, 1766 [0024]
- **RAVETCH; KINET**. *Annu. Rev. Immunol.*, 1991, vol. 9, 457-92 [0027] [0029]
- 10    • **CLYNES** *et al.* *PNAS (USA)*, 1998, vol. 95, 652-656 [0027]
- **DAËRON**. *Annu. Rev. Immunol.*, 1997, vol. 15, 203-234 [0029]
- 15    • **CAPEL** *et al.* *Immunomethods*, 1994, vol. 4, 25-34 [0029]
- **DE HAAS** *et al.* *J. Lab. Clin. Med.*, 1995, vol. 126, 330-41 [0029]
- 20    • **GUYER** *et al.* *J. Immunol.*, 1976, vol. 117, 587 [0029]
- **KIM** *et al.* *J. Immunol.*, 1994, vol. 24, 249 [0029]
- **GAZZANO-SANTORO** *et al.* *J. Immunol. Methods*, 1996, vol. 202, 163 [0030]
- **KABAT** *et al.* Sequences of Proteins of Immunological Interest. *National Institutes of Health*, 1991 [0036] [0047]
- 25    • **PLÜCKTHUN**. The Pharmacology of Monoclonal Antibodies. *Springer-Verlag*, 1994, vol. 113, 269-315 [0042]
- **HOLLINGER** *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1993, vol. 90, 6444-6448 [0043] [0099]
- 30    • **KOHLER** *et al.* *Nature*, 1975, vol. 256, 495 [0044] [0072]
- **CLACKSON** *et al.* *Nature*, 1991, vol. 352, 624-628 [0044] [0081] [0088]
- 35    • **MARKS** *et al.* *J. Mol. Biol.*, 1991, vol. 222, 581-597 [0044] [0081] [0088]
- **MORRISON** *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1984, vol. 81, 6851-6855 [0045]
- 40    • **JONES** *et al.* *Nature*, 1986, vol. 321, 522-525 [0046] [0084]
- **RIECHMANN** *et al.* *Nature*, 1988, vol. 332, 323-329 [0046]
- 45    • **PRESTA**. *Curr. Op. Struct. Biol.*, 1992, vol. 2, 593-596 [0046]
- **CHOTHIA; LESK**. *J. Mol. Biol.*, 1987, vol. 196, 901-917 [0047]
- 50    • **PRESS** *et al.* *Blood*, 1987, vol. 69 (2), 584-591 [0049]
- **VALENTINE** *et al.* Leukocyte Typing III. *Oxford University Press*, 1987, 440 [0049]
- 55    • **OFFNER** *et al.* *Science*, 1991, vol. 251, 430-432 [0059]
- **IANEWAY**. *Nature*, 1989, vol. 341, 482 [0059]
- 55    • **WILMAN**. Prodrugs in Cancer Chemotherapy. *Biochemical Society Transactions*, 1986, vol. 14, 375-382 [0063]
- Prodrugs: A Chemical Approach to Targeted Drug Delivery. **STELLA** *et al.* Directed Drug Delivery. *Humana Press*, 1985, 247-267 [0063]
- 60    • **GODING**. Monoclonal Antibodies: Principles and Practice. *Academic Press*, 1986, 59-103 [0073] [0078]
- **KOZBOR**. *J. Immunol.*, 1984, vol. 133, 3001 [0075]
- 65    • **BRODEUR** *et al.* Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications. *Marcel Dekker, Inc*, 1987, 51-63 [0075]
- **MUNSON** *et al.* *Anal. Biochem.*, 1980, vol. 107, 220 [0077]

