

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 808 726**

51 Int. Cl.:

A61K 38/00	(2006.01)
C07K 16/08	(2006.01)
C07K 16/20	(2006.01)
C07K 16/30	(2006.01)
C07K 16/32	(2006.01)
C07K 16/40	(2006.01)
C07K 14/245	(2006.01)
C07K 16/28	(2006.01)
C07K 14/25	(2006.01)
A61K 39/00	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.03.2014 PCT/US2014/023198**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **09.10.2014 WO14164680**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.03.2014 E 14720298 (0)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.05.2020 EP 2970478**

54 Título: **Inmunotoxinas de unión a CD20 para inducir la internalización celular y procedimientos que usan las mismas**

30 Prioridad:
12.03.2013 US 201361777130 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
01.03.2021

73 Titular/es:
**MOLECULAR TEMPLATES, INC. (100.0%)
9301 Amberglen Boulevard, Suite 100
Austin, TX 78729, US**

72 Inventor/es:
**POMA, ERIC;
WILLERT, ERIN;
KIM, JASON;
HIGGINS, JACK y
RAJAGOPALAN, SANGEETHA**

74 Agente/Representante:
SALVÀ FERRER, Joan

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 808 726 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

Inmunotoxinas de unión a CD20 para inducir la internalización celular y procedimientos que usan las mismas

5 CAMPO DE LA INVENCION

[0001] La presente invención se refiere a proteínas de unión a CD20 con la capacidad de unirse a y forzar la rápida internalización de antígenos de CD20 desde una ubicación de la superficie celular al interior de la célula en menos de seis horas, como se define en las reivindicaciones. Estas proteínas de unión a CD20 tienen usos como moléculas terapéuticas para el tratamiento de una diversidad de enfermedades, incluyendo el cáncer y los trastornos inmunes.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

[0002] Una inmunotoxina es una molécula quimérica que combina una región de unión a la superficie celular, tal como de un dominio de inmunoglobulina, y una región de toxina típicamente derivada de una toxina de proteína de origen natural, tal como las que se encuentran en bacterias o plantas. La potencia de una inmunotoxina depende en gran medida de su eficiencia en la transición desde la superficie celular al citosol, un procedimiento que comienza con la internalización celular (véase Pirie C et al., J Biol Chem 286: 4165-72 (2011)).

[0003] El CD20 es un miembro de una familia de polipéptidos conocida como la familia 4A (MS4A) que abarca la membrana que incluye al menos 26 proteínas en seres humanos y ratones (Ishibashi K et al., Gene 264: 87-93 (2001)). Al igual que con todos los miembros de MS4A, la secuencia CD20 predice tres regiones hidrófobas que forman una molécula transmembrana que abarca la membrana cuatro veces, una característica estructural que se considera fundamental para su función. También se predice un único ciclo extracelular entre el tercer y cuarto dominios transmembrana propuestos y las regiones intracelulares amino y carboxi-terminales (Tedder T et al., Proc Natl Acad Sci 85: 208-12 (1988)). Es dentro de este ciclo extracelular de aproximadamente 40 aminoácidos que se cree que la mayoría de los anticuerpos monoclonales (mAb) anti-CD20, tal como rituximab, se unen con alanina-170 y prolina-172 como los residuos más críticos. Una estructura cristalina de un anticuerpo que une un fragmento peptídico de CD20 usando los aminoácidos 163-187 de CD20 ha confirmado los aminoácidos 170 (alanina) a través de los aminoácidos 173 (serina) como puntos de interacción antígeno-anticuerpo para rituximab y CD20 (Du J et al. J Biol Chem 282: 15073-80 (2007)).

[0004] Se cree que CD20 está presente en la superficie celular como un homomultímero, probablemente un tetrámero, y la microscopía electrónica ha demostrado que el 90 % de CD20 complejado está presente en la membrana en balsas lipídicas y microvellosidades (Li H et al., J Biol Chem 279: 19893-901 (2004)). Las balsas lipídicas son microdominios encontrados en la membrana plasmática que tienen altas concentraciones de polipéptidos, esfingolípidos y colesterol (Brown D, London E, Annu Rev Cell Dev Biol 14: 111-36 (1998)). Las microvellosidades, o canales microvellosos, son extensiones celulares de la superficie de la membrana plasmática (Reaven E et al., J Lipid Res 30: 1551-60 (1989)). Se sabe que algunos anticuerpos contra CD20 se unen solo cuando la molécula está presente en balsas lipídicas, tal como FMC7 (Polyak M et al., Leukemia 17:1384-89 (2003)) y otros, tal como rituximab, aumentan la asociación de CD20 en balsas (Li H et al, anteriormente). Se presume que la asociación de balsas es importante para la función propuesta de CD20 como un amplificador de señales de calcio que se transducen a través del receptor de antígeno de linfocitos B (BCR), otra proteína comúnmente localizada dentro de las balsas lipídicas y asociada con multímeros de CD20 (Polyak M et al., J Biol Chem 283: 18545-52 (2008)).

[0005] Las terapias basadas en anticuerpos dirigidas a un antígeno CD20 son numerosas (véase Boross P, Leusen J, Am J Cancer Res 2: 676-90 (2012), para revisión). Una de las características atractivas de CD20 como diana para las terapias basadas en un mecanismo en el que el producto terapéutico permanece en la superficie celular para funcionar es la falta de internalización celular de CD20 después de estar unida por el producto terapéutico basado en anticuerpos (Anderson K et al., Blood 63: 1424-33 (1984); Press O et al., Blood 69: 584-91 (1987)). Aunque esto ha demostrado ser específico tanto de tipo celular como de tipo anticuerpo, en general, CD20 parece internalizarse a una tasa mucho más baja que otros antígenos de superficie celular (Beers S et al., Sem Hematol 47: 107-14 (2010)).

[0006] Hay una pregunta en la técnica sobre la utilidad de los antígenos CD20 como diana para terapias que requieren que el producto terapéutico se internalice en una célula diana después de la unión para ser eficaz debido al hallazgo general de que CD20 no se internaliza fácilmente (Anderson K et al., Blood 63: 1424-33 (1984); Press O et al., Blood 69: 584-91 (1987); Beers S et al., Sem Hematol 47: 107-14 (2010)). Por lo tanto, existe un problema no resuelto al dirigir antígenos CD20 con terapias de tipo inmunoglobulina que requieren internalización celular para su eficacia: cómo forzar el producto terapéutico unido a CD20 en el interior de la célula diana después de la unión. Por ejemplo, se predice que las terapias basadas en la administración de una inmunotoxina que se dirige a un antígeno CD20 serán ineficaces basándose en una eficiencia de internalización de CD20 insuficiente. Por lo tanto, existe la necesidad en la técnica de desarrollar composiciones, terapias y procedimientos terapéuticos eficaces que se dirijan a los antígenos de la superficie celular que no se internalicen de forma nativa a una tasa eficiente o tras unirse por un dominio de tipo inmunoglobulina, como CD20. El documento WO 2012/101235 describe un sistema de administración

y conjugados para la administración de compuestos a través de rutas de transporte intracelular de origen natural. El documento WO 2004/058158 describe el tratamiento del cáncer metastásico con la subunidad B de la toxina Shiga.

[0007] En particular, sigue existiendo la necesidad en la técnica de identificar y desarrollar composiciones dirigidas a CD20 que desencadenen una internalización celular rápida y eficiente del complejo de la composición unida a CD20. Por ejemplo, las proteínas de unión a CD20 citotóxicas que comprenden regiones derivadas de toxina que inducen la internalización celular de moléculas CD20 nativas son deseables para el desarrollo de moléculas terapéuticas eficaces contra el cáncer e inmunomoduladoras que se dirigen a las células de los linajes de linfocitos B.

10 RESUMEN DE LA INVENCION

[0008] La presente invención proporciona diversas proteínas de unión a CD20 para inducir la internalización celular de CD20 en menos de seis horas, que comprenden 1) una región de unión a CD20, tal como un dominio de inmunoglobulina, como se define en las reivindicaciones, y 2) una región efectora de toxina Shiga, tal como un truncamiento de SLT-1A, como se define en las reivindicaciones. Tras la unión de un antígeno CD20 en la superficie de una célula, las proteínas de unión a CD20 de la invención son capaces de inducir una internalización celular rápida del complejo que comprende la proteína de unión a CD20 y un antígeno CD20 en el interior de una célula eucariota. La unión de las regiones de unión a CD20 con polipéptidos derivados de la subunidad A de la toxina Shiga permite la genomanipulación de moléculas citotóxicas a base de toxina Shiga que son capaces de inducir una rápida internalización celular de CD20 expresado de forma nativa, así como también pueden suministrar materiales exógenos adicionales en el interior de las células que expresan CD20. Las proteínas de unión a CD20 de la invención tienen usos, por ejemplo, para la destrucción dirigida de tipos de células CD20 positivas, entregando materiales exógenos, como agentes de diagnóstico, y como productos terapéuticos para el tratamiento de una diversidad de afecciones en pacientes tales como cánceres, tumores y trastornos inmunes relacionados con linajes de linfocitos B.

[0009] Una proteína de unión a CD20 de la invención comprende (a) una región de unión a CD20 que comprende una región de unión de tipo inmunoglobulina y es capaz de unirse específicamente a una parte extracelular de CD20, como se define en las reivindicaciones y (b) una región efectora de toxina Shiga que comprende un polipéptido derivado de la secuencia de aminoácidos de la Subunidad A de al menos un miembro de la familia de toxinas Shiga, como se define en las reivindicaciones; por lo que, tras la administración de la proteína de unión a CD20 a una célula que expresa CD20 en una superficie celular, la proteína de unión a CD20 es capaz de inducir la internalización celular en la célula en menos de seis horas.

[0010] Las proteínas de unión a CD20 de la presente invención comprenden una región de unión a CD20 que comprende una región de unión de tipo inmunoglobulina que comprende uno o más de: fragmento de anticuerpo de dominio único, fragmento variable monocatenario, fragmento variable de anticuerpo, fragmento de unión a antígeno, y fragmento Fd, como se define en las reivindicaciones.

[0011] Para determinadas realizaciones, las proteínas de unión a CD20 son capaces de inducir la internalización celular de un CD20 presente de forma nativa en la superficie de una célula en menos de seis horas. En determinadas realizaciones adicionales, las proteínas de unión a CD20 son capaces de inducir, en menos de aproximadamente una hora, la internalización celular de un CD20 presente de forma nativa en la superficie de una célula. En determinadas realizaciones adicionales, las proteínas de unión a CD20 son capaces de inducir, en menos de aproximadamente una hora, la internalización celular de un CD20 presente de forma nativa en la superficie de un miembro de un linaje de linfocitos B.

[0012] Para determinadas realizaciones, tras la administración de la proteína de unión a CD20 a una célula que expresa CD20 en una superficie celular, las proteínas de unión a CD20 son capaces de causar la muerte de la célula. En determinadas realizaciones diferentes, las proteínas de unión a CD20 comprenden regiones efectoras de toxina Shiga que carecen de actividad catalítica y no son capaces de causar la muerte de una célula.

[0013] Para determinadas realizaciones, tras la administración de la proteína de unión a CD20 a una primera población de células cuyos miembros expresan CD20, y una segunda población de células cuyos miembros no expresan CD20, el efecto citotóxico de la proteína de unión a CD20 en los miembros de la primera población de células con respecto a los miembros de la segunda población de células es al menos 3 veces mayor.

[0014] Para determinadas realizaciones, las proteínas de unión a CD20 comprenden la región efectora de la toxina Shiga que comprende o consiste en los aminoácidos 75 a 251 de la SEQ ID NO:1, o SEQ ID NO:25, como se define en las reivindicaciones. Otras realizaciones son proteínas de unión a CD20 en las que la región efectora de toxina Shiga comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada de: aminoácidos 1 a 241 de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 25; aminoácidos 1 a 251 de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 25; o aminoácidos 1 a 261 de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 25, como se define en las reivindicaciones.

[0015] Para determinadas realizaciones, la proteína de unión a CD20 comprende o consiste en el polipéptido mostrado en la SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:12 o SEQ ID NO:14.

[0016] En determinadas realizaciones, las proteínas de unión a CD20 comprenden la región de unión a CD20 que comprende: (a) un dominio variable de cadena pesada que comprende las secuencias de aminoácidos de HCDR1, HCDR2, y HCDR3 como se muestra en la SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, y SEQ ID NO:8, respectivamente, y un dominio variable de cadena ligera que comprende las secuencias de aminoácidos de LCDR1, LCDR2, y LCDR3 como se muestra en la SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, y SEQ ID NO:11, respectivamente; (b) un dominio variable de cadena pesada que comprende las secuencias de aminoácidos de HCDR1, HCDR2, y HCDR3 como se muestra en la SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:22, y SEQ ID NO:23, respectivamente, y un dominio variable de cadena ligera que comprende las secuencias de aminoácidos de LCDR1, LCDR2, y LCDR3 como se muestra en la SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:10, y SEQ ID NO:11, respectivamente; o (c) un dominio variable de cadena pesada (VH) que comprende las secuencias de aminoácidos de HCDR1, HCDR2, y HCDR3 como se muestra en la SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:22, y SEQ ID NO:27, respectivamente, y un dominio variable de cadena ligera (VL) que comprende las secuencias de aminoácidos de LCDR1, LCDR2, y LCDR3 como se muestra en la SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:10, y SEQ ID NO:29, respectivamente. Otras realizaciones son proteínas de unión a CD20 que comprenden la región de unión de tipo inmunoglobulina definida en las reivindicaciones, que comprenden o consisten en la secuencia de aminoácidos 2-245 de la SEQ ID NO:4. Las realizaciones adicionales descritas en esta invención son proteínas de unión a CD20 que comprenden la región de unión de tipo inmunoglobulina que comprende o consiste esencialmente en los aminoácidos 2-245 de la SEQ ID NO:4 y la región efectora de toxina Shiga que comprende o consiste esencialmente en los aminoácidos 75-251 de la SEQ ID NO:1. Realizaciones adicionales son proteínas de unión a CD20 que comprenden o consisten en el polipéptido mostrado en la SEQ ID NO:4, como se define en las reivindicaciones.

[0017] En determinadas realizaciones, las proteínas de unión a CD20 comprenden regiones efectoras de toxina Shiga que comprenden una mutación con respecto a una Subunidad A de origen natural de un miembro de la familia de toxinas Shiga que cambia la actividad enzimática de la región efectora de toxina Shiga, la mutación seleccionada de al menos una delección o sustitución de residuo aminoacídico.

[0018] Determinadas realizaciones de las proteínas de unión a CD20 también se pueden utilizar para el suministro de material exógeno adicional en una célula que expresa CD20 en una superficie celular. Estas realizaciones comprenden una región de unión a CD20 que comprende (a) un polipéptido de tipo inmunoglobulina capaz de unirse específicamente a una parte extracelular de una molécula CD20, como se define en las reivindicaciones; (b) una región efectora de toxina Shiga que comprende un polipéptido derivado de la secuencia de aminoácidos de al menos un miembro de la familia de toxinas Shiga, como se define en las reivindicaciones; y (c) un material exógeno adicional seleccionado del grupo que consiste en: una proteína, ácido nucleico, péptido y agente de diagnóstico; por lo que, tras la administración de la proteína de unión a CD20 a una célula que expresa CD20 en una superficie celular, la proteína de unión a CD20 es capaz de inducir la internalización celular en menos de seis horas y es capaz de suministrar el material exógeno adicional en el interior de la célula. En determinadas realizaciones adicionales, las proteínas de unión a CD20 comprenden la región de unión a CD20 definida en las reivindicaciones, que comprende: (a) un dominio variable de cadena pesada que comprende las secuencias de aminoácidos de HCDR1, HCDR2, y HCDR3 como se muestra en la SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, y SEQ ID NO:8, respectivamente, y un dominio variable de cadena ligera que comprende las secuencias de aminoácidos de LCDR1, LCDR2, y LCDR3 como se muestra en la SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, y SEQ ID NO:11, respectivamente; o (b) un dominio variable de cadena pesada que comprende las secuencias de aminoácidos de HCDR1, HCDR2, y HCDR3 como se muestra en la SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:22, y SEQ ID NO:23, respectivamente, y un dominio variable de cadena ligera que comprende las secuencias de aminoácidos de LCDR1, LCDR2, y LCDR3 como se muestra en la SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:10, y SEQ ID NO:11, respectivamente; o (c) un dominio variable de cadena pesada (VH) que comprende las secuencias de aminoácidos de HCDR1, HCDR2, y HCDR3 como se muestra en la SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:22, y SEQ ID NO:27, respectivamente, y un dominio variable de cadena ligera (VL) que comprende las secuencias de aminoácidos de LCDR1, LCDR2, y LCDR3 como se muestra en la SEQ ID NO:28, SEQ ID NO: 10, y SEQ ID NO:29, respectivamente.

[0019] En determinadas realizaciones, el material exógeno adicional se selecciona del grupo que consiste en: (i) una proteína que comprende un antígeno o enzima; (ii) un ácido nucleico que comprende un ácido ribonucleico, por ejemplo, que funciona como un ARN inhibidor pequeño (siARN) o microARN (miARN); y (iii) un péptido que comprende un antígeno, como se define en las reivindicaciones.

[0020] En determinadas realizaciones, el material exógeno adicional es un péptido y el péptido es un antígeno. En determinadas realizaciones, el material exógeno adicional es un antígeno derivado de una proteína bacteriana. En determinadas realizaciones diferentes, el antígeno deriva de una proteína mutada en cáncer. Realizaciones adicionales son aquellas en las que el antígeno se deriva de una proteína expresada de forma aberrante en cáncer. Otras realizaciones adicionales son aquellas en las que el antígeno se deriva de una región determinante de complementariedad de linfocitos T.

[0021] Para determinadas realizaciones, el antígeno se incluye dentro de la proteína de unión a CD20 como parte de una fusión de polipéptidos en la que el antígeno peptídico se sitúa entre la región de unión y la región efectora de toxinas de una proteína monocatenaria. En determinadas realizaciones, el material exógeno adicional es un

antígeno derivado de una proteína viral. En determinadas realizaciones de la descripción, el antígeno comprende o consiste esencialmente en la SEQ ID NO:3, el antígeno de influenza Matrix 58-66. En determinadas realizaciones adicionales, la proteína de unión a CD20 de la descripción comprende o consiste esencialmente en la SEQ ID NO:16.

5 **[0022]** La invención también incluye composiciones farmacéuticas que comprenden una proteína de unión a CD20 de la presente invención y al menos un excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable; y el uso de tal proteína de unión a CD20 o una composición que la comprende en procedimientos de la invención como se describe adicionalmente en esta invención y como se define en las reivindicaciones.

10 **[0023]** La presente invención también proporciona un ácido nucleico que codifica las proteínas de unión a CD20 de la invención, vectores de expresión que comprenden el ácido nucleico de la invención, así como células huésped que comprenden los vectores de expresión de la invención, como se define en las reivindicaciones.

15 **[0024]** Adicionalmente, la presente invención proporciona un procedimiento *in vitro* para inducir la internalización celular de una proteína de unión a CD20 de la presente invención en una o más células que expresan CD20 en menos de seis horas, comprendiendo el procedimiento la etapa de poner en contacto la una o más células con una proteína de unión a CD20 de la presente invención. De manera similar, la presente descripción proporciona un procedimiento para internalizar un CD20 localizado en la superficie celular unido por una proteína de unión a CD20 en un paciente, comprendiendo el procedimiento la etapa de administrarle al paciente una proteína de unión a CD20
20 o composición farmacéutica de la presente invención.

[0025] Adicionalmente, la presente invención proporciona un procedimiento *in vitro* para destruir una o más células que expresan CD20 que comprende poner en contacto la una o más células con una proteína de unión a CD20 de la presente invención.

25 **[0026]** Adicionalmente, la presente invención proporciona un procedimiento *in vitro* para suministrar material exógeno al interior de una o más células que expresan CD20 que comprende poner en contacto la una o más células con una proteína de unión a CD20 de la presente invención, como se define en las reivindicaciones.

30 **[0027]** La presente descripción proporciona además un procedimiento para suministrar material exógeno al interior de una o más células en un paciente, en el que la célula expresa CD20 en su superficie, comprendiendo el procedimiento la etapa de administrar al paciente una proteína de unión a CD20 de la presente invención.

[0028] Adicionalmente, la presente invención proporciona un procedimiento *in vitro* para destruir una célula que
35 expresa CD20 que comprende la etapa de poner en contacto la célula con una proteína de unión a CD20 de la invención.

[0029] Además, la presente invención proporciona el tratamiento de una enfermedad, trastorno o afección en un paciente que lo necesita utilizando una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína de unión a CD20 de la
40 invención o una composición farmacéutica de la invención, como se define en las reivindicaciones. En determinadas realizaciones, la enfermedad, trastorno o afección implica una o más células o uno o más tipos celulares que expresan CD20 en una superficie celular, tal como, por ejemplo, una célula cancerosa, una célula tumoral o una célula inmune. Una realización adicional es una enfermedad que implica una célula cancerosa o tumoral asociada con la enfermedad seleccionada del grupo que consiste en: cáncer óseo, leucemia, linfoma, melanoma o mieloma. En determinadas
45 realizaciones, el trastorno es un trastorno inmunitario asociado con una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en: amiloidosis, espondilitis anquilosante, asma, enfermedad de Crohn, diabetes, rechazo de injerto, enfermedad de injerto contra huésped, tiroiditis de Hashimoto, síndrome urémico hemolítico, enfermedad relacionada con VIH, lupus eritematoso, esclerosis múltiple, poliarteritis, psoriasis, artritis psoriásica, artritis reumatoide, esclerodermia, choque séptico, síndrome de Sjogren, colitis ulcerosa y vasculitis.

50 **[0030]** Entre determinadas realizaciones de la presente invención se encuentra una proteína de unión a CD20 o una composición farmacéutica que comprende dicha proteína para su uso en el tratamiento o prevención de un cáncer, tumor o trastorno inmunitario.

55 **[0031]** Estas y otras características, aspectos y ventajas de la presente invención se comprenderán mejor con respecto a la siguiente descripción, a las reivindicaciones adjuntas, y a las figuras adjuntas. Los elementos mencionados anteriormente de la invención pueden combinarse o eliminarse libremente para realizar otras realizaciones de la invención dentro del alcance de las reivindicaciones, sin ninguna declaración que objete dicha combinación o eliminación en lo sucesivo en esta invención.

60
BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

[0032]

65 La **figura 1**: muestra la arquitectura general de proteínas de unión a CD20 ejemplares de la presente invención.

La **figura 2:** muestra gráficamente el cambio en la luminiscencia corporal total con la administración de α CD20scFv::SLT-1A versión 1 y α CD20scFv::SLT-1A versión 2 en un modelo de xenoinjerto Raji-luc diseminado.

La **figura 3:** muestra gráficamente el aumento de la supervivencia de ratones del modelo de xenoinjerto Raji-luc con la administración de α CD20scFv::SLT-1A versión 1 y α CD20scFv::SLT-1A versión 2.

5 La **figura 4:** muestra gráficamente el cambio en el volumen tumoral con la administración de α CD20scFv::SLT-1A versión 1 y α CD20scFv::SLT-1A versión 2 en un modelo de xenoinjerto subcutáneo Raji.

La **figura 5:** muestra el agotamiento de linfocitos B en un estudio de primates no humanos con la administración de α CD20scFv::SLT-1A versión 1. Específicamente, se analizaron los subconjuntos de linfocitos B CD20+ que expresaron CD21.

10 La **figura 6:** muestra el agotamiento de linfocitos B en un estudio de primates no humanos con la administración de α CD20scFv::SLT-1A versión 1. Específicamente, se analizaron los subconjuntos de linfocitos B CD20+ que no expresaron CD21.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

15

[0033] La presente invención se describe más completamente en lo sucesivo en esta invención usando realizaciones ilustrativas y no limitativas, y referencias a las figuras adjuntas. Sin embargo, esta invención puede incorporarse de muchas formas diferentes dentro del alcance de la invención y no debe interpretarse como limitada a las realizaciones expuestas a continuación. Por el contrario, estas realizaciones se proporcionan de modo que esta descripción sea exhaustiva y transmita el alcance de la invención a los expertos en la técnica.

20

[0034] Para que la presente invención pueda entenderse más fácilmente, determinados términos se definen a continuación. Se pueden encontrar definiciones adicionales dentro de la descripción detallada de la invención.

25 **[0035]**

Como se usa en la memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas, los términos "un", "una" y "el/la" incluyen las referencias tanto en singular como en plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

[0036] Como se usa en la memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas, el término "y/o" cuando se refiere a dos especies, A y B, significa al menos uno de A y B. Como se usa en la memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas, el término "y/o" cuando se refiere a más de dos especies, tales como A, B y C, significa al menos uno de A, B o C, o al menos una de cualquier combinación de A, B o C (con cada especie en posibilidad singular o múltiple).

30

[0037] A lo largo de esta memoria descriptiva, se entenderá que la palabra "comprender" o variaciones tales como "comprende" o "que comprende", implican la inclusión de un integrante indicado (o componentes) o grupo de integrantes (o componentes), pero no la exclusión de cualquier otro número integrante (o componentes) o grupo de integrantes (o componentes).

35

[0038] A lo largo de toda esta memoria descriptiva, el término "incluyendo" se usa para referirse a "incluido, pero sin limitación". "Incluyendo" e "incluyendo, pero sin limitación" se utilizan indistintamente.

40

[0039] El término "residuo aminoacídico" o "aminoácido" incluye la referencia a un aminoácido que se incorpora en una proteína, polipéptido o péptido. El término "polipéptido" incluye cualquier polímero de aminoácidos o residuos aminoacídicos. El término "secuencia de polipéptidos" se refiere a una serie de aminoácidos o residuos aminoacídicos a partir de los cuales se compone físicamente un polipéptido. Una "proteína" es una macromolécula que comprende una o más cadenas de polipéptidos. Un "péptido" es un polipéptido pequeño de tamaño inferior a un total de 15-20 residuos de aminoácidos.

45

[0040] Los términos "aminoácido", "residuo aminoacídico" o secuencia de polipéptidos incluyen aminoácidos de origen natural y, a menos que se limite de otro modo, también incluyen análogos conocidos de aminoácidos naturales que pueden funcionar de manera similar a los aminoácidos de origen natural. Los aminoácidos a los que se hace referencia en esta invención se describen mediante designaciones abreviadas como se indica a continuación en la Tabla A:

50

TABLA A. Nomenclatura de aminoácidos

Nombre	3 letras	1 letra
Alanina	Ala	A
Arginina	Arg	R
Asparagina	Asn	N
Ácido aspártico o aspartato	Asp	D
Cisteína	Cys	C
Ácido glutámico o glutamato	Glu	E

(continuación)

Nombre	3 letras	1 letra
Glutamina	Gln	Q
Glicina	Gly	G
Histidina	His	H
Isoleucina	Ile	I
Leucina	Leu	L
Lisina	Lys	K
Metionina	Met	M
Fenilalanina	Phe	F
Prolina	Pro	P
Serina	Ser	S
Treonina	Thr	T
Triptófano	Trp	W
Tirosina	Tyr	Y
Valina	Val	V

[0041] La frase "sustitución conservadora" con respecto a un polipéptido, se refiere a un cambio en la composición de aminoácidos del polipéptido que no altera sustancialmente la función y la estructura del polipéptido global (véase Creighton, *Proteins: Structures and Molecular Properties* (W. H. Freeman and Company, Nueva York (2ª ed., 1992)).

[0042] Como se usa en esta invención, el término "expresado", "que expresa" o "expresa" se refiere a la traducción de un polinucleótido o ácido nucleico en un polipéptido o proteína. El polipéptido o proteínas que se expresan pueden permanecer intracelulares, convertirse en un componente de la membrana de la superficie celular, o secretarse en un espacio extracelular.

[0043] Como se usa en esta invención, el símbolo "α" es la abreviatura de una región de unión de tipo inmunoglobulina capaz de unirse a la biomolécula que sigue al símbolo. El símbolo "α" se utiliza para referirse a la característica funcional de una región de unión de tipo inmunoglobulina en función de su capacidad de unión a la biomolécula que sigue al símbolo.

[0044] El término "citotoxicidad selectiva" con respecto a la actividad citotóxica de una proteína de unión a CD20 se refiere a los niveles relativos de citotoxicidad entre una población celular diana y una población celular espectadora no diana, que puede expresarse como una relación de la concentración citotóxica semimáxima (CD₅₀) para un tipo de célula diana sobre la CD₅₀ para un tipo de célula no diana para mostrar la preferencia de la destrucción celular del tipo de célula diana.

[0045] Para los fines de la presente invención, el término "efector" significa proporcionar una actividad biológica, tal como citotoxicidad, señalización biológica, catálisis enzimática, enrutamiento subcelular y/o unión intermolecular que da como resultado el reclutamiento de factores y/o efectos alostéricos.

[0046] Para los fines de la presente invención, la frase "derivado/a de" significa que la región polipeptídica comprende secuencias de aminoácidos que se encuentran originalmente en una proteína y ahora puede comprender adiciones, deleciones, truncamientos u otras alteraciones que forman la secuencia original de modo que la función general y la estructura están sustancialmente conservadas.

Introducción

[0047] La presente invención definida en las reivindicaciones resuelve problemas para genomanipular productos terapéuticos dirigidos a CD20 que requieren internalización celular para funcionar porque las regiones efectoras derivadas de la subunidad A de la toxina Shiga inducen la internalización celular de CD20. La presente invención proporciona proteínas de unión a CD20, como se define en las reivindicaciones, que se unen a antígenos CD20 extracelulares e internalizan rápidamente CD20 desde una ubicación de membrana celular al interior de una

célula en menos de seis horas. Algunas de las proteínas de unión a CD20 descritas destruyen las células que expresan CD20 en su superficie. Algunas de las proteínas de unión a CD20 descritas son capaces de suministrar con precisión material exógeno adicional en forma de cargas moleculares al interior de las células que expresan CD20 en su superficie. La presente invención expande el universo de las dianas con potencial terapéutico de inmunotoxinas para incluir CD20, y permite el suministro precisa de cargas útiles al interior de las células que expresan CD20.

I. La estructura general de las proteínas de unión a CD20 de la invención

[0048] La presente invención proporciona diversas proteínas de unión a CD20 para la destrucción selectiva de tipos de células específicas, comprendiendo cada proteína de unión a CD20 1) una región de unión a CD20 que comprende regiones de unión de tipo inmunoglobulina para el direccionamiento celular, como se define en las reivindicaciones; y 2) una región efectora de toxina Shiga para la destrucción celular, como se define en las reivindicaciones. La unión de las regiones de unión de tipo inmunoglobulina dirigidas a CD20 con las regiones derivadas de la subunidad A de la toxina Shiga permite la genomanipulación del direccionamiento específico del tipo celular de la potente citotoxicidad de la toxina Shiga. Este sistema es modular, ya que diversas regiones efectoras de toxina Shiga y materiales exógenos adicionales pueden unirse a la misma región de unión a CD20 para proporcionar diversas aplicaciones que involucran células que expresan CD20. Las proteínas de unión a CD20 de la invención comprenden regiones efectoras de toxina Shiga como se define en las reivindicaciones que se derivan de las Subunidades A de miembros de la familia de toxinas Shiga unidas a regiones de unión a CD20 de tipo inmunoglobulina que pueden unirse específicamente al menos a una parte extracelular de una molécula CD20 que abarca la membrana celular externa de una célula eucariota, como se define en las reivindicaciones. Esta estructura general es modular en el sentido de que diversas regiones de unión a CD20 se pueden unir a regiones efectoras derivadas de la subunidad A de la toxina Shiga en diversas posiciones o con diferentes enlazadores entre ellas para producir variaciones de la misma estructura general (véase, por ejemplo, la figura 1).

A. Regiones de unión a CD20 que comprenden una región de unión de tipo inmunoglobulina

[0049] Para los fines de la presente invención, el término "región de unión a CD20" se refiere a una región de polipéptidos capaz de unirse específicamente a una parte extracelular de una molécula CD20. Si bien el nombre CD20 podría referirse a múltiples proteínas con estructuras relacionadas y secuencias de polipéptidos de diversas especies, para los fines de la presente invención, el término "CD20" se refiere a las proteínas CD20 de antígeno de linfocitos B presentes en mamíferos cuya secuencia exacta puede variar ligeramente en la isoforma y de individuo a individuo. Por ejemplo, en seres humanos, CD20 se refiere a la proteína representada por la secuencia de polipéptidos predominante UnitProt P11836 y la entrada del NCBI NP 690605.1; sin embargo, pueden existir diferentes isoformas y variantes. La secuencia de polipéptidos de diversas proteínas CD20 se ha descrito en diversas especies, tales como murciélagos, gatos, vacas, perros, ratones, tities y ratas, y se puede predecir mediante bioinformática en muchas otras especies en función de la homología genética (por ejemplo, se ha predicho CD20 en diversos primates, incluyendo babuinos, macacos, gibones, chimpancés y gorilas) (véase Zuccolo J et al., PLoS One 5: e9369 (2010) y la base de datos de proteínas del NCBI (Centro Nacional de Información Biotecnológica (*National Center for Biotechnology Information*), EE.UU.). Un experto podrá identificar una proteína CD20 en mamíferos, incluso si difiere ligeramente de las secuencias de referencia.

[0050] Una parte extracelular de una molécula CD20 se refiere a una porción de su estructura expuesta al entorno extracelular cuando la molécula CD20 está presente de forma nativa en una membrana celular. En este contexto, expuesto al entorno extracelular significa que parte de la molécula CD20 es accesible, por ejemplo, mediante un anticuerpo o al menos un resto de unión más pequeño que un anticuerpo, tal como un dominio de anticuerpo de dominio único, un nanobody®, un dominio de anticuerpos de cadena pesada derivado de camélidos o peces cartilaginosos, un fragmento variable monocatenario, o cualquier número de andamiajes alternativos genomanipulados para inmunoglobulinas (véase más abajo). La exposición de una parte de CD20 puede ser determinada empíricamente por un experto en la técnica utilizando procedimientos conocidos en la técnica. Cabe apreciar que alguna porción de CD20, que se predijo que no sería accesible a un anticuerpo en el espacio extracelular en función de su ubicación dentro de CD20, se mostró empíricamente accesible por un anticuerpo monoclonal (Teeling J et al., J. Immunol. 177: 362-71 (2006)).

[0051] Las regiones de unión a CD20 se derivan comúnmente de anticuerpos o estructuras de tipo anticuerpo; sin embargo, se contemplan andamiajes alternativos de otras fuentes dentro del alcance del término. En determinadas realizaciones de la descripción, la región de unión a CD20 se deriva de una región de unión derivada de inmunoglobulina, tal como un parátipo de anticuerpo. En determinadas realizaciones diferentes de la descripción, la región de unión a CD20 comprende una región de unión de tipo inmunoglobulina que es un polipéptido genomanipulado no derivado de ningún dominio de inmunoglobulina. Existen numerosas regiones de unión derivadas de inmunoglobulina contempladas como componentes en la presente invención, como se define en las reivindicaciones.

[0052] Las proteínas de unión a CD20 de la invención comprenden una región de unión de tipo inmunoglobulina capaz de unirse específicamente a una parte extracelular de CD20, como se define en las reivindicaciones. El término

"región de unión de tipo inmunoglobulina", como se usa en esta invención, se refiere a una región de polipéptidos capaz de unirse a una o más biomoléculas diana, tal como un antígeno o epítipo. Las regiones de unión de tipo inmunoglobulina se definen funcionalmente por su capacidad para unirse a moléculas diana, y todas las regiones de unión de tipo inmunoglobulina de la presente invención son capaces de unirse a CD20. Las regiones de unión de tipo inmunoglobulina se derivan comúnmente de anticuerpos o estructuras de tipo anticuerpo; sin embargo, se contemplan andamiajes alternativos de otras fuentes dentro de la presente descripción.

[0053] Las proteínas de inmunoglobulina (Ig) tienen un dominio estructural conocido como dominio de Ig. Los dominios de Ig varían en longitud de aproximadamente 70-110 residuos aminoacídicos y poseen un pliegue de Ig característico, en el que típicamente de 7 a 9 cadenas beta antiparalelas se disponen en dos láminas beta que forman una estructura tipo sándwich. El pliegue de Ig se estabiliza mediante interacciones de aminoácidos hidrófobos en las superficies internas de los enlaces sándwich y de disulfuro altamente conservados entre los residuos de cisteína en las cadenas. Los dominios de Ig pueden ser variables (IgV o conjunto V), constantes (IgC o conjunto C) o intermedios (Igl o conjunto I). Algunos dominios de Ig pueden estar asociados con una región determinante de complementariedad (CDR), también conocida como región de unión a antígeno (ABR), que es importante para la especificidad de los anticuerpos que se unen a sus epítopos. Los dominios de tipo Ig también se encuentran en proteínas no inmunoglobulínicas y se clasifican sobre esa base como miembros de la superfamilia de proteínas Ig. El HUGO Gene Nomenclature Committee (HGNC) proporciona una lista de miembros de la familia que contiene el dominio de tipo Ig.

[0054] Una región de unión de tipo inmunoglobulina puede ser una secuencia de polipéptidos de un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo en la que la secuencia aminoacídica ha variado con respecto a la de un anticuerpo nativo o un dominio de tipo Ig de una proteína no inmunoglobulínica, por ejemplo, por ingeniería molecular o selección por cribado de bibliotecas. Debido a la relevancia de las técnicas de ADN recombinante y el cribado de bibliotecas *in vitro* en la generación de regiones de unión de tipo inmunoglobulina, los anticuerpos se pueden rediseñar para obtener las características deseadas, tal como un menor tamaño, entrada celular, u otras mejoras terapéuticas. Las posibles variaciones son muchas y pueden variar desde el cambio de un solo aminoácido hasta el rediseño completo de, por ejemplo, una región variable. Típicamente, se realizarán cambios en la región variable para mejorar las características de unión a antígeno, mejorar la estabilidad de la región variable, o reducir el potencial de las respuestas inmunogénicas.

[0055] Existen numerosas regiones de unión de tipo inmunoglobulina que se unen a una parte extracelular de CD20 contemplada en la presente invención, como se define en las reivindicaciones. En determinadas realizaciones, la región de unión de tipo inmunoglobulina se deriva de una región de unión de inmunoglobulina, capaz de unirse a una parte extracelular de CD20, como se define en las reivindicaciones. En determinadas realizaciones diferentes de la descripción, la región de unión de tipo inmunoglobulina comprende un polipéptido genomanipulado que no deriva de ningún dominio de inmunoglobulina pero que funciona como una región de unión de inmunoglobulina proporcionando una unión de alta afinidad a una parte extracelular de CD20. Este polipéptido genomanipulado puede incluir opcionalmente andamiajes de polipéptidos que comprenden o consisten esencialmente en regiones determinantes de complementariedad de inmunoglobulinas como se describe en esta invención.

[0056] Existen numerosas regiones de unión derivadas de inmunoglobulina y polipéptidos genomanipulados no inmunoglobulínicos en la técnica anterior que son útiles para dirigir las proteínas de unión a CD20 de la invención a células que expresan CD20. La región de unión de tipo inmunoglobulina de las presentes proteínas de unión a CD20 se selecciona del grupo que incluye: fragmento de anticuerpo de dominio único, fragmentos variables monocatenarios (scFv), fragmento variable de anticuerpo, fragmento de unión a antígeno, y fragmentos Fd que consisten en los dominios de cadena pesada y C_H1 (véase Weiner L, Cell 148: 1081-4 (2012); Ahmad Z et al., Clin Dev Immunol 2012: 980250 (2012), para revisiones).

[0057] Según determinadas realizaciones diferentes de la descripción, la región de unión de tipo inmunoglobulina de las proteínas de unión a CD20 descritas en esta invención puede incluir andamiajes alternativos genomanipulados para dominios de inmunoglobulina que exhiben características funcionales similares, tal como unión de alta afinidad y específica a CD20, y permite la genomanipulación de características mejoradas, tal como una mayor estabilidad o inmunogenicidad reducida. Para determinadas realizaciones de las proteínas de unión a CD20 descritas en esta invención, la región de unión de tipo inmunoglobulina se selecciona del grupo que incluye el 10^o dominio de fibronectina tipo III (10Fn3) genomanipulado y derivado de fibronectina (monocuerpos, AdNectins™ o AdNexins™); dominio de tenacsina tipo III genomanipulado y derivado de tenacsina (Centryns™); polipéptido que contiene un motivo de repetición de anquirina genomanipulado (DARPin™); dominio A genomanipulado, derivado del receptor de lipoproteína de baja densidad (LDLR-A) (Avimers™); lipocalina (anticalinas); dominio Kunitz genomanipulado derivado de inhibidores de proteasa; dominio Z genomanipulado derivado de proteína A (Affibodies™); andamiaje genomanipulado derivado de cristalina gamma B, o andamiaje genomanipulado derivado de ubiquitina (Afilinas); polipéptidos derivados de Sac7d (Nanoffitins® o afitinas); dominio SH2 genomanipulado derivado de Fyn (Fynomers®); y la imitación de anticuerpos genomanipulados y cualquier equivalente genéticamente manipulada de los anteriores que conserva su funcionalidad de unión (Wörn A, Plückthun A, J Mol Biol 305: 989-1010 (2001); Xu L et al., Chem Biol 9: 933-42 (2002); Wikman M et al., Protein Eng Des Sel 17: 455-62 (2004); Binz H et al., Nat Biotechnol 23: 1257-68 (2005); Holliger P, Hudson P, Nat Biotechnol 23: 1126-36 (2005); Gill D, Damle N, Curr Opin Biotech 17:

653-8 (2006); Koide A, Koide S, *Methods Mol Biol* 352: 95-109 (2007)).