- **SKERRA** *et al.* *Curr. Opinion in Immunol.*, 1993, vol. 5, 256-262 [0080]
- **PLÜCKTHUN**. *Immunol. Revs.*, 1992, vol. 130, 151-188 [0080]
- 5     • **MCCAFFERTY** *et al.* *Nature*, 1990, vol. 348, 552-554 [0081]
- 10    • **MARKS** *et al.* *Bio/Technology*, 1992, vol. 10, 779-783 [0081]
- 15    • **WATERHOUSE** *et al.* *Nuc. Acids. Res.*, 1993, vol. 21, 2265-2266 [0081]
- 20    • **MORRISON** *et al.* *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 1984, vol. 81, 6851 [0082]
- 25    • **RIECHMANN** *et al.* *Nature*, 1988, vol. 332, 323-327 [0084]
- 30    • **VERHOEYEN** *et al.* *Science*, 1988, vol. 239, 1534-1536 [0084]
- 35    • **SIMS** *et al.* *J. Immunol.*, 1993, vol. 151, 2296 [0085]
- 40    • **CHOTHIA** *et al.* *J. Mol. Biol.*, 1987, vol. 196, 901 [0085]
- 45    • **CARTER** *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1992, vol. 89, 4285 [0085]
- 50    • **PRESTA** *et al.* *J. Immunol.*, 1993, vol. 151, 2623 [0085]
- 55    • **JAKOBOVITS** *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1993, vol. 90, 2551 [0087]
- 60    • **JAKOBOVITS** *et al.* *Nature*, 1993, vol. 362, 255-258 [0087]
- 65    • **BRUGGERMANN** *et al.* *Year in Immuno.*, 1993, vol. 7, 33 [0087]
- 70    • **MCCAFFERTY** *et al.* *Nature*, 1990, vol. 348, 552-553 [0088]
- 75    • **JOHNSON, KEVIN S.; CHISWELL, DAVID J.** *Current Opinion in Structural Biology*, 1993, vol. 3, 564-571 [0088]
- 80    • **GRIFFITH** *et al.* *EMBO J.*, 1993, vol. 12, 725-734 [0088]
- 85    • **MORIMOTO** *et al.* *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 1992, vol. 24, 107-117 [0090]
- 90    • **BRENNAN** *et al.* *Science*, 1985, vol. 229, 81 [0090] [0097]
- 95    • **CARTER** *et al.* *Bio/Technology*, 1992, vol. 10, 163-167 [0090]
- 100   • **MILLSTEI** *et al.* *Nature*, 1983, vol. 305, 537-539 [0092]
- 105   • **TRAUNECKER** *et al.* *EMBO J.*, 1991, vol. 10, 3655-3659 [0092]
- 110   • **SURESH** *et al.* *Methods in Enzymology*, 1986, vol. 121, 210 [0094]
- 115   • **SHALABY** *et al.* *J. Exp. Med.*, 1992, vol. 175, 217-225 [0098]
- 120   • **KOSTELNY** *et al.* *J. Immunol.*, 1992, vol. 148 (5), 1547-1553 [0099]
- 125   • **GRUBER** *et al.* *J. Immunol.*, 1994, vol. 152, 5368 [0099]
- 130   • **TUTT** *et al.* *J. Immunol.*, 1991, vol. 147, 60 [0100]
- 135   • **CHARI** *et al.* *Cancer Research*, 1992, vol. 52, 127-131 [0103] [0108]
- 140   • **HINMAN** *et al.* *Cancer Research*, 1993, vol. 53, 3336-3342 [0104]
- 145   • **LODE** *et al.* *Cancer Research*, 1998, vol. 58, 2925-2928 [0104]
- 150   • **VITETTA** *et al.* *Science*, 1987, vol. 238, 1098 [0108]
- 155   • **MASSEY**. *Nature*, 1987, vol. 328, 457-458 [0113]

ES 2 322 267 T3

- **NEUBERGER** *et al. Nature*, 1984, vol. 312, 604-608 [0114]
- **EPSTEIN** *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1985, vol. 82, 3688 [0116]
- 5 • **HWANG** *et al. Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 1980, vol. 77, 4030 [0116]
- **MARTIN** *et al. J. Biol. Chem.*, 1982, vol. 257, 286-288 [0117]
- 10 • **GABIZON** *et al. J. National Cancer Inst.*, 1989, vol. 81 (19), 1484 [0117]
- **CUNNINGHAM; WELLS**. *Science*, 1989, vol. 244, 1081-1085 [0119]
- 15 • **CARON** *et al. J. Exp Med.*, 1992, vol. 176, 1191-1195 [0130]
- **SHOPES**, B. *J. Immunol.*, 1992, vol. 148, 2918-2922 [0130]
- **WOLFF** *et al. Cancer Research*, 1993, vol. 53, 2560-2565 [0130]
- 20 • **STEVENSON** *et al. Anti-Cancer Drug Design*, 1989, vol. 3, 219-230 [0130]
- *Remington's Pharmaceutical Sciences*. 1980 [0132]
- **WU** *et al. J. Biol. Chem.*, 1987, vol. 262, 4429-4432 [0150]
- 25 • **WAGNER** *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1990, vol. 87, 3410-3414 [0150]
- **ANDERSON** *et al. Science*, 1992, vol. 256, 808-813 [0150]