[0058] Los ejemplos no limitantes de construcciones de proteínas incluidas dentro del término "región de unión" como se usa en esta invención incluyen: (i) un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consiste en los dominios VL, VH, CL y CH1; (ii) un fragmento F(ab')₂, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos por un puente disulfuro en la región bisagra; (iii) un fragmento Fd que consiste en los dominios VH y CH1; (iv) un fragmento Fv que consiste en los dominios VL y VH de un solo brazo de un anticuerpo, (v) un fragmento dAb, que consiste en un dominio VH; y (vi) una CDR aislada. Además, aunque los dos dominios del fragmento Fv, VL y VH, están codificados por genes separados, se pueden unir de manera recombinante mediante un enlazador sintético, creando una sola cadena de proteínas en la que los dominios VL y VH se emparejan para formar moléculas monovalentes (conocido como Fv monocatenario (scFv)). El enlazador usado más comúnmente es un péptido 3 de 15 residuos (Gly4Ser), pero también se conocen otros enlazadores en la técnica. Los anticuerpos monocatenarios también están destinados a incluirse dentro del término "región de unión" como se usa en esta invención.

[0059] También se anticipa que los andamiajes alternativos que proporcionan la función de unión están dentro del alcance del término "región de unión" como se usa en esta invención. Algunos ejemplos de los andamiajes alternativos incluyen diacuerpos, un péptido CDR3, un péptido FR3-CDR3-FR4 restringido, un nanobody® (publicación de solicitud de patente de EE.UU. 2008/0107601), un nanobody® bivalente, productos inmunofarmacéuticos pequeños modulares (SMIP™), un dominio de IgNAR variable de tiburón (documento WO 03/014161), un minicuerpo y cualquier fragmento o equivalentes química o genéticamente manipuladas que conserven la función de unión a la molécula diana.

[0060] Una "secuencia derivada de anticuerpo" como se usa en esta invención, significa una secuencia de aminoácidos de un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo en la que la secuencia aminoacídica se ha variado de la de un anticuerpo nativo. Debido a la relevancia de las técnicas de ADN recombinante en la generación de anticuerpos, los anticuerpos se pueden rediseñar para obtener las características deseadas. Las posibles variaciones son muchas y van desde el cambio de solo uno o unos pocos aminoácidos hasta el rediseño completo de, por ejemplo, una región variable. Típicamente, se realizarán cambios en la región variable para mejorar las características de unión a antígeno, mejorar la estabilidad de la región variable, o reducir el riesgo de inmunogenicidad.

[0061] Como se usa en esta invención, el término "dominio variable de cadena pesada (VH)" o "dominio variable de cadena ligera (VL)" se refieren respectivamente a cualquier dominio VH o VL de anticuerpo nativo (por ejemplo, un dominio VH o VL humano), así como a cualquier derivado de los mismos que conserve al menos la capacidad de unión a antígeno cualitativa del anticuerpo nativo correspondiente (por ejemplo, un dominio VH o VL humanizado derivado de un dominio VH o VL murino nativo). Un dominio VH o VL consiste en una región "marco" interrumpida por los tres CDR. Las regiones marco sirven para alinear las CDR para la unión específica a un epítopo de un antígeno. Desde el extremo amino-terminal al extremo carboxilo-terminal, ambos dominios VH y VL comprenden las siguientes regiones marco (FR) y CDR: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. La asignación de aminoácidos a cada dominio es según las definiciones de Kabat, *Sequences of Proteins of Immunological Interest* (5ª ed., National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991), o Chothia y Lesk, *J. Mol. Biol.* 196: 901-17 (1987); Chothia et al., *Nature* 342:878-83, (1989). Las CDR 1, 2 y 3 de un dominio VH también se denominan en esta invención, respectivamente, como HCDR1, HCDR2 y HCDR3; las CDR 1, 2 y 3 de un dominio VL también se denominan en esta invención, respectivamente, como LCDR1, LCDR2 y LCDR3.

[0062] En algunas realizaciones de las proteínas de unión a CD20 de la presente invención, la región de unión comprende un conjunto específico de regiones determinantes de complementariedad, o CDR. Las CDR son regiones de secuencia definidas dentro de los dominios variables de anticuerpos que son necesarias para la unión específica del anticuerpo a sus determinantes antigénicos. En una realización de la invención, el conjunto de CDR comprende tres CDR derivadas de la cadena pesada del anticuerpo y tres CDR derivadas de la cadena ligera del anticuerpo. En algunas realizaciones, las tres CDR de cadena pesada comprenden: (a) un dominio variable de cadena pesada que comprende las secuencias de aminoácidos de HCDR1, HCDR2, y HCDR3 como se muestra en la SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, y SEQ ID NO:8, respectivamente, y un dominio variable de cadena ligera que comprende las secuencias de aminoácidos de LCDR1, LCDR2, y LCDR3 como se muestra en la SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, y SEQ ID NO:11, respectivamente; (b) un dominio variable de cadena pesada que comprende las secuencias de aminoácidos de HCDR1, HCDR2, y HCDR3 como se muestra en la SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:22, y SEQ ID NO:23, respectivamente, y un dominio variable de cadena ligera que comprende las secuencias de aminoácidos de LCDR1, LCDR2, y LCDR3 como se muestra en la SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:10, y SEQ ID NO:11, respectivamente; o (c) un dominio variable de cadena pesada (VH) que comprende las secuencias de aminoácidos de HCDR1, HCDR2, y HCDR3 como se muestra en la SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:22, y SEQ ID NO:27, respectivamente, y un dominio variable de cadena ligera (VL) que comprende las secuencias de aminoácidos de LCDR1, LCDR2, y LCDR3 como se muestra en la SEQ ID NO:28, SEQ ID NO: 10, y SEQ ID NO:29, respectivamente. Adicionalmente, en determinadas realizaciones de la invención, la región de unión comprende o consiste en los aminoácidos 2 a 245 de la SEQ ID NO:4.

[0063] Este sistema es modular, ya que se pueden usar diversas regiones de unión de tipo inmunoglobulina diversas con la misma región efectora de toxina Shiga para dirigirse a diferentes epítopos extracelulares de CD20. El

experto en la técnica apreciará que puede usarse cualquier región de unión a CD20 de un tipo de inmunoglobulina capaz de unirse a una parte extracelular de CD20 para diseñar o seleccionar una región de unión de tipo inmunoglobulina para unirse a la región efectora de toxina Shiga para producir una proteína de unión a CD20 de la invención.

5

B. Regiones efectoras de toxina Shiga derivadas de subunidades A de miembros de la familia de toxinas Shiga

[0064] Para los fines de la presente invención, la frase "región efectora de toxina Shiga" se refiere a una región de polipéptidos derivada de una subunidad A de toxina Shiga de un miembro de la familia de toxinas Shiga que es capaz de inactivar ribosomas y efectuar citotoxicidad y/o efectos citostáticos. Un miembro de la familia de toxinas Shiga se refiere a cualquier miembro de una familia de toxinas proteicas de origen natural que están relacionadas estructural y funcionalmente, en particular las toxinas aisladas de *S. dysenteriae* y *E. coli* (Johannes, Nat Rev Microbiol 8: 105-16 (2010)). Por ejemplo, la familia de toxinas Shiga abarca la verdadera toxina Shiga (Stx) aislada de serotipo 1 de *S. dysenteriae*, variantes de toxina 1 tipo Shiga (SLT1 o Stx1 o SLT-1 o Slt-1) aisladas de serotipos de *E. coli* enterohemorrágica, y variantes de toxina 2 tipo Shiga (SLT2 o Stx2 o SLT-2) aisladas de serotipos de *E. coli* enterohemorrágica. SLT1 difiere en un solo residuo de Stx, y ambos se han denominado Verocitotoxinas o Verotoxinas (VT) (O'Brien, Curr Top Microbiol Immunol 180: 65-94 (1992)). Aunque las variantes SLT1 y SLT2 son solo aproximadamente un 53-60 % similares entre sí en el nivel de secuencia aminoacídica, comparten mecanismos de actividad enzimática y citotoxicidad comunes a los miembros de la familia de toxinas Shiga (Johannes, Nat Rev Microbiol 8: 105-16 (2010)). Se han descrito más de 39 toxinas Shiga diferentes, tales como los subtipos definidos Stx1a, Stx1c, Stx1d y Stx2a-g (Scheutz F et al., J Clin Microbiol 50: 2951-63 (2012)). Los miembros de la familia de toxinas Shiga no están restringidos naturalmente a ninguna especie bacteriana porque los genes que codifican la toxina Shiga pueden propagarse entre las especies bacterianas a través de la transferencia génica horizontal (Strauch E et al., Infect Immun 69: 7588-95 (2001); Zhaxybayeva O, Doolittle W, Curr Biol. 21: R242-6 (2011)). Como ejemplo de transferencia entre especies, se descubrió una toxina Shiga en una cepa de *A. haemolyticus* aislada de un paciente (Grotiuz G et al., J Clin Microbiol 44: 3838-41 (2006)). Una vez que un polinucleótido que codifica la toxina Shiga entra en una nueva subespecie o especie, se presume que la secuencia aminoacídica de la toxina Shiga es capaz de desarrollar ligeras variaciones de secuencia debido a la deriva genética y/o la presión selectiva mientras aún se mantiene un mecanismo de citotoxicidad común para los miembros de la familia de toxinas Shiga (véase Scheutz, J Clin Microbiol 50: 2951-63 (2012)).

[0065] Las regiones efectoras de toxina Shiga de la invención pueden comprender o consistir esencialmente en un polipéptido derivado de una subunidad A de la toxina Shiga disociada de cualquier forma de su subunidad B de la toxina Shiga nativa. Además, las proteínas de unión a CD20 de la presente invención pueden no comprender ningún polipéptido que comprenda o consista esencialmente en un dominio de unión funcional de una subunidad B de la toxina Shiga. Más bien, las regiones derivadas de la subunidad A de la toxina Shiga están funcionalmente asociadas con regiones de unión a CD20 heterólogas para realizar el direccionamiento celular a las células que expresan CD20.

[0066] En determinadas realizaciones, una región efectora de toxina Shiga de la invención como se define en las reivindicaciones puede comprender o consistir en una subunidad A de la toxina Shiga de longitud completa SLT-1A (SEQ ID NO:1), o StxA (SEQ ID NO:25), apreciando que las Subunidades A de la toxina Shiga de origen natural pueden comprender formas precursoras que contienen secuencias señal de aproximadamente 22 aminoácidos en sus extremos amino-terminales que se eliminan para producir Subunidades A de la toxina Shiga maduras. Un ejemplo específico de una "región efectora de toxina" es una que se deriva de la cadena A de la toxina 1 tipo Shiga (SLT-1) (SEQ ID NO:1). La cadena A de SLT-1 está compuesta por 293 aminoácidos abarcando el dominio enzimático (tóxico) los residuos 1 a 239. En otras realizaciones, la región efectora de toxina Shiga de la invención como se define en las reivindicaciones comprende o consiste esencialmente en una Subunidad A de la toxina Shiga truncada que es más corta que una subunidad A de la toxina Shiga completa.

[0067] Los truncamientos de la subunidad A de la toxina 1 tipo Shiga son catalíticamente activos, capaces de inactivar enzimáticamente los ribosomas *in vitro*, y citotóxicos cuando se expresan dentro de una célula (LaPointe, J Biol Chem 280: 23310-18 (2005)). El fragmento de la subunidad A de toxina Shiga más pequeño que exhibe actividad enzimática completa es un polipéptido compuesto por los residuos 1-239 de Slt1A (LaPointe, J Biol Chem 280: 23310-18 (2005)). Aunque se informó que el fragmento más pequeño de la subunidad A de la toxina Shiga que conservaba una actividad catalítica sustancial eran los residuos 75-247 de StxA (Al-Jaufy, Infect Immun 62: 956-60 (1994)), un truncamiento de StxA expresado *de novo* dentro de una célula eucariota requiere que solo hasta el residuo 240 alcance el citosol y ejerza la inactivación catalítica de los ribosomas (LaPointe, J Biol Chem 280: 23310-18 (2005)).

[0068] Las regiones efectoras de toxina Shiga pueden ser comúnmente más pequeñas que la subunidad A de longitud completa. Se prefiere que la región efectora de toxina Shiga mantenga la región de polipéptidos desde la posición de aminoácidos 77 a 239 (SLT-1A (SEQ ID NO:1), StxA (SEQ ID NO:25) o SLT-2A (SEQ ID NO:26)) o el equivalente en otras Subunidades A de miembros de la familia de la toxina Shiga. Por ejemplo, en determinadas realizaciones de la invención, una región efectora de toxina Shiga derivada de SLT-1A puede comprender o consistir en los aminoácidos 75 a 251 de SEQ ID NO:1, 1 a 241 de SEQ ID NO:1, 1 a 251 de SEQ ID NO:1, o aminoácidos 1 a 261 de SEQ ID NO: 1. De manera similar, entre determinadas realizaciones diferentes, las regiones efectoras de toxina

Shiga derivadas de StxA pueden comprender o consistir en los aminoácidos 75 a 251 de SEQ ID NO:25, 1 a 241 de SEQ ID NO:25, 1 a 251 de SEQ ID NO:25, o aminoácidos 1 a 261 de SEQ ID NO:25.

[0069] La invención proporciona además variantes de las proteínas de unión a CD20 de la invención, en las que la región efectora de toxina Shiga difiere de una Subunidad A de la toxina Shiga de origen natural en hasta 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 o más residuos aminoacídicos (pero en no más de lo que conserva al menos el 85 %, 90 %, 95 %, 99 % o más de identidad de secuencia aminoacídica). Por lo tanto, una región de polipéptidos derivada de una Subunidad A de un miembro de la familia de toxinas Shiga puede comprender adiciones, deleciones, truncamientos u otras alteraciones de la secuencia original siempre que se mantenga al menos un 85 %, 90 %, 95 %, 99 % o más identidad de secuencia aminoacídica con una subunidad A de la toxina Shiga de origen natural, como se define en las reivindicaciones.

[0070] Por consiguiente, en determinadas realizaciones, la región efectora de toxina Shiga comprende o consiste en secuencias de aminoácidos que tienen al menos un 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 % o un 99,7 % de identidad de secuencia global con SLT-1A (SEQ ID NO:1) o Stx (SEQ ID NO:25).

[0071] Opcionalmente, una versión completa o truncada de la Subunidad A de la toxina Shiga puede comprender una o más mutaciones (por ejemplo, sustituciones, deleciones, inserciones o inversiones). En determinadas realizaciones que son potentemente citotóxicas, la región efectora de toxina Shiga tiene una identidad de secuencia suficiente para conservar la citotoxicidad después de la entrada en una célula, ya sea por procedimientos bien conocidos de transformación, transfección, infección o inducción de la célula huésped, o por una internalización mediada por la región de unión de tipo inmunoglobulina de direccionamiento celular unida a la región efectora de toxina Shiga. Los residuos más críticos para la actividad enzimática y/o la citotoxicidad en las subunidades A de la toxina Shiga se han mapeado en las siguientes posiciones de residuos: aspargina-75, tirosina-77, glutamato-167, arginina-170 y arginina-176 entre otros (Di, *Toxicon* 57: 535-39 (2011)). En cualquiera de las realizaciones de la presente invención, la región efectora de toxina Shiga puede mantener preferentemente, pero no necesariamente, uno o más aminoácidos conservados en las posiciones, tales como los encontrados en las posiciones 77, 167, 170 y 203 en StxA, SLT-1A, o la posición conservada equivalente en otros miembros de la familia de toxinas Shiga que típicamente se requieren para la actividad citotóxica. La capacidad de una proteína de unión a CD20 de la invención para causar la muerte celular, por ejemplo, su citotoxicidad, puede medirse usando uno o más de varios ensayos ya conocidos en la técnica.

[0072] En determinadas realizaciones de la invención, uno o más residuos aminoacídicos pueden mutarse o eliminarse para reducir o eliminar la actividad citotóxica de la región efectora de toxina Shiga. La citotoxicidad de las Subunidades A de los miembros de la familia de toxinas Shiga puede reducirse o eliminarse por mutación o truncamiento. Se demostró que las posiciones etiquetadas como tirosina-77, glutamato-167, arginina-170, tirosina-114 y triptófano-203 son importantes para la actividad catalítica de Stx, Stx1 y Stx2 (Hovde C et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 2568-72 (1988); Deresiewicz R et al., *Biochemistry* 31: 3272-80 (1992); Deresiewicz R et al., *Mol Gen Genet* 241: 467-73 (1993); Ohmura M et al., *Microb Pathog* 15: 169-76 (1993); Cao C et al., *Microbiol Immunol* 38: 441-7 (1994); Suhan M, Hovde C, *Infect Immun* 66: 5252-9 (1998)). La mutación tanto del glutamato-167 como de la arginina-170 eliminó la actividad enzimática de Slt-I A1 en un ensayo de inactivación de ribosomas sin células (LaPointe, *J Biol Chem* 280: 23310-18 (2005)). En otro enfoque que utiliza la expresión *de novo* de Slt-I A1 en el retículo endoplásmico, la mutación tanto de glutamato-167 como de arginina-170 eliminó la citotoxicidad del fragmento Slt-I A1 a ese nivel de expresión (LaPointe, *J Biol Chem* 280: 23310-18 (2005)). Un análisis de truncamiento demostró que un fragmento de StxA de los residuos 75 a 268 aún conserva una actividad enzimática significativa *in vitro* (Haddad, *J Bacteriol* 175: 4970-8 (1993)). Un fragmento truncado de Slt-I A1 que contiene los residuos 1-239 mostró actividad enzimática significativa *in vitro* y citotoxicidad por expresión *de novo* en el citosol (LaPointe, *J Biol Chem* 280: 23310-18 (2005)). La expresión de un fragmento de Slt-I A1 truncado en los residuos 1-239 en el retículo endoplásmico no era citotóxica porque no pudo retrotranslocarse en el citosol (LaPointe, *J Biol Chem* 280: 23310-18 (2005)).

[0073] Para los fines de la presente invención, el orden u orientación específicos no están fijados para la región efectora de toxina Shiga y la región de unión a CD20 en relación entre sí o con la totalidad del extremo o extremos N-terminales y C-terminales de la proteína de unión a CD20 (véase, por ejemplo, la figura 1). En las proteínas de unión a CD20 anteriores, las regiones de unión a CD20 y las regiones efectoras de toxina Shiga pueden estar directamente unidas entre sí y/o adecuadamente unidas entre sí a través de una o más secuencias de polipéptidos intermedios, tal como con uno o más enlazadores bien conocidos en la técnica.

II. Ejemplos de variaciones estructurales específicas de las proteínas de unión a CD20 de la invención

[0074] Entre determinadas realizaciones de la presente invención, las proteínas de unión a CD20 comprenden la región efectora de toxina Shiga que comprende o consiste en los aminoácidos 75 a 251 de SLT-1A (SEQ ID NO:1) o StxA (SEQ ID NO:25). Otras realizaciones son proteínas de unión a CD20 en las que la región efectora de toxina Shiga comprende o consiste en los aminoácidos 1 a 241 de SLT-1A (SEQ ID NO:1) o StxA (SEQ ID NO:25). Otras realizaciones son proteínas de unión a CD20 en las que la región efectora de toxina Shiga comprende o consiste en los aminoácidos 1 a 251 de SLT-1A (SEQ ID NO:1) o StxA (SEQ ID NO:25). Otras realizaciones son proteínas de

unión a CD20 en las que la región efectora de toxina Shiga comprende o consiste en los aminoácidos 1 a 261 de SLT-1A (SEQ ID NO:1) o StxA (SEQ ID NO:25).

[0075] Para determinadas realizaciones, las proteínas de unión a CD20 de la presente invención son unas que comprenden o consisten en la secuencia aminoacídica de la SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:12 o SEQ ID NO:14.

[0076] Como se usa en esta invención, el término "dominio variable de cadena pesada (V_H)" o "dominio variable de cadena ligera (V_L)" se refieren respectivamente a cualquier dominio V_H o V_L de anticuerpo (por ejemplo, un dominio V_H o V_L humano), así como a cualquier derivado de los mismos que conserve al menos la capacidad de unión a antígeno cualitativa del anticuerpo nativo correspondiente (por ejemplo, un dominio V_H o V_L humanizado derivado de un dominio V_H o V_L murino nativo). Un dominio V_H o V_L consiste en una región "marco" interrumpida por las tres CDR. Las regiones marco sirven para alinear las CDR para la unión específica a un epítipo de un antígeno. Desde el extremo amino-terminal al extremo carboxilo-terminal, ambos dominios V_H y V_L comprenden las siguientes regiones marco (FR) y CDR: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, y FR4. La asignación de aminoácidos a cada dominio es según las definiciones de Kunik V et al., PLoS Comput Biol 8: e1002388 (2012) y Kunik V et al., Nucleic Acids Res 40: W521-4 (2012) o, como alternativa, según las definiciones de Kabat, Sequences of Proteins of Immunological Interest, (5ª ed., National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991); o Chothia y Lesk, J. Mol. Biol. 196: 901-17 (1987); Chothia et al., Nature 342: 878-83 (1989).

[0077] En determinadas realizaciones de la invención, las CDR comprenden tres CDR derivadas de una cadena pesada del anticuerpo y tres CDR derivadas de una cadena ligera del anticuerpo. En determinadas realizaciones, las tres CDR de cadena pesada comprenden SEQ ID NO: 7 (HCDR1), SEQ ID NO:8 (HCDR2), y SEQ ID NO:9 (HCDR3), mientras que las tres CDR de cadena ligera comprenden SEQ ID NO:9 (LCDR1), SEQ ID NO: 10 (LCDR2) y SEQ ID NO:11 (LCDR3). Adicionalmente, en determinadas realizaciones de la invención, la región de unión de tipo inmunoglobulina comprende o consiste en los aminoácidos 2 a 245 de la SEQ ID NO:4.

[0078] Está dentro del alcance de la descripción el uso de fragmentos, variantes y/o derivados de los polipéptidos de las proteínas de unión a CD20 de la invención que contienen un sitio de unión a CD20 funcional a cualquier parte extracelular de CD20, e incluso más preferentemente que es capaz de unirse a CD20 con alta afinidad (por ejemplo, como se muestra por K_D). Por ejemplo, la invención proporciona secuencias de polipéptidos derivados de inmunoglobulina que pueden unirse a CD20. Cualquier polipéptido puede ser sustituido por esta región que se une a una parte extracelular de CD20 con una constante de disociación (K_D) de 10^{-5} a 10^{-12} moles/litro, preferentemente menos de 200 nM.

[0079] Por lo tanto, está dentro del alcance de la invención alterar el sitio de unión de tipo inmunoglobulina de una proteína de unión a CD20 ejemplar descrita siempre que se elija al menos una secuencia de polipéptidos del grupo que consiste en las secuencias CDR1, secuencias CDR2, y secuencias de CDR3 que se describen. En particular, pero sin limitación, las secuencias de polipéptidos de la invención pueden consistir esencialmente en 4 regiones marco (FR1 a FR4) y tres regiones determinantes de complementariedad (CDR1 a CDR3 respectivamente); o cualquier fragmento adecuado de dicha secuencia aminoacídica que exhiba la funcionalidad de unión a la biomolécula diana en función de la presencia de una o más CDR.

[0080] En determinadas realizaciones, la región de unión de tipo inmunoglobulina comprende (i) un dominio variable de cadena pesada (V_H) que comprende las secuencias de aminoácidos de CDR como se muestra en la SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, y SEQ ID NO:8, y (ii) un dominio variable de cadena ligera (V_L) que comprende las secuencias de aminoácidos de CDR como se muestra en la SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, y SEQ ID NO:11. En otras realizaciones, la región de unión de tipo inmunoglobulina comprende o consiste en los aminoácidos 2 a 245 de la SEQ ID NO:4.

[0081] Entre determinadas realizaciones de la presente invención, la región de unión de tipo inmunoglobulina puede derivarse de un nanobody® o región derivada de inmunoglobulina de dominio único V_{HH} que exhibe una unión de alta afinidad específicamente a CD20. Generalmente, los nanocuerpos se construyen a partir de fragmentos de anticuerpos de dominio variable monomérico único (sdAb) de origen natural del tipo que se encuentran en camélidos y peces cartilaginosos (Chondrichthyes). Los nanocuerpos están genomanipulados a partir de estos anticuerpos de origen natural truncando el dominio variable monomérico único para crear una molécula más pequeña y más estable. Debido a su pequeño tamaño, los nanocuerpos pueden unirse a antígenos que no son accesibles a anticuerpos completos.

III. La función general de las proteínas de unión a CD20 de la invención

[0082] La presente invención proporciona diversas proteínas de unión a CD20 para la destrucción selectiva de tipos celulares específicos, comprendiendo las proteínas CD20 1) regiones de unión a CD20 de tipo inmunoglobulina para el direccionamiento celular, como se define en las reivindicaciones; y 2) regiones efectoras de toxina Shiga citotóxicas para inducir la internalización celular, como se define en las reivindicaciones y, opcionalmente, también la destrucción celular. La unión de las regiones de unión de tipo inmunoglobulina dirigidas a CD20 con regiones derivadas de la subunidad A de la toxina Shiga permite el direccionamiento de la potente citotoxicidad de la toxina Shiga

específicamente a las células que expresan CD20. En sus realizaciones preferidas, las proteínas de unión a CD20 de la invención son capaces de unirse a CD20 presente de forma nativa en una superficie celular y entrar en la célula. Una vez internalizadas dentro de un tipo de célula diana, determinadas realizaciones de las proteínas de unión a CD20 de la invención son capaces de dirigir un fragmento de polipéptido efector de toxina Shiga citotóxico hacia el citosol de la célula diana. Una vez en el citosol de un tipo de célula diana, determinadas realizaciones de las proteínas de unión a CD20 de la invención son capaces de inactivar enzimáticamente los ribosomas y eventualmente destruir la célula. Como alternativa, pueden usarse variantes no tóxicas para suministrar materiales exógenos adicionales y/o etiquetar el interior de las células que expresan CD20 con fines de diagnóstico.

- 10 **[0083]** Las proteínas de unión a CD20 de la invención pueden ser objetivo de diversos tipos de células que expresan CD20 para destruir y/o recibir materiales exógenos. Entre los tipos de células que expresan CD20 que se anticipa que internalizarán las proteínas de unión a CD20 de la invención están aquellas dentro del linaje de linfocitos B. "Linaje de linfocitos B" es un término utilizado para describir las células que se identifican citológicamente o de otro modo como linfocitos B, por ejemplo, a través de marcadores de superficie celular, o que una vez o actualmente se derivan de células que se identifican citológicamente o de otro modo como linfocitos B. El término "linaje de linfocitos B" incluye células neoplásicas derivadas del linaje de linfocitos B o precursores del linaje de linfocitos B. Entre los tipos de células que expresan CD20 que pueden ser dianas están las células displásicas o neoplásicas de linajes celulares que normalmente no expresan CD20, por ejemplo, células de melanoma. En particular, las células que expresan CD20 a las que dirigirse con las proteínas de unión a CD20 de la invención incluyen células neoplásicas de linajes de linfocitos B o linajes de células diferentes de linfocitos B, tales como células neoplásicas de un linaje hematopoyético que generalmente no se clasifican como linfocitos B pero que expresan CD20.

A. Proteína de unión a CD20 capaz de inducir una rápida internalización de CD20

- 25 **[0084]** Las regiones efectoras de toxina Shiga de la presente invención definidas en las reivindicaciones proporcionan una función de internalización, moviendo las proteínas de unión a CD20 desde la superficie externa de la célula diana al citosol de la célula diana. Sin embargo, esta función de internalización también es una función de aceleración, ya que la internalización celular de CD20 se promueve o se induce y tiene lugar en menos de seis horas. Como se usa en la memoria descriptiva, la frase "internalización rápida" se refiere a una proteína de unión a CD20 de la invención que disminuye el tiempo para la internalización celular de CD20 tras la unión en comparación con una molécula de referencia de la técnica anterior, tal como el anticuerpo monoclonal rituximab.

- [0085]** Para los fines de la presente descripción, la internalización celular se considera rápida si el tiempo de internalización que tiene lugar debido a la unión de las proteínas de unión a CD20 se reduce en comparación con el tiempo de internalización de la molécula diana con la unión de un anticuerpo bien caracterizado que reconoce un antígeno CD20, tal como el anticuerpo monoclonal 1H4 CD20 (Haisma H et al., Blood 92: 184-90 (1999)). Por ejemplo, el tiempo de internalización para el antígeno CD20, aunque variable para el tipo de célula y el tipo de anticuerpo, típicamente no comienza a alcanzar niveles máximos hasta aproximadamente seis horas después de la unión. Por lo tanto, el término "rápido", como se define en la presente memoria descriptiva es menor que esta ventana de internalización estándar de seis horas. En determinadas realizaciones, rápido puede ser tan rápido como menos de aproximadamente una hora, pero también puede abarcar un intervalo de aproximadamente 1 hora a aproximadamente 2 horas, a aproximadamente 3 horas, a aproximadamente 4 horas, a aproximadamente 5 horas; un intervalo de aproximadamente 2 horas a aproximadamente 3 horas, a aproximadamente 4 horas, a aproximadamente 5 horas; un intervalo de aproximadamente 3 horas a aproximadamente 4 horas, a aproximadamente 5 horas; y un intervalo de aproximadamente 4 horas a aproximadamente 5 horas.

B. Destrucción celular a través de la citotoxicidad de la toxina Shiga diana

- [0086]** Debido a que los miembros de la familia de toxinas Shiga están adaptados para destruir células eucariotas, las proteínas de unión a CD20 diseñadas usando regiones efectoras de toxina Shiga pueden mostrar una potente actividad de destrucción celular. Las Subunidades A de los miembros de la familia de toxinas Shiga comprenden dominios enzimáticos capaces de destruir una célula eucariota una vez en el citosol de la célula. Determinadas realizaciones de las proteínas de unión a CD20 de la invención aprovechan este mecanismo citotóxico.

- 55 **[0087]** En determinadas realizaciones de las proteínas de unión a CD20 de la invención, tras el contacto de una célula que expresa CD20 de modo que al menos una parte de CD20 sea accesible desde el espacio extracelular, la proteína de unión a CD20 es capaz de causar la muerte de la célula. La "destrucción celular" positiva para CD20 se puede lograr usando una proteína de unión a CD20 de la invención en condiciones variadas de células diana, tales como una célula diana manipulada *ex vivo*, una célula diana cultivada *in vitro*, una célula diana dentro de una muestra de tejido cultivada *in vitro*, o una célula diana *in vivo*.

C. Citotoxicidad selectiva entre células que expresan CD20 y células que no expresan CD20

- [0088]** Al dirigir el suministro de regiones de toxina Shiga enzimáticamente activas utilizando regiones de unión de tipo inmunoglobulina de alta afinidad a células que expresan CD20, esta potente actividad de destrucción celular

puede restringirse a la destrucción preferentemente de los tipos de células CD20 positivas.

[0089] En determinadas realizaciones, tras la administración de la proteína de unión a CD20 de la invención a una mezcla de tipos de células, la proteína de unión a CD20 es capaz de destruir selectivamente las células que expresan CD20 que muestran una diana CD20 extracelular en comparación con los tipos de células que carecen de dianas CD20 extracelulares. Debido a que los miembros de la familia de toxinas Shiga están adaptados para destruir células eucariotas, las proteínas de unión a CD20 diseñadas usando regiones efectoras de toxinas Shiga pueden mostrar una potente actividad citotóxica. Al dirigir el suministro de regiones de toxina Shiga enzimáticamente activas a células que expresan CD20 usando regiones de unión de tipo inmunoglobulina de alta afinidad, esta potente actividad de destrucción celular puede restringirse a destruir preferentemente solo células que expresan CD20.

[0090] En determinadas realizaciones, la proteína de unión a CD20 de la invención es capaz de causar selectiva o preferentemente la muerte de un tipo de célula específico dentro de una mezcla de dos o más tipos de células diferentes. Esto permite dirigir la actividad citotóxica a tipos de células específicos con una alta preferencia, tal como con un efecto citotóxico de al menos 3 veces, sobre los tipos de células "espectadoras" que no expresan una cantidad significativa de dianas CD20 extracelulares. Esto permite la destrucción de células diana de tipos de células específicos que expresan CD20 en superficies celulares con una alta preferencia, tal como por ejemplo con un efecto citotóxico de al menos 3 veces, sobre los tipos de células "espectadoras" que no expresan cantidades significativas de CD20 o que no exponen cantidades significativas de CD20 en una superficie celular.

[0091] En determinadas realizaciones adicionales, tras la administración de la proteína de unión a CD20 a dos poblaciones diferentes de tipos de células, la proteína de unión a CD20 es capaz de causar la muerte celular tal como se define por la concentración citotóxica semimáxima (CD₅₀) en una célula población que expresa CD20 en una superficie celular a una dosis al menos tres veces menor que la dosis de CD₅₀ de la misma proteína de unión a CD20 a una población celular que no expresa CD20.

[0092] En determinadas realizaciones, la actividad citotóxica hacia poblaciones de tipos celulares que expresan CD20 en una superficie celular es al menos 3 veces mayor que la actividad citotóxica hacia poblaciones de tipos de células no físicamente acoplados con ninguna diana CD20 extracelular de la región de unión a CD20 de la realización. Según la presente invención, la citotoxicidad selectiva puede cuantificarse en términos de la relación (a/b) de (a) la citotoxicidad hacia una población de células que expresan una diana CD20 extracelular de la región de unión a CD20 de la realización con respecto a (b) la citotoxicidad hacia una población de células de un tipo de célula que no está físicamente acoplado con ninguna diana CD20 extracelular de la región de unión a CD20 de la realización. En determinadas realizaciones, la relación de citotoxicidad es indicativa de una citotoxicidad selectiva que es al menos 3 veces, 5 veces, 10 veces, 15 veces, 20 veces, 25 veces, 30 veces, 40 veces, 50- veces, 75 veces, 100 veces, 250 veces, 500 veces, 750 veces o 1000 veces superior para las poblaciones de células o tipos de células que expresan CD20 en comparación con las poblaciones de células o tipos de células que no expresan CD20.

[0093] Esta función de destrucción celular preferencial permite que una célula diana sea destruida por ciertas proteínas de unión a CD20 de la invención en condiciones variadas y en presencia de células espectadoras no diana, tales como mezclas manipuladas *ex vivo* de tipos de células, en tejidos cultivados *in vitro* con mezclas de tipos de células, o *in vivo* en presencia de múltiples tipos de células (por ejemplo, *in situ* o en su ubicación nativa dentro de un organismo multicelular).

[0094] Además, las formas catalíticamente inactivas de proteínas de unión a CD20 pueden usarse opcionalmente para funciones de diagnóstico. La conjugación de agentes de diagnóstico adicionales conocidos en la técnica con proteínas de unión a CD20 de la invención permite la obtención de imágenes de orgánulos intracelulares (por ejemplo, Golgi, retículo endoplásmico y compartimentos citosólicos) de células inmunes individuales del linaje de linfocitos B o células cancerosas en una muestra de paciente o de biopsia. Por ejemplo, esto puede ser útil en el diagnóstico de los tipos de células neoplásicas, ensayando la progresión de las terapias contra el cáncer a lo largo del tiempo, y/o evaluando la presencia de células cancerosas residuales después de la escisión quirúrgica de una masa tumoral.

D. Entrega de material exógeno adicional

[0095] Como las proteínas de unión a CD20 son capaces de inducir la internalización celular de CD20 después de unirse a una parte extracelular de CD20, determinadas realizaciones de las proteínas de unión a CD20 de la invención pueden usarse para suministrar materiales exógenos adicionales al interior de células que expresan CD20, como se define en las reivindicaciones. En cierto sentido, toda la proteína de unión a CD20 es un material exógeno que entrará en la célula; por lo tanto, los materiales exógenos "adicionales" son materiales unidos a, pero distintos de, la propia proteína de unión a CD20 central.

[0096] "Material exógeno adicional", como se usa en esta invención, se refiere a una o más moléculas, a menudo generalmente no presentes dentro de una célula diana nativa, donde las proteínas de unión a CD20 de la presente invención se pueden usar para transportar específicamente dicho material al interior de una célula. En

general, se selecciona material exógeno adicional de péptidos, polipéptidos, proteínas y polinucleótidos. Un ejemplo de un material exógeno adicional que es un péptido es un antígeno del virus de la influenza, tal como el péptido Matrix 58-66 de influenza (SEQ ID NO:3). Una proteína de unión a CD20 ejemplar descrita en esta invención que puede suministrar ese antígeno en una célula diana que expresa CD20 se proporciona en la SEQ ID NO: 16.

5 **[0097]** El material exógeno adicional puede incluir una secuencia de polipéptidos interior dentro de la estructura de la proteína de unión a CD20 central, tal como el péptido Matrix 58-66 de influenza (SEQ ID NO:3). De manera similar, el material exógeno adicional puede incluir una secuencia de polipéptidos localizada terminalmente unida a un extremo de la estructura de unión a CD20. Determinadas realizaciones de las proteínas de unión a CD20 de la
10 invención que pueden suministrar ese antígeno, como material exógeno adicional, en una célula diana que expresa CD20 en una superficie celular es la proteína de unión a CD20 que comprende o consiste en la SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:12 o SEQ ID NO:14.

15 **[0098]** Los ejemplos adicionales de materiales exógenos que pueden unirse a las proteínas de unión a CD20 de la invención incluyen antígenos tales como los derivados de proteínas bacterianas, tales como los característicos de las células presentadoras de antígeno infectadas por bacterias. Otros ejemplos de materiales exógenos adicionales son proteínas mutadas en cáncer o proteínas que se expresan de forma aberrante en el cáncer. Otros ejemplos de materiales exógenos adicionales incluyen regiones determinantes de complementariedad de linfocitos T capaces de funcionar como antígenos exógenos.

20 **[0099]** Otros ejemplos de materiales exógenos que pueden unirse a las proteínas de unión a CD20 de la invención incluyen proteínas distintas de antígenos, tales como enzimas. Otros tipos de material exógeno son los polinucleótidos. Entre los polinucleótidos que pueden transportarse se encuentran los formulados para tener una función reguladora, tal como ARN interferente pequeño (siARN) y microARN (miARN).

25 **[0100]** Ejemplos adicionales de materiales exógenos incluyen antígenos tales como los derivados de proteínas bacterianas, tales como los característicos de células presentadoras de antígeno que están infectadas con bacterias. Otros ejemplos de antígenos exógenos son los que se derivan de una proteína mutada en cáncer o proteínas que se expresan de forma aberrante en el cáncer. Las regiones determinantes de complementariedad (CDR) de linfocitos T
30 también pueden actuar como antígenos exógenos para los fines de la presente invención. Ejemplos adicionales de material exógeno incluyen proteínas distintas de los antígenos, tales como enzimas. Otro tipo de material exógeno son los ácidos nucleicos. Entre los ácidos nucleicos que pueden transportarse se encuentran los formulados para tener una función reguladora, tal como ARN interferente pequeño (siARN) y microARN (miARN).

35 Variaciones en la secuencia de polipéptidos de las proteínas de unión a CD20 de la invención que mantienen la estructura y función generales

[0101] En algunas de las realizaciones anteriores, la proteína de unión a CD20 de la invención es una variante en la que hay una o más sustituciones conservadoras de aminoácidos introducidas en la región o regiones de
40 polipéptidos. Como se usa en esta invención, el término "sustitución conservadora" significa que uno o más aminoácidos son reemplazados por otro residuo aminoacídico biológicamente similar. Los ejemplos incluyen la sustitución de residuos aminoacídicos con características similares, por ejemplo, aminoácidos pequeños, aminoácidos ácidos, aminoácidos polares, aminoácidos básicos, aminoácidos hidrófobos y aminoácidos aromáticos (véase, por ejemplo, la Tabla B a continuación). Un ejemplo de una sustitución conservadora con un residuo que normalmente no
45 se encuentra en péptidos y proteínas endógenas de mamífero es la sustitución conservadora de un residuo de arginina o lisina con, por ejemplo, ornitina, canavanina, aminoetilcisteína u otro aminoácido básico. Para obtener más información sobre las sustituciones fenotípicamente silenciosas en péptidos y proteínas (véase, por ejemplo, Bowie J et al., Science 247: 1306-10 (1990)). En el siguiente esquema se encuentran sustituciones conservadoras de aminoácidos agrupados por propiedades fisicoquímicas. I: neutros, hidrófilos, II: ácidos y amidas, III: básicos, IV:
50 hidrófobos, V: aminoácidos aromáticos y voluminosos.

TABLA B. Ejemplos de sustituciones conservadoras de aminoácidos

I	II	III	IV	V
A	N	H	M	F
S	D	R	L	Y
T	E	K	I	W
P	Q		V	
G			C	

[0102] En determinadas realizaciones como se define en las reivindicaciones, una proteína de unión a CD20
55 de la invención puede comprender fragmentos funcionales o variantes de una región de polipéptidos de la invención

que tienen, como máximo, 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 sustituciones de aminoácidos en comparación con una secuencia de polipéptidos mencionada en este documento, siempre que conserve actividad biológica medible en solitario o como un componente de una proteína de unión a CD20. Como se define en las reivindicaciones, las variantes de proteínas de unión a CD20 están dentro del alcance de la invención como resultado de cambiar un polipéptido de la proteína de unión a CD20 alterando uno o más aminoácidos o eliminando o insertando uno o más aminoácidos, tal como dentro de la región de unión de tipo inmunoglobulina o la región efectora de toxina Shiga, para lograr las propiedades deseadas, tales como cambio de la citotoxicidad, cambios en los efectos citostáticos, cambios en la inmunogenicidad y/o cambio en la semivida sérica. Un polipéptido de una proteína de unión a CD20 de la invención puede ser además con o sin una secuencia señal.