30

35

40

45

50

55

60

65

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Utilización de un anticuerpo que se une a CD20 y que, tras la unión a CD20, destruye o reduce el número de células B en un mamífero, en la preparación de un medicamento para tratar la artritis reumatoide mediante la administración de dos dosis de anticuerpo de 1.000 mg a un mamífero que experimenta una respuesta inadecuada a un inhibidor de TNF $\alpha$ , en la que la primera dosis se administra el día 1 de tratamiento y la segunda dosis el día 15.
- 10 2. Utilización según la reivindicación 1, en la que el mamífero es el ser humano.
- 15 3. Utilización según la reivindicación 1, en la que el anticuerpo no se encuentra conjugado con un agente citotóxico.
- 20 4. Utilización según la reivindicación 1, en la que el anticuerpo comprende rituximab.
- 25 5. Utilización según la reivindicación 1, en la que el medicamento es para la administración intravenosa.
- 30 6. Utilización según la reivindicación 1, en la que el medicamento es para la administración con metotrexato (MTX).
- 35 7. Utilización según la reivindicación 6, en la que el medicamento es para la administración con corticoesteroide.
- 40 8. Utilización según la reivindicación 10, en la que el corticoesteroide consiste de metilprednisolona y prednisona.
- 45 9. Anticuerpo que se une a CD20 y que tras la unión a CD20 destruye o reduce el número de células B en un mamífero, para la utilización en un procedimiento para tratar la artritis reumatoide mediante la administración de dos dosis de anticuerpo de 1.000 mg a un mamífero que presenta una respuesta inadecuada a un inhibidor de TNF $\alpha$ , donde en el procedimiento la primera dosis se administra el día 1 de tratamiento y la segunda dosis el día 15.
- 50 10. Anticuerpo para la utilización según la reivindicación 9, en el que el mamífero es el ser humano.
- 55 11. Anticuerpo para la utilización según la reivindicación 9, en el que el anticuerpo no se encuentra conjugado con un agente citotóxico.
- 60 12. Anticuerpo para la utilización según la reivindicación 9, en el que el anticuerpo comprende rituximab.
- 65 13. Anticuerpo para la utilización según la reivindicación 9, en el que el procedimiento comprende la administración intravenosa del anticuerpo.
- 70 14. Anticuerpo para la utilización según la reivindicación 9, en el que el procedimiento comprende la administración del anticuerpo con metotrexato (MTX).
- 75 15. Anticuerpo según la reivindicación 14, en el que el procedimiento comprende la administración del anticuerpo con corticoesteroide.
- 80 16. Anticuerpo según la reivindicación 15, en el que el corticoesteroide consiste de metilprednisolona y prednisona.

50

55

60

65

# ES 2 322 267 T3

## LISTA DE SECUENCIAS

<110> GENENTECH, INC.

5 <120> TERAPIA DE LA ENFERMEDAD AUTOINMUNOLÓGICA EN UN PACIENTE CON UNA RESPUESTA  
INADECUADA A UN INHIBIDOR DE TNF-ALFA

10 <130> SMW/FP6331276

<140> EPA 04759142.5

<141> 2004-04-06

15 <150> PCT/US2004/010509

<151> 2004-04-06

<150> US 60/461.481

20 <151> 2003-04-09

<160> 4

25 <210> 1

<211> 107

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

30 <220>

<223> secuencia humanizada

35 <400>

40	Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val	1	5	10	15
	Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser	20	25	30	
45	Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Pro	35	40	45	
50	Leu Ile Tyr Ala Pro Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg	50	55	60	
	Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser	65	70	75	
55	Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp	80	85	90	
60	Ser Phe Asn Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile	95	100	105	
65	Lys Arg				

ES 2 322 267 T3

<210> 2

<211> 122

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> secuencia humanizada

<400> 2

15           Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly  
              1                       5                       10                       15

20           Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr  
              20                       25                       30

25           Ser Tyr Asn Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu  
              35                       40                       45

30           Glu Trp Val Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr  
              50                       55                       60

35           Asn Gln Lys Phe Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Val Asp Lys Ser  
              65                       70                       75

40           Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp  
              80                       85                       90

45           Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Val Val Tyr Tyr Ser Asn Ser  
              95                       100                       105

50           Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val  
              110                       115                       120

45           Ser Ser

50 <210> 3

<211> 213

<212> PRT

55 <213> Secuencia artificial

<220>

60 <223> secuencia humanizada

## ES 2 322 267 T3

&lt;400&gt; 3

5	Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val	1	5	10	15
10	Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser	20	25	30	
15	Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Pro	35	40	45	
20	Leu Ile Tyr Ala Pro Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg	50	55	60	
25	Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser	65	70	75	
30	Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp	80	85	90	
35	Ser Phe Asn Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile	95	100	105	
40	Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser	110	115	120	
45	Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu	125	130	135	
50	Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp	140	145	150	
55	Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln	155	160	165	
60	Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu	170	175	180	
65	Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val	185	190	195	
70	Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg	200	205	210	
75	Gly Glu Cys				

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 452

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Secuencia artificial

ES 2 322 267 T3

<220>

<223> secuencia humanizada

5 <400> 4

10	Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly	1	5	10	15
15	Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr	20	25	30	
	Ser Tyr Asn Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu	35	40	45	
20	Glu Trp Val Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr	50	55	60	
25	Asn Gln Lys Phe Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Val Asp Lys Ser	65	70	75	
30	Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp	80	85	90	
35	Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Val Val Tyr Tyr Ser Asn Ser	95	100	105	
	Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val	110	115	120	
40	Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro	125	130	135	
45	Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu	140	145	150	
	Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser				

50

55

60

65

## ES 2 322 267 T3

	155	160	165
5	Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln		
	170	175	180
	Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser		
	185	190	195
10	Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys		
	200	205	210
15	Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys		
	215	220	225
	Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu		
	230	235	240
20	Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr		
	245	250	255
25	Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp		
	260	265	270
	Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp		
	275	280	285
30	Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln		
	290	295	300
	Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His		
35	305	310	315
	Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn		
	320	325	330
40	Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys		
	335	340	345
	Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg		
45	350	355	360
	Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys		
	365	370	375
50	Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly		
	380	385	390
	Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser		
55	395	400	405
	Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser		
	410	415	420
60	Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu		
	425	430	435
	Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro		
	440	445	450
65	Gly Lys		