10

[0103] En determinadas realizaciones, una proteína de unión a CD20 de la invención comparte al menos un 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más de identidad de secuencia aminoacídica con cualquiera de las secuencias de aminoácidos de una proteína de unión a CD20 mostrada en la SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:12 o SEQ ID NO:14, siempre que conserve la actividad de unión a CD20, y opcionalmente una o más actividades biológicas seleccionadas de citotoxicidad, catálisis enzimática y enrutamiento subcelular, como se define en las reivindicaciones. La región de unión de tipo inmunoglobulina puede diferir de las secuencias de aminoácidos de una proteína de unión a CD20 mencionada en esta invención, siempre que conserve la funcionalidad de unión a su biomolécula diana extracelular. La funcionalidad de unión probablemente se conservará si las secuencias de aminoácidos de los ABR son idénticas. Por ejemplo, una proteína de unión a CD20 que consiste esencialmente en un 85 % de identidad de aminoácidos con la SEQ ID NO:4 en la que, con el fin de determinar el grado de identidad de los aminoácidos, no se tienen en cuenta los residuos aminoacídicos que forman el ABR. La funcionalidad de unión puede determinarse por el experto en la técnica utilizando técnicas estándar.

[0104] En determinadas realizaciones, la región efectora de toxina Shiga puede alterarse para cambiar la actividad enzimática y/o la citotoxicidad de la región efectora de toxina Shiga. Este cambio puede o no dar como resultado un cambio en la citotoxicidad de una proteína de unión a CD20 de la cual la región efectora de toxina Shiga alterada es un componente. Las posibles alteraciones incluyen mutaciones en la región efectora de toxina Shiga seleccionada del grupo que consiste en: un truncamiento, delección, inversión, inserción y sustitución.

[0105] La citotoxicidad de las Subunidades A de los miembros de la familia de toxinas Shiga puede reducirse o eliminarse por mutación o truncamiento. Se demostró que las posiciones etiquetadas como tirosina-77, glutamato-167, arginina-170, tirosina-114 y triptófano-203 son importantes para la actividad catalítica de Stx, Stx1 y Stx2 (Hovde C et al., Proc Natl Acad Sci USA 85: 2568-72 (1988); Deresiewicz R et al., Biochemistry 31: 3272-80 (1992); Deresiewicz R et al., Mol Gen Genet 241: 467-73 (1993); Ohmura M et al., Microb Pathog 15: 169-76 (1993); Cao C et al., Microbiol Immunol 38: 441-7 (1994); Suhan M, Hovde C, Infect Immun 66: 5252-9 (1998)). La mutación tanto del glutamato-167 como de la arginina-170 eliminó la actividad enzimática de St-I A1 en un ensayo de inactivación de ribosomas sin células (LaPointe, J Biol Chem 280: 23310-18 (2005)). En otro enfoque que utiliza la expresión *de novo* de St-I A1 en el retículo endoplásmico, la mutación tanto de glutamato-167 como de arginina-170 eliminó la citotoxicidad del fragmento St-I A1 a ese nivel de expresión (LaPointe, J Biol Chem 280: 23310-18 (2005)). Un análisis de truncamiento demostró que un fragmento de StxA de los residuos 75 a 268 aún conserva una actividad enzimática significativa *in vitro* (Haddad, J Bacteriol 175: 4970-8 (1993)). Un fragmento truncado de St-I A1 que contiene los residuos 1-239 mostró actividad enzimática significativa *in vitro* y citotoxicidad por expresión *de novo* en el citosol (LaPointe, J Biol Chem 280: 23310-18 (2005)). La expresión de un fragmento de St-I A1 truncado en los residuos 1-239 en el retículo endoplásmico no era citotóxica porque no pudo retrotranslocarse en el citosol (LaPointe, J Biol Chem 280: 23310-18 (2005)).

[0106] Los residuos más críticos para la actividad enzimática y/o la citotoxicidad en las subunidades A de la toxina Shiga se mapearon en las siguientes posiciones de residuos: aspargina-75, tirosina-77, glutamato-167, arginina-170 y arginina-176 entre otros (Di, Toxicon 57: 535-39 (2011)). En particular, una construcción de doble mutante de Stx2A que contiene mutaciones de glutamato-E167-a-lisina y arginina-176-a-lisina se inactivó completamente; mientras que muchas mutaciones individuales en Stx1 y Stx2 mostraron una reducción de 10 veces en la citotoxicidad. Además, el truncamiento de Stx1A a 1-239 o 1-240 redujo su citotoxicidad, y de manera similar, el truncamiento de Stx2A en un residuo hidrófobo conservado redujo su citotoxicidad.

[0107] Los truncamientos de la subunidad A de la toxina 1 tipo Shiga son catalíticamente activos, capaces de inactivar enzimáticamente los ribosomas *in vitro*, y citotóxicos cuando se expresan dentro de una célula (LaPointe, J Biol Chem 280: 23310-18 (2005)). El fragmento de la subunidad A de toxina Shiga más pequeño que exhibe actividad enzimática completa es un polipéptido compuesto por los residuos 1-239 de St1A (LaPointe, J Biol Chem 280: 23310-18 (2005)). Aunque se informó que el fragmento más pequeño de la subunidad A de la toxina Shiga que conservaba una actividad catalítica sustancial eran los residuos 75-247 de StxA (Al-Jaufy, Infect Immun 62: 956-60 (1994)), un truncamiento de StxA expresado *de novo* dentro de una célula eucariota requiere que solo hasta el residuo 240 alcance el citosol y ejerza la inactivación catalítica de los ribosomas (LaPointe, J Biol Chem 280: 23310-18 (2005)).

[0108] En determinadas realizaciones derivadas de SLT-1A (SEQ ID NO:1) o StxA (SEQ ID NO:25), estos cambios incluyen la sustitución de la aspargina en la posición 75, tirosina en la posición 77, tirosina en la posición

114, glutamato en la posición 167, arginina en la posición 170, arginina en la posición 176, y/o sustitución del triptófano en la posición 203. El experto en la técnica conocerá ejemplos de dichas sustituciones basadas en la técnica anterior, tal como asparagina en la posición 75 a alanina, tirosina en la posición 77 a serina, sustitución de la tirosina en la posición 114 a alanina, sustitución del glutamato en la posición 167 a aspartato, sustitución de la arginina en la posición 170 a alanina, sustitución de la arginina en la posición 176 a lisina, y/o sustitución del triptófano en la posición 203 a alanina.

[0109] Las proteínas de unión a CD20 de la invención pueden conjugarse opcionalmente con uno o más agentes adicionales que pueden incluir agentes terapéuticos y/o de diagnóstico conocidos en la técnica.

10

Producción, fabricación y purificación de una proteína de unión a CD20 de la invención

[0110] Las proteínas de unión a CD20 de la invención pueden producirse usando técnicas de ingeniería bioquímica bien conocidas por los expertos en la técnica. Por ejemplo, las proteínas de unión a CD20 de la invención pueden fabricarse mediante procedimientos sintéticos estándar, mediante el uso de sistemas de expresión recombinantes, o mediante cualquier otro procedimiento adecuado. Por lo tanto, las proteínas de unión a CD20 pueden sintetizarse de varias maneras, incluyendo, por ejemplo, procedimientos que comprenden: (1) sintetizar un polipéptido o componente de polipéptido de una proteína de unión a CD20 usando una metodología estándar de fase sólida o fase líquida, ya sea paso a paso o mediante ensamblaje de fragmentos, y aislar y purificar el producto de compuesto peptídico final; (2) expresar un polinucleótido que codifica un polipéptido o componente de polipéptido de una proteína de unión a CD20 en una célula huésped, y recuperar el producto de expresión de la célula huésped o cultivo de células huésped; o (3) expresión *in vitro* sin células de un polinucleótido que codifica un polipéptido o componente de polipéptido de una proteína de unión a CD20, y recuperar el producto de expresión; o mediante cualquier combinación de los procedimientos de (1), (2) o (3) para obtener fragmentos del componente peptídico, unir posteriormente (por ejemplo, ligando) los fragmentos para obtener el componente peptídico, y recuperar el componente peptídico.

[0111] Puede ser preferible sintetizar un polipéptido o componente de polipéptido de una proteína de unión a CD20 de la invención por medio de síntesis de péptidos en fase sólida o en fase líquida. Las proteínas de unión a CD20 de la invención pueden fabricarse adecuadamente mediante procedimientos sintéticos estándar. Por lo tanto, los péptidos pueden sintetizarse, por ejemplo, mediante procedimientos que comprenden sintetizar el péptido por metodología estándar en fase sólida o en fase líquida, ya sea por etapas o por ensamblaje de fragmentos, y aislar y purificar el producto peptídico final. En este contexto, se puede hacer referencia al documento WO 1998/11125 o, entre otros, Fields, G et al., Principles and Practice of Solid-Phase Peptide Synthesis (Synthetic Peptides, Gregory A. Grant, ed., Oxford University Press, Reino Unido, 2ª ed., 2002), y los ejemplos de síntesis en los mismos.

35

[0112] Las proteínas de unión a CD20 de la invención pueden prepararse (producirse y purificarse) usando técnicas recombinantes bien conocidas en la técnica. En general, los procedimientos para preparar polipéptidos mediante el cultivo de células huésped transformadas o transfectadas con un vector que comprende el polinucleótido codificante y la recuperación del polipéptido del cultivo celular se describen en, por ejemplo, Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, EE.UU., 1989); Dieffenbach et al., PCR Primer: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y., EE.UU., 1995). Se puede usar cualquier célula huésped adecuada para producir una proteína de unión a CD20 de la invención. Las células huésped pueden ser células transfectadas, transformadas, transducidas o infectadas de manera estable o transitoria con uno o más vectores de expresión que impulsan la expresión de un polipéptido de la invención. Además, se puede producir una proteína de unión a CD20 de la invención modificando el polinucleótido que codifica la proteína de unión a CD20 que da como resultado la alteración de uno o más aminoácidos o la eliminación o inserción de uno o más aminoácidos para lograr las propiedades deseadas, tales como cambio de la citotoxicidad, cambio en los efectos citostáticos, cambio en la inmunogenicidad y/o cambio en la semivida sérica.

[0113] Por consiguiente, la presente descripción también proporciona procedimientos para producir una proteína de unión a CD20 de la invención según los procedimientos mencionados anteriormente y usar un polinucleótido que codifica parte o todo el polipéptido de la invención, un vector de expresión que comprende al menos un polinucleótido de la invención capaz de codificar parte o la totalidad de un polipéptido de la invención cuando se introduce en una célula huésped, y/o una célula huésped que comprende un polinucleótido o vector de expresión de la invención.

50

[0114] Cuando se expresa un polipéptido o proteína usando técnicas recombinantes en una célula huésped o sistema sin células, es ventajoso separar (o purificar) el polipéptido o proteína deseada lejos de otros componentes, tales como los factores de la célula huésped, con el fin de obtener preparaciones que sean de alta pureza o que sean sustancialmente homogéneas. La purificación se puede lograr mediante procedimientos bien conocidos en la técnica, tales como técnicas de centrifugación, técnicas de extracción, técnicas cromatográficas y de fraccionamiento (por ejemplo, separación por tamaño mediante filtración en gel, separación de carga por columna de intercambio iónico, cromatografía de interacción hidrófoba, cromatografía de fase inversa, cromatografía sobre sílice o resinas de intercambio catiónico tal como DEAE, y similares, cromatografía de proteína A Sepharose para eliminar contaminantes), y técnicas de precipitación (por ejemplo, precipitación de etanol o precipitación de sulfato de

65

amonio. Se puede utilizar cualquier cantidad de técnicas de purificación bioquímica para aumentar la pureza de una proteína de unión a CD20 de la invención. En determinadas realizaciones, las proteínas de unión a CD20 de la invención pueden purificarse opcionalmente en formas homomultiméricas (es decir, un complejo proteico de dos o más proteínas de unión a CD20 idénticas).

5

[0115] En los ejemplos a continuación hay descripciones de ejemplos no limitantes de procedimientos para producir una proteína de unión a CD20 de la invención, así como aspectos específicos, pero no limitantes, de la producción de proteína de unión a CD20 para las proteínas de unión a CD20 descritas ejemplares.

10 Composiciones farmacéuticas que comprenden una proteína de unión a CD20 de la invención

[0116] La presente invención proporciona proteínas de unión a CD20 para su uso, en solitario o en combinación con uno o más agentes terapéuticos adicionales, en una composición farmacéutica, para el tratamiento o la profilaxis de afecciones, enfermedades, trastornos o síntomas descritos con más detalle a continuación (por ejemplo, cánceres, tumores malignos, tumores no malignos y trastornos inmunitarios). La presente invención proporciona además composiciones farmacéuticas que comprenden una proteína de unión a CD20 de la invención, o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable de la misma, según la invención, junto con al menos un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable. En determinadas realizaciones, la composición farmacéutica de la invención puede comprender formas homomultiméricas y/o hetero-multiméricas de las proteínas de unión a CD20 de la invención. Las composiciones farmacéuticas serán útiles en procedimientos para tratar, mejorar o prevenir una enfermedad, afección, trastorno o síntoma que se describe con más detalle a continuación. Se prevé que cada una de dicha enfermedad, afección, trastorno o síntoma sea una realización separada con respecto a los usos de una composición farmacéutica según la invención. La invención proporciona además composiciones farmacéuticas para su uso en al menos un procedimiento de tratamiento como se define en las reivindicaciones, como se describe con más detalle a continuación.

25

[0117] Como se usa en esta invención, los términos "paciente" y "sujeto" se usan indistintamente para referirse a cualquier organismo, comúnmente vertebrados tales como humanos y animales, que presenta síntomas, signos y/o indicaciones de al menos una enfermedad, trastorno o afección. Estos términos incluyen mamíferos tales como los ejemplos no limitantes de primates, animales de ganado (por ejemplo, ganado, caballos, cerdos, ovejas, cabras, etc.), animales de compañía (por ejemplo, gatos, perros, etc.) y animales de laboratorio (por ejemplo, ratones, conejos, ratas, etc.).

30

[0118] Como se usa en esta invención, "tratar", "que trata" o "tratamiento" y variantes gramaticales de los mismos se refieren a un enfoque para obtener resultados clínicos beneficiosos o deseados. Los términos pueden referirse a retrasar el inicio o la tasa de desarrollo de una afección, trastorno o enfermedad, reducir o aliviar los síntomas asociados con ésta, generar una regresión completa o parcial de la afección, o alguna combinación de cualquiera de los anteriores. Para los fines de esta invención, los resultados clínicos beneficiosos o deseados incluyen, pero sin limitación, la reducción o alivio de los síntomas, disminución de la extensión de la enfermedad, estabilización (por ejemplo, no empeoramiento) de la patología, retraso o desaceleración de la progresión de la enfermedad, mejora o paliación de la patología, y remisión (ya sea parcial o total), ya sea detectable o indetectable. "Tratar", "que trata" o "tratamiento" también puede significar prolongar la supervivencia en relación con el tiempo de supervivencia esperado si no se recibe tratamiento. Por lo tanto, un sujeto (por ejemplo, un ser humano) que necesita tratamiento puede ser un sujeto que ya padece la enfermedad o trastorno en cuestión. Los términos "tratar", "que trata" o "tratamiento" incluyen la inhibición o reducción de un aumento de la gravedad de un estado patológico o síntomas relacionados con la ausencia de tratamiento, y no necesariamente implican el cese completo de la enfermedad, trastorno o afección relevante.

35

40

45

[0119] Como se usa en esta invención, los términos "prevenir", "que previene", "prevención" y variantes gramaticales de los mismos se refieren a un enfoque para prevenir el desarrollo o alterar la patología de una afección, enfermedad o trastorno. En consecuencia, "prevención" puede referirse a medidas profilácticas o preventivas. Para los fines de esta invención, los resultados clínicos beneficiosos o deseados incluyen, pero sin limitación, la prevención o desaceleración de los síntomas, la progresión o desarrollo de una enfermedad, ya sea detectable o indetectable. Por lo tanto, un sujeto (por ejemplo, un ser humano) que necesita prevención puede ser un sujeto que aún no padece la enfermedad o trastorno en cuestión. El término "prevención" incluye ralentizar el inicio de la enfermedad en relación con la ausencia de tratamiento, y no necesariamente implica la prevención permanente de la enfermedad, trastorno o afección relevante. Por lo tanto, "prevenir" o "prevención" de una afección puede referirse, en ciertos contextos, a reducir el riesgo de desarrollar la afección, o prevenir o retrasar el desarrollo de los síntomas asociados con la afección.

50

55

[0120] Como se usa en esta invención, una "cantidad eficaz" o "cantidad terapéuticamente eficaz" es una cantidad o dosis de una composición (por ejemplo, una composición terapéutica o agente) que produce al menos un efecto terapéutico deseado en un sujeto, tal como prevenir o tratar una afección objetivo, o aliviar de manera beneficiosa un síntoma asociado con la afección. La cantidad terapéuticamente eficaz más deseable es una cantidad que producirá la eficacia deseada de un tratamiento particular seleccionado por un experto en la materia para un sujeto dado que lo necesite. Esta cantidad variará dependiendo de una diversidad de factores entendidos por el experto, incluyendo, pero sin limitación, las características del compuesto terapéutico (incluyendo la actividad, farmacocinética,

60

65

farmacodinámica y biodisponibilidad), la condición fisiológica del sujeto (incluyendo la edad, el sexo, tipo de enfermedad, estadio de la enfermedad, estado físico general, capacidad de respuesta a una dosis dada, y tipo de medicamento), la naturaleza del vehículo o vehículos farmacéuticamente aceptables en la formulación, y la vía de administración. Un experto en las técnicas clínica y farmacológica podrá determinar una cantidad terapéuticamente eficaz a través de la experimentación de rutina, concretamente, monitorizando la respuesta de un sujeto a la administración de un compuesto y ajustando la dosis en consecuencia (véase, por ejemplo, Remington: The Science and Practice of Pharmacy (Gennaro A, ed., Mack Publishing Co., Easton, PA, EE.UU., 19ª ed., 1995)).

10 Producción o fabricación de una composición farmacéutica que comprende una proteína de unión a CD20 de la invención

[0121] Las sales o solvatos farmacéuticamente aceptables de cualquiera de las proteínas de unión a CD20 de la invención también están dentro del alcance de la presente invención.

15 **[0122]** El término "solvato" en el contexto de la presente invención se refiere a un complejo de estequiometría definida formado entre un soluto (en este caso, un compuesto de polipéptido o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo según la invención) y un disolvente. El disolvente a este respecto puede ser, por ejemplo, agua, etanol u otra especie farmacéuticamente aceptable, típicamente de pequeño peso molecular orgánica, tal como, pero sin limitación, ácido acético o ácido láctico. Cuando el disolvente en cuestión es agua, tal solvato se denomina normalmente hidratado.

[0123] Las proteínas de unión a CD20 de la presente invención, o sales de las mismas, pueden formularse como composiciones farmacéuticas preparadas para almacenamiento o administración, que típicamente comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de la invención, o una sal del mismo, en un vehículo farmacéutica aceptable. El término "vehículo farmacéuticamente aceptable" incluye cualquiera de los vehículos farmacéuticos estándar. Los vehículos farmacéuticamente aceptables para uso terapéutico se conocen bien en la técnica farmacéutica y se describen, por ejemplo, en Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Co. (A. Gennaro, ed., 1985)). Como se usa en esta invención, "vehículo farmacéuticamente aceptable" incluye cualquiera y todos los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antimicrobianos, agentes isotónicos y retardantes de la absorción, y similares, fisiológicamente aceptables, es decir, compatibles. Los vehículos o diluyentes farmacéuticamente aceptables incluyen los utilizados en formulaciones adecuadas para administración oral, rectal, nasal o parenteral (incluyendo administración subcutánea, intramuscular, intravenosa, intradérmica y transdérmica). Los vehículos farmacéuticamente aceptables ejemplares incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. Los ejemplos de vehículos acuosos y no acuosos adecuados que pueden emplearse en las composiciones farmacéuticas de la invención incluyen agua, etanol, polioles (tales como glicerol, propilenglicol, polietilenglicol y similares), y mezclas adecuadas de los mismos, aceites vegetales, tales como aceite de oliva, y ésteres orgánicos inyectables, tal como oleato de etilo. La fluidez adecuada se puede mantener, por ejemplo, mediante el uso de materiales de recubrimiento, tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersiones, y mediante el uso de tensioactivos. En determinadas realizaciones, el vehículo es adecuado para administración intravenosa, intramuscular, subcutánea, parenteral, espinal o epidérmica (por ejemplo, por inyección o infusión). Dependiendo de la vía de administración seleccionada, la proteína de unión a CD20, u otro componente farmacéutico, puede recubrirse en un material destinado a proteger el compuesto de la acción del pH bajo y otras condiciones inactivadoras naturales con las que la proteína de unión a CD20 activa puede encontrarse cuando se administra a un paciente por una vía de administración particular.

[0124] Las formulaciones de las composiciones farmacéuticas de la invención se pueden presentar convenientemente en forma de dosificación unitaria y pueden prepararse mediante cualquiera de los procedimientos bien conocidos en la técnica de farmacia. En dicha forma, la composición se divide en dosis unitarias que contienen cantidades apropiadas del componente activo. La forma de dosificación unitaria puede ser una preparación envasada, conteniendo el paquete cantidades discretas de las preparaciones, por ejemplo, comprimidos, cápsulas y polvos envasados en viales o ampollas. La forma de dosificación unitaria también puede ser una pastilla, cápsula o comprimido, o puede ser el número apropiado de cualquiera de estas formas envasadas. Se puede proporcionar en forma inyectable de dosis única, por ejemplo, en forma de pluma. Las composiciones pueden formularse para cualquier ruta y medio de administración adecuados. Los modos de administración subcutánea o transdérmica pueden ser particularmente adecuados para las proteínas de unión a CD20 terapéuticas descritas en esta invención.

[0125] Las composiciones farmacéuticas de la invención también pueden contener adyuvantes tales como conservantes, agentes humectantes, agentes emulsionantes y agentes dispersantes. La prevención de la presencia de microorganismos puede garantizarse tanto mediante procedimientos de esterilización como mediante la inclusión de diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabeno, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, y similares. También pueden ser deseables agentes isotónicos, tales como azúcares, cloruro de sodio y similares, en las composiciones. Además, la absorción prolongada de la forma inyectable del fármaco se puede llevar a cabo mediante la inclusión de agentes que retrasen la absorción, tales como monoestearato de aluminio y gelatina.

65

[0126] Una composición farmacéutica de la invención también incluye opcionalmente un antioxidante farmacéuticamente aceptable. Los antioxidantes farmacéuticamente aceptables ejemplares son antioxidantes solubles en agua tales como ácido ascórbico, clorhidrato de cisteína, bisulfato de sodio, metabisulfito de sodio, sulfito de sodio y similares; antioxidantes solubles en aceite, tales como palmitato de ascorbilo, hidroxianisol butilado (BHA), hidroxitolueno butilado (BHT), lecitina, propilgalato, alfa-tocoferol y similares; y agentes quelantes de metales, tales como ácido cítrico, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), sorbitol, ácido tartárico, ácido fosfórico y similares.

[0127] En otro aspecto, la presente invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden una o una combinación de diferentes proteínas de unión a CD20 de la invención, y al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable.

[0128] Las composiciones terapéuticas son típicamente estériles y estables en las condiciones de fabricación y almacenamiento. La composición puede formularse como una solución, microemulsión, liposoma u otra estructura ordenada adecuada para una alta concentración de fármaco. El vehículo puede ser un disolvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, alcohol tal como etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido), o cualquier mezcla adecuada. La fluidez adecuada se puede mantener, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersión, y mediante el uso de tensioactivos según la química de formulación bien conocida en la técnica. En determinadas realizaciones, pueden ser deseables agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol o cloruro de sodio, en la composición. La absorción prolongada de composiciones inyectables se puede lograr mediante la inclusión en la composición de un agente que retrase la absorción, por ejemplo, sales de monoestearato y gelatina.

[0129] Las soluciones o suspensiones utilizadas para aplicación intradérmica o subcutánea típicamente incluyen uno o más de: un diluyente estéril tal como agua para inyección, solución salina, aceites fijos, polietilenglicoles, glicerina, propilenglicol u otros disolventes sintéticos; agentes antibacterianos tales como alcohol bencílico o metilparabenos; antioxidantes tales como ácido ascórbico o bisulfito de sodio; agentes quelantes tales como ácido etilendiaminotetraacético; tampones tales como acetatos, citratos o fosfatos; y agentes de ajuste de la tonicidad tales como, por ejemplo, cloruro de sodio o dextrosa. El pH puede ajustarse con ácidos o bases, tales como ácido clorhídrico o hidróxido de sodio, o tampones con citrato, fosfato, acetato y similares. Dichas preparaciones pueden estar encerradas en ampollas, jeringas desechables o viales de dosis múltiple de vidrio o plástico.

[0130] Las soluciones inyectables estériles pueden prepararse incorporando una proteína de unión a CD20 de la invención en la cantidad requerida en un disolvente apropiado con uno o una combinación de ingredientes descritos anteriormente, según sea necesario, seguido de microfiltración por esterilización. Las dispersiones pueden prepararse incorporando el compuesto activo en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión y otros ingredientes, como los descritos anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los procedimientos de preparación son secado al vacío y secado por congelación (liofilización) que producen un polvo del principio activo además de cualquier ingrediente adicional deseado de una solución filtrada estéril del mismo.

[0131] Cuando una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína de unión a CD20 de la invención está diseñada para administrarse, por ejemplo, por inyección intravenosa, cutánea o subcutánea, el agente de unión estará en forma de una solución acuosa aceptable por vía parenteral apirógena. Los procedimientos para preparar soluciones de proteínas aceptables por vía parenteral, teniendo en cuenta el pH apropiado, la isotonicidad, la estabilidad y similares, están dentro de la habilidad en la técnica. Una composición farmacéutica preferida para inyección intravenosa, cutánea o subcutánea contendrá, además de agentes aglutinantes, un vehículo isotónico tal como inyección de cloruro de sodio, inyección de Ringer, inyección de dextrosa, inyección de dextrosa y cloruro de sodio, inyección de Ringer en lactato, u otro vehículo como conocido en la técnica. Una composición farmacéutica de la presente invención también puede contener estabilizantes, conservantes, tampones, antioxidantes u otros aditivos bien conocidos por los expertos en la técnica.

[0132] Como se describe en otra parte de esta invención, se puede preparar un compuesto con vehículos que protegerán el compuesto contra la liberación rápida, tal como una formulación de liberación controlada, incluyendo implantes, parches transdérmicos, y sistemas de administración microencapsulados. Se pueden utilizar polímeros biodegradables y biocompatibles, tales como etilenvinilacetato, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres y ácido poliláctico. Muchos procedimientos para la preparación de dichas formulaciones están patentados o generalmente se conocen por los expertos en la técnica (véase, por ejemplo, Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems (J. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., NY, EE.UU., 1978)).

[0133] En determinadas realizaciones, la composición farmacéutica de la invención puede formularse para asegurar una distribución deseada *in vivo*. Por ejemplo, la barrera hematoencefálica excluye muchos compuestos grandes y/o hidrófilos. Para dirigir un compuesto o composición terapéutica de la invención a una ubicación *in vivo* particular, pueden formularse, por ejemplo, en liposomas que pueden comprender uno o más restos que se transportan selectivamente a células u órganos específicos, mejorando así la administración farmacológica dirigida. Los restos de

direccionamiento ejemplares incluyen folato o biotina; manósidos; anticuerpos; receptor de proteína A tensioactivo; p120 catenina y similares.

Polinucleótidos, vectores de expresión y células huésped

5

[0134] Más allá de las proteínas de unión a CD20 de la presente invención, los ácidos nucleicos que codifican dichas proteínas de unión a CD20 están dentro del alcance de la presente invención. El término "polinucleótido" es equivalente al término "ácidos nucleicos", ambos de los cuales incluyen polímeros de ácidos desoxirribonucleicos (ADN), polímeros de ácidos ribonucleicos (ARN), análogos de estos ADN o ARN generados usando análogos de nucleótidos, y derivados, fragmentos y homólogos de los mismos. El ácido nucleico de la invención puede ser monocatenario, bicatenario o tricatenario. Se describe específicamente que los polinucleótidos descritos incluyen todos los polinucleótidos capaces de codificar una proteína de unión a CD20 ejemplar, por ejemplo, teniendo en cuenta la oscilación que se sabe que se tolera en la tercera posición de los codones de ARN, pero que codifica el mismo aminoácido como un codón de ARN diferente (véase Stothard P, *Biotechniques* 28: 1102-4 (2000)).

15

[0135] En un aspecto, la invención proporciona un ácido nucleico que codifica una proteína de unión a CD20 de la invención o un complemento de la misma. El ácido nucleico puede incluir, por ejemplo, una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido al menos un 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 99 % o más, idéntico a un polipéptido que comprende una de las secuencias de aminoácidos de la proteína de unión a CD20. La descripción también incluye polinucleótidos que comprenden secuencias de nucleótidos que se hibridan en condiciones rigurosas con un polinucleótido que codifica una proteína de unión a CD20 de la invención, o un fragmento o derivado de la misma, o el antisentido o complemento de cualquiera de tales secuencias.

20

[0136] Los derivados o análogos de los polinucleótidos (o proteínas de unión a CD20) de la invención incluyen, entre otros, moléculas de polinucleótidos (o polipéptidos) que tienen regiones que son sustancialmente homólogas a los polinucleótidos o proteínas de unión a CD20 de la invención, por ejemplo, en al menos aproximadamente un 45 %, 50 %, 70 %, 80 %, 95 %, 98 % o incluso un 99 % de identidad (con una identidad preferida del 80-99 %) sobre un polinucleótido o secuencia de polipéptidos del mismo tamaño, o en comparación con una secuencia alineada en la que el alineamiento se realiza mediante un programa de homología informático conocido en la técnica. Un programa ejemplar es el programa GAP (Wisconsin Sequence Analysis Package, Versión 8 para UNIX, Genetics Computer Group, University Research Park, Madison, WI, EE.UU.) usando la configuración predeterminada, que usa el algoritmo de Smith T, Waterman M, *Adv. Appl. Math.* 2: 482-9 (1981). También se incluyen polinucleótidos capaces de hibridarse con el complemento de una secuencia que codifica las proteínas de la invención en condiciones rigurosas (véase, por ejemplo, Ausubel F, et al., *Current Protocols in Molecular Biology* (John Wiley & Sons, Nueva York, NY, EE.UU., 1993)), y a continuación. Los expertos en la técnica conocen condiciones rigurosas y se pueden encontrar en *Current Protocols in Molecular Biology* (John Wiley & Sons, NY, EE.UU., Cap. Sec. 6.3.1-6.3.6 (1989)).

35

[0137] Además, la presente invención proporciona además vectores de expresión que comprenden el ácido nucleico dentro del alcance de la invención. Los polinucleótidos capaces de codificar las proteínas de unión a CD20 de la invención pueden insertarse en vectores conocidos, incluyendo plásmidos bacterianos, vectores virales y vectores de fagos, usando material y procedimientos bien conocidos en la técnica para producir vectores de expresión. Dichos vectores de expresión incluirán los polinucleótidos necesarios para soportar la producción de proteínas de unión a CD20 contempladas dentro de cualquier célula huésped elegida o sistemas de expresión sin células (por ejemplo, pTxb1 y pIVEX.2.3 descritos en los Ejemplos a continuación). Los polinucleótidos específicos que comprenden vectores de expresión para su uso con tipos específicos de células huésped o sistemas de expresión sin células se conocen bien por un experto habitual en la técnica, pueden determinarse usando una experimentación rutinaria, o pueden adquirirse.

40

[0138] El término "vector de expresión", como se usa en esta invención, se refiere a un polinucleótido, lineal o circular, que comprende una o más unidades de expresión. El término "unidad de expresión" representa un segmento polinucleotídico que codifica un polipéptido de interés y es capaz de proporcionar la expresión del segmento de ácido nucleico en una célula huésped. Una unidad de expresión comprende típicamente un promotor de transcripción, un marco de lectura abierto que codifica el polipéptido de interés, y un terminador de la transcripción, todos en configuración operativa. Un vector de expresión contiene una o más unidades de expresión. Por lo tanto, en el contexto de la presente invención, un vector de expresión que codifica una proteína de unión a CD20 que comprende una cadena de polipéptidos única (por ejemplo, un scFv unido a una región efectora de toxina Shiga) incluye al menos una unidad de expresión para la cadena de polipéptidos única, mientras que una proteína de unión a CD20 que comprende, por ejemplo, dos o más cadenas de polipéptidos (por ejemplo, una cadena que comprende un dominio V_L y una segunda cadena que comprende un dominio V_H unidas a una región efectora de toxina) incluye al menos dos unidades de expresión, una para cada una de las dos cadenas de polipéptidos de la proteína de unión a CD20. Para la expresión de proteínas de unión a CD20 multicatenarias, una unidad de expresión para cada cadena de polipéptidos también puede estar contenida por separado en diferentes vectores de expresión (por ejemplo, la expresión puede lograrse con una única célula huésped en la que se han introducido vectores de expresión para cada cadena de polipéptidos).

60

[0139] Los vectores de expresión capaces de dirigir la expresión transitoria o estable de polipéptidos y proteínas

65

se conocen bien en la técnica. Los vectores de expresión generalmente incluyen, pero sin limitación, uno o más de los siguientes: una secuencia o péptido señal heterólogo, un origen de replicación, uno o más genes marcadores, un elemento potenciador, un promotor, y una secuencia de terminación de la transcripción, cada uno de los cuales se conoce bien en la técnica. Se conocen en la técnica secuencias de control regulatorias opcionales, secuencias de integración, y marcadores útiles que pueden emplearse.

[0140] El término "célula huésped" se refiere a una célula que puede soportar la replicación o expresión del vector de expresión. Las células huésped pueden ser células procariotas, tales como células de *E. coli* o eucariotas (por ejemplo, células de levadura, insecto, anfibio, ave o mamífero). La creación y el aislamiento de líneas celulares huésped que comprenden un ácido nucleico de la invención o que son capaces de producir una proteína de unión a CD20 de la invención, se pueden lograr usando técnicas estándar conocidas en la técnica.

[0141] Las proteínas de unión a CD20 dentro del alcance de la presente invención pueden ser variantes o derivados de las proteínas de unión a CD20 descritas en esta invención que se producen modificando el polinucleótido que codifica una proteína de unión a CD20 alterando uno o más aminoácidos, o eliminando o insertando uno o más aminoácidos que pueden hacerlo más adecuado para lograr las propiedades deseadas, tal como una expresión más óptima por parte de una célula huésped.

Procedimientos para usar una proteína de unión a CD20 o una composición farmacéutica de la invención

[0142] Generalmente, es un objeto de la invención proporcionar agentes farmacológicamente activos, así como composiciones que comprendan los mismos, que puedan usarse en la prevención y/o tratamiento de enfermedades, trastornos y afecciones, tales como cánceres, tumores, trastornos inmunitarios, o afecciones patológicas adicionales mencionadas en esta invención. Por consiguiente, la presente invención proporciona procedimientos *in vitro* para usar las proteínas de unión a CD20 de la invención para la destrucción de células que expresan CD20, y el suministro de materiales exógenos adicionales en células que expresan CD20. La invención también proporciona el tratamiento de enfermedades, trastornos y afecciones como se describe en esta invención.

[0143] En particular, es un objeto de la invención proporcionar dichos agentes, composiciones y/o procedimientos farmacológicamente activos que tienen ciertas ventajas en comparación con los agentes, composiciones y/o procedimientos que se conocen actualmente en la técnica. Por consiguiente, la presente invención proporciona procedimientos como se definen en las reivindicaciones de uso de proteínas de unión a CD20 con secuencias de polipéptidos especificadas y composiciones farmacéuticas de las mismas. Por ejemplo, cualquiera de las secuencias de polipéptidos en las SEQ ID NOS:1, 3, 4, 6-12, 14, 16 y/o 18-29, puede utilizarse específicamente como un componente de la proteína de unión a CD20 utilizada en los siguientes procedimientos.

[0144] La presente invención proporciona procedimientos *in vitro* para destruir una célula que expresa CD20 que comprende la etapa de poner en contacto la célula, con una proteína de unión a CD20 de la presente invención, como se define en las reivindicaciones. En determinadas realizaciones, se puede usar una proteína de unión a CD20 o una composición farmacéutica de la presente invención para destruir células que expresan CD20 en una mezcla de diferentes tipos de células que incluyen células que no expresan CD20, tales como mezclas que comprenden células cancerosas, células infectadas y/o células hematológicas.

[0145] En determinadas realizaciones, puede usarse una proteína de unión a CD20 o composición farmacéutica de la presente invención para destruir células cancerosas en una mezcla de diferentes tipos de células, tal como en un organismo. En determinadas realizaciones, una proteína de unión a CD20 o composición farmacéutica de la presente invención, en solitario o en combinación con otros compuestos o composiciones farmacéuticas puede mostrar una potente actividad de destrucción celular cuando se administra a una población de células, *in vitro* o *in vivo* en un sujeto como en un paciente que necesita tratamiento. Al dirigir el suministro de regiones de toxina Shiga enzimáticamente activas utilizando regiones de unión de tipo de inmunoglobulina de alta afinidad a CD20, esta potente actividad de destrucción celular puede restringirse para destruir específica y selectivamente ciertos tipos de células en un organismo, tales como células cancerosas, células neoplásicas, células malignas, células tumorales no neoplásicas, o células infectadas.

[0146] Los términos "célula de cáncer" o "célula cancerosa" se refieren a varias células neoplásicas que crecen y se dividen de manera anormalmente acelerada y serán evidentes para el experto en la técnica. El término "célula cancerosa" incluye tanto células neoplásicas como no neoplásicas. Generalmente, los cánceres y/o tumores se pueden definir como enfermedades, trastornos o afecciones susceptibles de tratamiento y/o prevención. Los cánceres y tumores (ya sean neoplásicos o no neoplásicos) que están compuestos por células cancerosas y/o células tumorales serán evidentes para el experto en la técnica.

[0147] La presente descripción proporciona un procedimiento para destruir una célula que expresa CD20 en un paciente, comprendiendo el procedimiento la etapa de administrar al paciente al menos una proteína de unión a CD20 de la presente invención o una composición farmacéutica de la misma.

65

[0148] Determinadas realizaciones de la proteína de unión a CD20 o composiciones farmacéuticas de la misma pueden usarse para destruir una célula inmune que expresa CD20 (ya sea sana o neoplásica) en un paciente.

[0149] Está dentro del alcance de la presente invención utilizar la proteína de unión a CD20 de la invención o la composición farmacéutica de la misma para los fines del agotamiento *ex vivo* de linfocitos B de poblaciones de células aisladas extraídas de un paciente.

[0150] Adicionalmente, la presente descripción proporciona un procedimiento para tratar una enfermedad, trastorno o afección en un paciente que comprende la etapa de administrar a un paciente que lo necesite una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos una de las proteínas de unión a CD20 de la presente invención, o una composición farmacéutica de las mismas. Las enfermedades, trastornos y afecciones que se contemplan que se pueden tratar con este procedimiento incluyen cánceres, tumores neoplásicos, tumores no neoplásicos y trastornos inmunitarios. La administración de una "dosificación terapéuticamente eficaz" de un compuesto de la invención puede dar como resultado una disminución de la gravedad de los síntomas de la enfermedad, un aumento en la frecuencia y duración de los periodos sin síntomas de la enfermedad, o una prevención del deterioro o discapacidad debido a la afectación de la enfermedad.

[0151] La cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de la presente invención dependerá de la vía de administración, el tipo de mamífero que se está tratando, y las características físicas del paciente específico en consideración. Estos factores y su relación para determinar esta cantidad se conocen bien por los profesionales expertos en la técnica médica. Esta cantidad y el procedimiento de administración pueden adaptarse para lograr una eficacia óptima, y pueden depender de factores tales como el peso, la dieta, la medicación concurrente y otros factores, bien conocidos por los expertos en la técnica médica. Los tamaños de dosificación y el régimen de dosificación más apropiados para uso humano pueden guiarse por los resultados obtenidos por la presente invención, y pueden confirmarse en ensayos clínicos diseñados adecuadamente. Se puede determinar un protocolo eficaz de dosificación y tratamiento por medios convencionales, partiendo de una dosis baja en animales de laboratorio y aumentando a continuación la dosis mientras se monitorizan los efectos, y también variando sistemáticamente el régimen de dosificación. Un médico puede tener en cuenta numerosos factores al determinar una dosificación óptima para un sujeto determinado. Dichas consideraciones se conocen por el experto en la técnica.

[0152] Una vía de administración aceptable puede referirse a cualquier ruta de administración conocida en la técnica, incluyendo, pero sin limitación, aerosol, enteral, nasal, oftálmica, oral, parenteral, rectal, vaginal o transdérmica (por ejemplo, administración tópica de una crema, gel o pomada, o por medio de un parche transdérmico). La "administración parenteral" típicamente se asocia con la inyección en o en comunicación con el sitio de acción previsto, incluyendo la administración de inyección intratumoral, infraorbital, infusión, intraarterial, intracapsular, intracardiaca, intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intrapulmonar, intraespinal, intraesternal, intratecal, intrauterina, intravenosa, subaracnoidea, subcapsular, subcutánea, transmucosa o transtraqueal.

[0153] Para la administración de una composición farmacéutica de la invención, el intervalo de dosificación generalmente será de aproximadamente 0,0001 a 100 miligramos por kilogramo (mg/kg), y más habitualmente de 0,01 a 5 mg/kg, del peso corporal del huésped. Las dosificaciones ejemplares pueden ser de 0,25 mg/kg de peso corporal, 1 mg/kg de peso corporal, 3 mg/kg de peso corporal, 5 mg/kg de peso corporal, o 10 mg/kg de peso corporal o dentro del intervalo de 1-10 mg/kg. Un régimen de tratamiento ejemplar es una administración una o dos veces al día, o una administración una o dos veces a la semana, una vez cada dos semanas, una vez cada tres semanas, una vez cada cuatro semanas, una vez al mes, una vez cada dos o tres meses, o una vez cada tres a 6 meses. Las dosificaciones pueden seleccionarse y reajustarse por el profesional de la salud cualificado según sea necesario para maximizar el beneficio terapéutico para un paciente en particular.

[0154] Las composiciones farmacéuticas de la invención se administrarán típicamente al mismo paciente en múltiples ocasiones. Los intervalos entre dosis únicas pueden ser, por ejemplo, 2-5 días, semanalmente, mensualmente, cada dos o tres meses, cada seis meses, o anualmente. Los intervalos entre administraciones también pueden ser irregulares, en función de la regulación de los niveles en sangre u otros marcadores en el sujeto o paciente. Los regímenes de dosificación para un compuesto de la invención incluyen la administración intravenosa de 1 mg/kg de peso corporal o 3 mg/kg de peso corporal con el compuesto administrado cada dos a cuatro semanas durante seis dosificaciones, a continuación, cada tres meses a 3 mg/kg de peso corporal o 1 mg/kg de peso corporal.

[0155] Una composición farmacéutica de la presente invención puede administrarse a través de una o más vías de administración, usando una o más de una diversidad de procedimientos conocidos en la técnica. Como apreciará el experto en la técnica, la vía y/o el modo de administración variarán dependiendo de los resultados deseados. Las vías de administración para proteínas de unión a CD20 o composiciones farmacéuticas de la invención incluyen, por ejemplo, las vías de administración intravenosa, intramuscular, intradérmica, intraperitoneal, subcutánea, espinal u otras vías parenterales, por ejemplo, por inyección o infusión en comunicación con el sitio de acción previsto (por ejemplo, inyección intratumoral). En otras realizaciones, una proteína de unión a CD20, o composición farmacéutica de la invención, puede administrarse por una vía no parenteral, tal como una vía de administración tópica, epidérmica o mucosa, por ejemplo, por vía intranasal, oral, vaginal, rectal, sublingual, o tópica.

[0156] Las proteínas terapéuticas de unión a CD20 o las composiciones farmacéuticas de la invención pueden administrarse con uno o más de una diversidad de dispositivos médicos conocidos en la técnica. Por ejemplo, en una realización, una composición farmacéutica de la invención puede administrarse con un dispositivo de inyección hipodérmica sin aguja. Se encuentran en la técnica ejemplos de implantes y módulos bien conocidos útiles en la presente invención, incluyendo, por ejemplo, bombas de microinfusión implantables para administración de velocidad controlada; dispositivos para administración a través de la piel; bombas de infusión para administración a una velocidad de infusión precisa; dispositivos de infusión implantables de flujo variable para administración continua de fármacos; y sistemas de administración de fármacos osmóticos. Estos y otros implantes, sistemas de administración, y módulos de este tipo se conocen por los expertos en la técnica.

[0157] Una proteína de unión a CD20 o composición farmacéutica de la presente invención puede administrarse en solitario o en combinación con uno o más de otros agentes terapéuticos o de diagnóstico. Una terapia de combinación puede incluir una proteína de unión a CD20 de la invención o una composición farmacéutica de la misma combinada con al menos otro agente terapéutico seleccionado en función del paciente particular, enfermedad o afección a tratar. Los ejemplos de otros agentes incluyen, entre otros, un agente citotóxico, anticanceroso o quimioterapéutico, un agente antiinflamatorio o antiproliferativo, un agente antimicrobiano o antiviral, factores de crecimiento, citocinas, un analgésico, una molécula pequeña o polipéptido terapéuticamente activo, un anticuerpo monocatenario, un anticuerpo clásico o fragmento del mismo, o una molécula de ácido nucleico que modula una o más rutas de señalización, y productos terapéuticos de modulación similares que podrían complementarse o ser beneficiosos en un régimen de tratamiento terapéutico o profiláctico.

[0158] El tratamiento de un paciente con determinadas realizaciones de las proteínas de unión a CD20 o composiciones farmacéuticas de la presente invención conducirá a la muerte celular de las células diana y/o la inhibición del crecimiento de las células diana. Como tal, las proteínas de unión a CD20 de la invención, y las composiciones farmacéuticas que las comprenden, serán útiles en procedimientos para tratar una diversidad de trastornos patológicos en los que destruir o agotar las células diana podría ser beneficioso, tal como, entre otros, cáncer, trastornos inmunitarios, y células infectadas. La presente descripción proporciona procedimientos para suprimir la proliferación celular y tratar trastornos celulares, incluyendo neoplasia y linfocitos B hiperactivos.

[0159] En determinadas realizaciones, las proteínas de unión a CD20 y las composiciones farmacéuticas de la invención pueden usarse para tratar o prevenir cánceres, tumores (neoplásicos y no neoplásicos) y trastornos inmunitarios.

[0160] En determinadas realizaciones, la presente descripción proporciona procedimientos para tratar tumores malignos o neoplasias y otros cánceres asociados a células sanguíneas en un sujeto mamífero, tal como un ser humano, comprendiendo el procedimiento la etapa de administrar a un sujeto que lo necesita una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína de unión a CD20 o composición farmacéutica de la invención.

[0161] Las proteínas de unión a CD20 y las composiciones farmacéuticas de la invención tienen diversas aplicaciones, incluyendo, por ejemplo, usos como agentes antineoplásicos, usos en la modulación de respuestas inmunitarias, usos en la purga de tejidos de trasplante de tipos de células no deseadas, y usos como agentes de diagnóstico. Las proteínas de unión a CD20 y las composiciones farmacéuticas de la presente invención son comúnmente agentes antineoplásicos, lo que significa que son capaces de tratar y/o prevenir el desarrollo, maduración o propagación de células neoplásicas o malignas al inhibir el crecimiento y/o causar la muerte de cáncer o células tumorales.

[0162] En determinadas realizaciones, una proteína de unión a CD20 o composición farmacéutica de la presente invención puede usarse para tratar una enfermedad o trastorno mediado por linfocitos B, tales como, por ejemplo, leucemia, linfoma, mieloma, amiloidosis, espondilitis anquilosante, asma, enfermedad de Crohn, diabetes, rechazo de injerto, enfermedad de injerto contra huésped, tiroiditis de Hashimoto, síndrome urémico hemolítico, enfermedad relacionada con VIH, lupus eritematoso, esclerosis múltiple, poliarteritis, psoriasis, artritis psoriásica, artritis reumatoide, esclerodermia, choque séptico, síndrome de Sjogren, colitis ulcerosa y vasculitis.

[0163] Las proteínas de unión a CD20 y las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden usarse en un procedimiento para tratar el cáncer que comprende administrar a un paciente, que lo necesite, una cantidad terapéuticamente eficaz de la proteína de unión a CD20 o una composición farmacéutica de la presente invención. Algunos cánceres que muestran tener la expresión de CD20 incluyen, pero sin limitación, linfomas de linfocitos B (incluyendo no Hodgkin y Hodgkin), leucemia de células pilosas, leucemia linfocítica crónica de linfocitos B, algunos linfomas de linfocitos T, y células madre de cáncer de melanoma. En determinadas realizaciones de los procedimientos de la presente invención, el cáncer que se trata se selecciona del grupo que consiste en cáncer de hueso, leucemia, linfoma, melanoma y mieloma.

[0164] Las proteínas de unión a CD20 y las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden usarse en un procedimiento para tratar un trastorno inmunitario que comprende administrar a un paciente, que lo

necesite, una cantidad terapéuticamente eficaz de la proteína de unión a CD20 o una composición farmacéutica de la presente invención. En determinadas realizaciones de la presente invención, el trastorno inmunitario está relacionado con una inflamación asociada con una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en amiloidosis, espondilitis anquilosante, asma, enfermedad de Crohn, diabetes, rechazo de injerto, enfermedad de injerto contra huésped, 5 tiroiditis de Hashimoto, síndrome urémico hemolítico, enfermedad relacionada con VIH, lupus eritematoso, esclerosis múltiple, poliarteritis, psoriasis, artritis psoriásica, artritis reumatoide, esclerodermia, choque séptico, síndrome de Sjogren, colitis ulcerosa y vasculitis.

[0165] Entre determinadas realizaciones de la presente invención se encuentra una proteína de unión a CD20 10 como componente de un medicamento para su uso en el tratamiento o prevención de un cáncer, tumor o trastorno inmunitario. Por ejemplo, los trastornos inmunitarios que se presentan en la piel de un paciente pueden tratarse con tal medicamento en un esfuerzo por reducir la inflamación.

[0166] Más allá de las proteínas de unión a CD20 de la presente invención, el ácido nucleico que codifica dichas 15 moléculas está dentro del alcance de la presente invención. El término "polinucleótidos" es equivalente al término "ácidos nucleicos", ambos de los cuales incluyen polímeros de ácidos desoxirribonucleicos y ácidos ribonucleicos. Dichos polinucleótidos se describen específicamente para incluir todos los polinucleótidos capaces de codificar una proteína de unión a CD20 especificada, por ejemplo, teniendo en cuenta la oscilación que se sabe que se tolera en la 20 tercera posición de los codones de aminoácidos, pero que codifica un aminoácido equivalente. Además, la presente invención comprende vectores de expresión que comprenden los polinucleótidos dentro del alcance de la invención. Dichos vectores de expresión incluirán los polinucleótidos necesarios para soportar la producción de las proteínas de unión a CD20 de la invención dentro de cualquier célula huésped de elección. Los polinucleótidos específicos que comprenden vectores de expresión para su uso con tipos específicos de células huésped se conocen bien por un 25 experto habitual en la técnica, pueden determinarse usando una experimentación rutinaria, o pueden adquirirse.

[0167] La presente invención también proporciona procedimientos *in vitro* para internalizar la proteína de unión a CD20 en el interior de una célula en menos de seis horas, poniendo en contacto la célula con una proteína de unión a CD20 de la invención, como se define en las reivindicaciones. La presente invención proporciona además 30 procedimientos *in vitro* para destruir una célula que expresa CD20, donde esa célula expresa un antígeno CD20 en su superficie, poniendo en contacto la célula con una proteína de unión a CD20 de la invención, como se define en las reivindicaciones.

[0168] Si las proteínas de unión a CD20 de la presente invención comprenden o están conjugadas con material exógeno, como se ha descrito anteriormente, estas proteínas de unión a CD20 pueden utilizarse en un procedimiento 35 para suministrar ese material exógeno a una célula diana que expresa un antígeno CD20 en su superficie celular. La presente invención también proporciona procedimientos *in vitro* para suministrar materiales exógenos en el interior de una célula que expresa CD20, poniendo en contacto la célula con una proteína de unión a CD20 de la invención, como se define en las reivindicaciones.

[0169] Además, las proteínas de unión a CD20 de la invención pueden ser para su uso en un procedimiento 40 para tratar el cáncer, en el que la célula tumoral o cancerosa expresa en su superficie un antígeno CD20, cuyo procedimiento comprende administrar la proteína de la presente invención a un paciente que necesita dicho tratamiento. Algunos cánceres que muestran tener la expresión de CD20 incluyen, pero sin limitación, linfomas de linfocitos B (incluyendo no Hodgkin y Hodgkin), leucemia de células pilosas, leucemia linfocítica crónica de linfocitos 45 B, algunos linfomas de linfocitos T, y células madre de cáncer de melanoma.

[0170] Para los fines de la presente invención, el término "linfoma" incluye linfomas de linfocitos B (tales como los tipos no Hodgkin y Hodgkin), leucemia de células pilosas, leucemia linfocítica crónica de linfocitos B, linfomas de 50 linfocitos T, y linfomas de tipo de células madre de cáncer de melanoma.

[0171] A continuación se encuentran determinadas realizaciones de la descripción, numeradas 1-40 y haciendo referencia a la Tabla C para secuencias biológicas: (1) Una proteína de unión a CD20 para la internalización del 55 antígeno CD20 en una célula, en la que la proteína comprende una región de unión específica para CD20 y una región efectora de toxina derivada de la toxina 1 tipo Shiga (SLT-1), en la que la proteína induce una rápida internalización de CD20 presente en la superficie de la célula. (2) La proteína de unión a CD20 de la realización 1, en la que la proteína induce la internalización de CD20 en una célula de linaje de linfocitos B en menos de aproximadamente una hora. (3) La proteína de unión a CD20 de la realización 1, en la que la región efectora de toxina comprende los aminoácidos 75 a 251 de NO: 1 (véase la Tabla C). (4) La proteína de unión a CD20 de la realización 1, en la que la 60 región efectora de toxina comprende los aminoácidos 1 a 251 de NO:1. (5) La proteína de unión a CD20 de la realización 1, en la que la región efectora de toxina comprende los aminoácidos 1 a 261 de NO:1. (6) La proteína de unión a CD20 de la realización 1, en la que la proteína es citotóxica.

(7) La proteína de unión a CD20 de la realización 1, en la que la región de unión a CD20 se selecciona del grupo que consiste en un fragmento Fab, un fragmento F(ab')₂, un fragmento Fd, un fragmento Fv, un fragmento dAb, un scFv, un diacuerpo, un péptido CDR3, un péptido FR3-CDR3-FR4 restringido, un nanobody®, un nanobody® bivalente, 65 productos inmunofarmacéuticos modulares pequeños (SMIP™), un dominio de IgNAR variable de tiburón, un

- minicuerpo, y cualquier fragmento o equivalente química o genéticamente manipulado que conserve la función de unión a CD20. (8) La proteína de unión a CD20 de la realización 1, en la que la región de unión es un scFv.
- (9) La proteína de unión a CD20 de la realización 8, en la que la región de unión comprende (A) (i) un dominio variable de cadena pesada (VH) que comprende las secuencias de aminoácidos de HCDR1, HCDR2, HCDR3 como se muestra en NO:6, NO:7, y NO:8, respectivamente, y (ii) un dominio variable de cadena ligera (VL) que comprende las secuencias de aminoácidos de LCDR1, LCDR2, y LCDR3 como se muestra en NO:9, NO:10, y NO:11, respectivamente; o (B) (i) un dominio variable de cadena pesada (VH) que comprende las secuencias de aminoácidos de HCDR1, HCDR2, y HCDR3 como se muestra en NO:21, NO:22, y NO:23, respectivamente, y (ii) un dominio variable de cadena ligera (VL) que comprende las secuencias de aminoácidos de LCDR1, LCDR2, y LCDR3 como se muestra en NO:24, NO:10, y NO:11, respectivamente.
- (10) La proteína de unión a CD20 de la realización 8, en la que la región de unión a CD20 comprende los aminoácidos 2 a 245 de NO:4. (11) La proteína de unión a CD20 de la realización 1, en la que la región de unión a CD20 comprende los aminoácidos 2 a 245 de NO: 4 y la región efectora de toxina comprende los aminoácidos 75 a 251 de NO:1. (12) La proteína de unión a CD20 de la realización 1, que comprende NO:4. (13) Una proteína de unión a CD20 para destruir una célula que expresa CD20 en su superficie, en la que la región de unión comprende un dominio variable de cadena pesada (VH) que comprende las secuencias de aminoácidos de HCDR1, HCDR2, y HCDR3 como se muestra en NO:6, NO:7, y NO:8, respectivamente, y un dominio variable de cadena ligera (VL) que comprende las secuencias de aminoácidos de LCDR1, LCDR2, y LCDR3 como se muestra en NO:9, NO:10, y NO:11, respectivamente, por lo que, tras la administración, la proteína es capaz de destruir una célula que expresa CD20 en su superficie.
- (14) La proteína de unión a CD20 de la realización 13, en la que la región de unión a CD20 comprende los aminoácidos 2 a 245 de NO:4. (15) La proteína de unión a CD20 de la realización 13, en la que la región de unión a CD20 comprende los aminoácidos 2 a 245 de NO: 4 y la región efectora de toxina comprende los aminoácidos 75 a 251 de NO: 1. (16) La proteína de unión a CD20 de la realización 13, que comprende NO:4.
- (17) Una proteína de unión a CD20 para el suministro de material exógeno a la célula que expresa CD20 en su superficie, en la que la proteína comprende una región de unión específica para CD20, una región efectora de toxina en la que dicha región efectora de toxina se deriva de la toxina 1 tipo Shiga (SLT-1), y el material exógeno, por lo que, tras la administración, la proteína es capaz de suministrar el material exógeno en una célula que expresa CD20 en su superficie.
- (18) La proteína de unión a CD20 de la realización 17, en la que la región de unión comprende (A) (i) un dominio variable de cadena pesada (VH) que comprende las secuencias de aminoácidos de HCDR1, HCDR2, HCDR3 como se muestra en NO:6, NO:7, y NO:8, respectivamente, y (ii) un dominio variable de cadena ligera (VL) que comprende las secuencias de aminoácidos de LCDR1, LCDR2, y LCDR3 como se muestra en NO:9, NO:10, y NO:11, respectivamente; o (B) (i) un dominio variable de cadena pesada (VH) que comprende las secuencias de aminoácidos de HCDR1, HCDR2, y HCDR3 como se muestra en NO:21, NO:22, y NO:23, respectivamente, y (ii) un dominio variable de cadena ligera (VL) que comprende las secuencias de aminoácidos de LCDR1, LCDR2, y LCDR3 como se muestra en NO:23, NO:10, y NO:11, respectivamente.
- (19) La proteína de unión a CD20 de la realización 18, en la que el material exógeno se selecciona del grupo que consiste en un péptido, una proteína y un ácido nucleico. (20) La proteína de unión a CD20 de la realización 19, en la que el material exógeno es un péptido y el péptido es un antígeno. (21) La proteína de unión a CD20 de la realización 20, en la que el antígeno está codificado entre la región de unión y la región efectora de toxina de la proteína. (22) La proteína de unión a CD20 de la realización 19, en la que el antígeno se deriva de una proteína viral. (23) La proteína de unión a CD20 de la realización 21, en la que el antígeno es NO:2. (24) La proteína de unión a CD20 de la realización 21 que comprende NO:5. (25) La proteína de unión a CD20 de la realización 20, en la que el antígeno se deriva de una proteína bacteriana. (26) La proteína de unión a CD20 de la realización 20, en la que el antígeno se deriva de una proteína mutada en cáncer. (27) La proteína de unión a CD20 de la realización 20, en la que el antígeno se deriva de una proteína expresada de forma aberrante en cáncer. (28) La proteína de unión a CD20 de la realización 20, en la que el antígeno se deriva de una región CDR de linfocitos T.
- (29) La proteína de unión a CD20 de la realización 19, en la que el material exógeno es una proteína. (30) La proteína de unión a CD20 de la realización 29, en la que la proteína es una enzima. (31) La proteína de unión a CD20 de la realización 19, en la que el material exógeno es un ácido nucleico. (31) La proteína de unión a CD20 de la realización 30, en la que el ácido nucleico es un siARN. (32) Un polinucleótido que codifica la proteína de unión a CD20 de la realización 1. (33) Un vector de expresión que comprende el polinucleótido de la realización 32. (34) Una célula huésped que comprende el vector de expresión de la realización 33. (35) Un procedimiento para internalizar rápidamente el antígeno CD20 en la célula de un paciente, comprendiendo el procedimiento la etapa de administrar al paciente una proteína de cualquiera de las realizaciones 1-12. (36) Un procedimiento para destruir una célula en un paciente que expresa el antígeno CD20 en su superficie, comprendiendo el procedimiento la etapa de administrar a un paciente una proteína de cualquiera de las realizaciones 1-16. (37) Un procedimiento para suministrar material exógeno en una célula de un paciente que expresa CD20 en su superficie, comprendiendo el procedimiento la etapa de administrar al paciente una proteína de cualquiera de las realizaciones 17-31. (39) Un procedimiento para tratar el cáncer en un paciente, en el que el cáncer expresa en el tumor o en la superficie de la célula cancerosa un antígeno CD20, comprendiendo el procedimiento la etapa de administrar al paciente una proteína de cualquiera de las realizaciones 1-31. (40) El procedimiento de la realización 39, en el que el cáncer es linfoma.

TABLA C. Secuencias a las que se hace referencia en las realizaciones 1-40

Número	Descripción del texto	Secuencia
NO:1	Polipéptido de subunidad SLT-1A	KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLMIDSGSG DNLFAVDVRGIDPEEGFNRLRIVERNNLYVTGFVNRTNNVFYR FASHVTFPGTTAVTLSGDSSYTTLQRVAGISRTGMQINRHSLTTS YLDLMSHSGTSLTQSVARAMLRFVTVTAELRFRQIQRGFRTTL DDLGRSYVMTAEDVDLTLNWGRLSSVLPDYHGQDSVRVGRIS FGSINAILGSVALILNCHHHARVARMASDEFPSMCPADGRVRGIT HNKILWDSSTLGAILMRRTISS
NO:2	Polinucleótido de subunidad SLT-1A (consenso)	aargarttyacnytngayttywswnacngcnaaracntaygtngaywsnytnaaygnathmgnw sngcnathggnacncnytnacacnathwsnwsngnggnacnwsnytnatgathgayw snggnwsngngayaaytnttygcngtngaytnmngngnathgayccngargarggnmgn ttaaayaaytnmgnynathgtnarmgnaayaaytntaygnacngnttygtnaaymgn cnaayaaygtnttyaymgnnttygcngayttywswncaygnacnttyccngnacnacngn acnytnwsngngaywsnwsntayacnacnytnacarmngntngcngnathwsnmgncn ggnatgcarathaaymgnacaywsnytnacnacnwsntayytngayytngatgwsncaywsngg nacnwsnytnacncarwsngtnngcnmngcnatgytnmgnnttygnacngnacngcngargc nytnmgnntymgnacatharmngngnttymgnacnacnytngayaytnwsnggnmgn wntaygnatgacngcngargaygtngaytnacnytnaaytgggngmgnynwsnwsngtn ytnccngaytaycayggncargaywsngtnmngntnggnmgnathwsnttyggnwsnathaa ygcnathytnggnwsngtnnytnathytnaaytgycaycaycaycgnwsnmgntngcnmg natggcnwsngaygarttyccnwsnatgtgyccngcngayggmngntngmngngnathacnc ayaayaarathytntggaywsnwsnacnytnggngcnathytnatgmngmgnacnathwsn wsn
NO:3	Matrix 58-66 de influenza	GILGFVFTL
NO:4	Polipéptido MT-3724	QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKTSGYTFSTSYNVHWVKQTPG QGLEWIGAIYPGNGDTSFNQKFKGKATLTADKSSSTVYMQLSL TSEDSAVYYCARSNYYGSSYVWFFDVGAGTTVTVSSGSTSGS GKPGSGEGSQIVLSQSPTILSASPGEKVTMTCRASSSVSYMDWY QQKPGSSPKPWYATSNLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISRVEAE DAATYYCQQWISNPPTFGAGTKLELKEFPKSTPPGSSGGAPKEF TLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLMIDSGSGDNL FAVDVRGIDPEEGRFNRLRIVERNNLYVTGFVNRTNNVFYRFAD FSHVTFPGTTAVTLSGDSSYTTLQRVAGISRTGMQINRHSLTTSY LDLMSHSGTSLTQSVARAMLRFVTVTAELRFRQIQRGFRTTL DLGRSYVMTAEDVDLTLNWGRLSSVLPDYHGQDSVRVGRISF GSINAILGSVALILNCHHHASRVAR

(continuación)

Número	Descripción del texto	Secuencia
NO:5	Polinucleótido MT-3724 de consenso	<p>cargtncarytncarcarcngngngarytngttnaarccngngcnwsngttnaaratgwsntg yaaracnwsnggntayaacnttyacnwsntayaaygtncaytggttnaaracaracncnggncarg gnytngartggathggngcnathtayccnggnaayggngayacnwsnttyaaycaraarttyaarg gnaargcnacnytnacngcngayaarwsnwsnwsnacngtntayatgcarytnwsnwsnytna cnwsngargaywsngcngtntaytaytgygcnmgnwsnaaytaytaygggnwsnwsntaygt tggtytgyaygtntgggngcngggnacnacngtnacngtnwsnwsnggnwsnacsngg nwsnggnaarccnggnwsnggngarggnwsncarathgtnytnwsncarwsnccnacnathy tnwsngcnwsnccngngaraargtnacnatacngtgmgnwsnwsnwsngttnwsnta yatggaytggtaycarcaraarccnggnwsnwsnccnaarccntggathtaygcnacnwsnaay ytngcnwsnggngtncngcnmgnttywsnggnwsnggnwsnggnacnwsntaywsnytn acnathwsnmngtngargcngargaygcngcnacntaytaytgcrcartggathwsnaayc cncnacnttyggngcngggnacnaarytngarytnaargarttyccnaarccnwsnacncncn gggnwsnwsnggngcncnaargarttyacnytnaytytwsnacngcnaaracntaygtng aywsnytnaaygtathmgnwsngcnathgggnacncnytnaracnathwsnwsnggngg nacnwsnytnatgathgaywsnggnwsnggnayaaytnttygcngtngaygtmngng gnathgayccngargarggnmgnttyaayaaytnmgnynathgtnarmgnaayaaytnt aygtnacngnttygtnaaymgnacnaayaaygtnttyaymngnttygcngaytytwsncaygt nacnttycngggnacnacngcngtnacnytnwsnggngaywsnwsntayacnacnytnacm ngtngcnggnathwsnmgnacnggnatgcarathaaymgnacaywsnytnacnacnwsnta yytngaytntatgwsncaywsnggnacnwsnytnacncarwsngtngcnmgngcnatgytn mgnttygtnacngtnacngcngargcnytnmgnttymgncarathcarmnggnttymgnac nacnytngaygaytnwsnggnmgnwsntaygtntatgacngcngargaygtngaytnacny naaytgggngmgnynwsnwsngtntnccngaytaycayggncargaywsngtnmgngtn ggngmgnathwsnttygggnwsnathaaaygnathytnggnwsngtngcnytnathytnaaytgy caycaycaygcnwsnmngngtngcnmgn</p>
NO:6	CDR1 de cadena pesada	GYTFTSYNVH
NO:7	CDR2 de cadena pesada	AIYPGNGDTSFNQKFKG
NO:8	CDR3 de cadena pesada	SNYYGSSYVWFFDY
NO:9	CDR1 de cadena ligera	RASSSVSYMD
NO:10	CDR2 de cadena ligera	ATSNLAS
NO:11	CDR3 de cadena ligera	QQWISNPPT
NO:12	Polipéptido B9E9-SLTA	<p>QVQLVQSGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGQ GLEWIGAIYPGNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLT SEDSAVYYCARAQLRPNYWYFDVWGAGTTVTVSSGGGGSGGGG SGGGGSGGGGSGGGGSDIVLSQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSV SYMHWYQQKPGSSPKPWIYATSNLASGVPARFSGSGSGTSYSLT ISRVEAEDAATYYCQQWISNPPTFGAGTKLELKGGGGSGGKFT LDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLMIDSGSGDNLFA VDVRGIDPEEGRFNNLRLIVERNNLYVTGFVNRNNTNFYRFADFS HVTFPGTTAVTLTSGDSSYTTLQRVAGISRTGMQINRHSLTTSYLD LMSHSGTSLTQSVARAMLRFVTVTAEALRFRIQRFRTTLDLDS GRSYVMTAEDVDLTLNWGRLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSIN AILGSVALILNCHHHSRVAR</p>

(continuación)

Número	Descripción del texto	Secuencia
NO: 13	Polinucleótido consenso B9E9-SLTA	cargtn Carytngtn carwsnggngcngarytngtnaarcnggngcnwsngtnaaratgwsntg yaargcnwsnggntayacnttyacnwsntayaayatgcaytgggtnaaracarancnggncarg gnytngartggathggngcnathtayccnggnaayggngayacnwsntayaaycaraarttyaar gnaargcnacnytnacngengayaarwsnwsnwsnacngentayatgcarytnwsnwsnyt nacnwsngargaywsngcngnttaytaytgygenmgngcncarytnmgncnaaytaytgga yttygaygtntgggngcnggnacnacngtnacngtnwsnwsnggnggnggnggnwsnggn gnggnggnwsnggnggnggnggnwsnggnggnggnggnwsnggnggnggnggnwsn gayathgtnytnwsncarwsnccngcnathytnwsngcnwsnccnggngaraaragnacnatg acntgymngcnwsnwsnwsngtnwsntayatgcaytggtaycarcaraarccnggnwsnws ncnaarccntggathtaygnacnwsnaaytngcnwsnggngtncngcnmgnttywsng gnwsnggnwsnggnacnwsntaywsnytnacnathwsnmgngtnargcngargaygcn cnacntaytaytgyarcartggathwsnaayccnccnacttyggngcnggnacnaarytngary tnaargnggnggnggnwsnggnggnaargarttyacnytngaytysnacngcnaaracnta ygtngaywsnytnaaygnathmgngnathggnacncnytnacaracnathwsnwsng gnggnacwsnytnatgathgaywsnggnwsnggngayaaytnttycngtngaytnm gnggnathgayccngargarggnmgnttyaayaaytnmgnytnathgtngarmgnaayaay ytnaygtnacngnttytnaaymgnacnaayaaygtnttyaymgnttycngaytytwsnca ygtnacnttycnggnacnccngcngtnacnytnwsngngaywsnwsntayacnactnca rmngngtngcnggnathwsnmgngnccngnatgcarathaaymgncaywsnytnacnwsn tayyngaytngatgwsncaywsnggnacnwsnytnacncarwsngtngcnmgngnatgyt nmngnttygnacngtnacngcngargcnytnmgnttymgncarathcarmgngnttymgna cnacnyngaygnytnwsnggnmgngnwsntaygtngatgacngcngargaygngaytnacn ytnaaytgggngmgnytnwsnwsngntnytnccngaytaycayggncargaywsngtnmgnt ngngmgnathwsnttyggngnathaaaycgnathynggnwsngtngcnytnathytnaaytg ycaycaycaycnwsnmgngtngcnmgn
NO:14	Polipéptido C2B8-SLTA	QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPG RGLEWIGAIYPGNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSL TSEDSAVYYCARSTYYGGDWYFNVWGAGTTVTVSAGSTSGSG KPGSGEGSTKGQIVLSQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSVSYIHWFQ QKPGSSPKPWIYATSNLASGVPVRFSGSGSSTSYSLTISRVEAED AATYYCQQWTSNPPTFGGGTKLEIKFEPKSTPPGSSGGAPKEFT LDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLMIDSGSDNLF AVDVRGIDPEEGRFNRLRIVERNNLYVTGFVNRTNNVYRFADF SHVTFPGTTAVTLSDSSYTTLQRVAGISRTGMQINRHSLTTSYL DLMSHSGTSLTQSVARAMLRFVTVTAEALRFRQIRGFRTLLDD LSGRSYVMTAEDVDLTLNWGRLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFG SINAILGSVALILNCHHHASRVAR

(continuación)

Número	Descripción del texto	Secuencia
NO:15	Polinucleótido consenso C2B8-SLTA	<p>cargtnacarytncarcarcnngngcngarytngtnaarccngngcnwsngtnaaratgwsntg yaargcnwsnggntayacnttyacnwsntayaayatgcaytgggtnaarcaracnccnggmgn ggnytngartggathggngcnathtayccnggnaayggngayacnwsntayaaycaraarttyaa rggnaargcnacnytnacngcngayaarwsnwsnwsnacngcntayatgcarytnwsnwsnyt nacnwsngargaywsngcngtntaytaytgygnmgnwsnacntaytayggngngaytggt ayttaaaygtntgggngcnggnacnacngtnacngtnwsngcnggnwsnacnwsnggnws nggnaarccnggnwsngngarggnwsnacnaarggnacarathgtnytwnsncarwsnccng cnathytwnsngcnwsnccngngaraargtnacnatgacntgymngcnwsnwsnwsngt nwsntayathcaytggtycararaarcnggnwsnwsnccnaarccntggathtaygcnacnw snaaytngcnwsnggngtccngtnmgnnttywsnggnwsnggnwsnggnacnwsntayw snytnacnathwsnmgnngtnargcngargaygcngcnacntaytaytgcrcartggacnws naayccnccnacttyggngnggnacnaarytngarathargarttyccnaarccnwsnacn cncnggnwsnwsngngngcncnccnaargarttyacnytngayttywsnacngcnaaract aytngaywsnytnaaygtathmgnwsngcnathggnacnccnytnacarathwsnwsn ggnggnacnwsnytnatgathgaywsnggnwsnggnayaayytnnttygcngtngaygt mngngnathgayccngargarggnmgnntyaayaaytnmgnytngatngarmgnaaya yytntaygtnacngnttygnaaymgnacnaayaaygtnttytaymgnnttygcngaytysnc aygtnacnttycnggnacnacngcngtnacnytnwsnggnaywsnwsntayacnacytnc armngtngcnggnathwsnmgnacnggnatgcarathaaymgncaysnytnacnacnws ntaytngayytatgwsncaywsnggnacnwsnytnacncarwsngtngcnmngcnatgy tnmgnnttygtacngtnacngcngargcnytnmgnnttymgncarathcarmngngnttymgna cnacnytngaygaytnwsnggnmgnwsntaygtatgacngcngargaygtngayytacn ytnaaytgggngmgnytwnwsngntnytnccngaytaycayggncargaywsngtnmgn nggnmgnathwsnttygggnwsnathaygcnathytnggnwsngtngcnytnathytnaaytg ycaycaycaycnwsnmgnngtngcnmgn</p>
NO:16	Polipéptido MT-3727	<p>QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKTSGYFTSYNVHWVKQTPG QGLEWIGAIYPGNGDTSFNQKFKGKATLTADKSSSTVYMQLSSL TSEDSAVYYCARSNYYGSSYVWFFDVWGAGTTVTVSSGSTSGS GKPGSGEGSQIVLSQSPTILSASPGEKVTMTCRASSSVSYMDWY QQKPGSSPKPWYATSNLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISRVEAE DAATYYCQQWISNPPTFGAGTKLELKEFPKSTPPGSSGGAPGIL GFVFTLKEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLMI DSGSGDNLFAVDVRGIDPEEGRFNNLRLIVERNNLYVTGFVNRT NNVFYRFADFHVTFPGTTAVTLSGDSSYTTLQRVAGISRTGMQI NRHSLTTSYLDLMSHSGTSLTQSVARAMLRFVTVAEALRFRQI QRGFRTTLDLSDGRSYVMTAEDVDLTLNWGRLSSVLPDYHGQD SVRVGRISFGSINAILGSVALILNCHHHASRVAR</p>

(continuación)

Número	Descripción del texto	Secuencia
NO:17	Polinucleótido MT-3727 de consenso	cargtncarytncarcarcngngcngarytngtnaarccngngcncwsngtnaaratgwsntg yaaracnwsnggntayacnttyacnwsntayaaygtncaytgggtnaarcaracncnggncarg gnytngartggathggngcnathhtayccnggnaayggngayacnwsnttyaaycaraartyaarg gnaargcnacnytnacngcngayaarwsnwsnwsnacngntaytgarytnwsnwsnytna cnwsngargaywsngcngtntaytgygcnmgnwsnaaytaytggnwsnwsntaygtn tggttytygaygtntgggngcnggnacnacngtnacngtnwsnwsnggnwsnacnwsngg nwsnggnaarccnggnwsngngarggnwsncarathgtnytnwsncarwsnccnacnathy tnwsngcnwsnccngngaraaragnacnatgacntgymngcncnwsnwsnwsngtnwsnta yatggaytggtaycararaarcnggnwsnwsnccnaarccntggathaygcnacnwsnaay ytnngcnwsngngntccngcnmgnttywsnggnwsnggnwsnggnacnwsntaywsnytn acnathwsnmgntngargcngargaygcnacntaytgytgcrcartggathwsnaayc cncnacnttyggngcnggnacnaarytngarytnaararttyccnaarccnwsnacncncn gggnwsnwsngngngcncngnathytngnttygnttyacnytnaararttyacnytna yntywsnacngnaaracntaygtngaywsnytnaaygtnathmgnwsngcnathggnacnc nytnaracnathwsnwsngnggnacnwsnytnytnatgathgaywsnggnwsngngay aayytnttygcnngaygtnmgnngnathgayccngargarggnmgnnttyaayaaytmgn ytnathgtnarmgnaayaayytntaygtnacnggnttygtnaaymgnacnaayaaygnttyta ymgnttygcnaytywsncaygtnacnttyccnggnacnacngcngtnacnytnwsngnga ywsnwsntayacnacytnacarmgntngcnggnathwsnmgngnagatgcarathaay mgncaywsnytnacnacnwsntayytngayytngatgwsncaywsnggnacnwsnytnacnc arwsngtnmgnngcngatgntmgnnttygtnacngtnacngcngargcnytnmgnntymgn carathcarmnggnttymgncnacnytngaygaytnwsnggnmgnwsntaygtnatgac ngcngargaygtnaytnacnytnaaytgggngmgnnytnwsnwsngntnytnccngaytayca yggncargaywsngtnmgnngnathwsnttygggnwsnathaaaygcnathytnggn wsngtnngcnytnathytaytgcaycaycaygcnwsnmgngtnmgn
NO:18	Enlazador 218	GSTSGSGKPGSGEGS
NO:19	Secuencia líder de Strep	MWSHPQFEK
NO:20	IgG3 murina (mbisagra)	EFPKPSTPPGSSGGAP
NO:21	CDR1 de cadena pesada	GYTFTSYNMH
NO:22	CDR2 de cadena pesada	AIYPGNGDTSYNQKFKG
NO:23	CDR3 de cadena pesada	AQLRPNYWYFDV
NO:24	CDR1 de cadena ligera	RASSSVSYMH

[0172] La presente invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos no limitantes de proteínas de unión a CD20 que comprenden regiones efectoras de toxina Shiga derivadas de subunidades A de miembros de la familia de la toxina Shiga y regiones de unión a CD20 que comprenden polipéptidos de tipo 5 inmunoglobulina capaces de unirse a partes extracelulares de CD20.

EJEMPLOS

[0173] Los siguientes ejemplos demuestran determinadas realizaciones de la presente invención. Sin embargo, 10 debe entenderse que estos ejemplos son solo para fines ilustrativos y no pretenden, ni deben interpretarse, como completamente definitivos en cuanto a las condiciones y el alcance de esta invención, que es como se define en las reivindicaciones. Los ejemplos se realizaron utilizando técnicas estándar, que se conocen bien y son rutinarias para los expertos en la técnica, excepto donde se describa de otro modo en detalle.

15 **[0174]** Los siguientes ejemplos demuestran la capacidad de las proteínas de unión a CD20 ejemplares para destruir selectivamente las células que expresan CD20 en sus superficies celulares. Las proteínas de unión a CD20 ejemplares se unieron a antígenos extracelulares en CD20 expresados por tipos de células diana y entraron en las células diana. Las proteínas de unión a CD20 internalizadas enrutaron su región efectora de toxina Shiga al citosol para inactivar los ribosomas y posteriormente causaron la muerte apoptótica de las células diana. Por lo tanto, las 20 proteínas de unión a CD20 ejemplares fueron capaces de internalizarse dentro de los tipos de células que expresan CD20 en virtud de sus regiones efectoras de toxina Shiga que inducen una rápida internalización celular después de

que las proteínas de unión a CD20 formaron un complejo con el CD20 de superficie celular.

[0175] Estas proteínas de unión a CD20 ejemplares incluyen α CD20scFv::SLT-1A versión 1 (SEQ ID NO:4), α CD20scFv::SLT-1A versión 2 (SEQ ID NO:16), B9E9-SLT-1A (SEQ ID NO:12) y C2B8-SLT-1A (SEQ ID NO:14).

5

EJEMPLO 1 - Construcción, producción y purificación de ejemplos de proteínas de unión a CD20

[0176] Primero, se diseñaron o seleccionaron una región de unión a CD20 y una región efectora de toxina Shiga. En los ejemplos a continuación, la región efectora de toxina Shiga se derivó de la subunidad A de la Toxina 1 tipo Shiga (SLT-1A). Se obtuvo un polinucleótido que contenía un fragmento de SLT-1A clonado en el plásmido pECHE9A y que codifica los aminoácidos 1-251 de SLT-1A (Cheung M et al., Mol Cancer 9: 28 (2010)).

10

[0177] La región de unión a CD20 se diseñó como un scFv recombinante derivado del anticuerpo monoclonal 1H4 CD20 (Haisma et al. (1999), Blood 92: 184-90). Las dos regiones variables de inmunoglobulina (V_L y V_H) se separaron mediante un enlazador (SEQ ID NO:18).

15

[0178] En segundo lugar, la región de unión y la región efectora de toxina Shiga se combinaron para formar un polipéptido recombinante monocatenario. En este ejemplo, un polinucleótido que codifica el scFv recombinante derivado del anticuerpo monoclonal 1H4 CD20 se clonó en marco con un polinucleótido de "bisagra murina" derivado de polinucleótidos que codifican una molécula de IgG3 murina (SEQ ID NO:20) y en marco con un polinucleótido que codifica SLT-1A (residuos 1-251 de la SEQ ID NO:1). La secuencia de longitud completa comienza con Strep-tag® (SEQ ID NO:19) que codifica la secuencia de polinucleótidos clonada en marco para facilitar la detección y la purificación. La secuencia de polinucleótidos de este ejemplo se optimizó por codones para una expresión eficiente en *E. coli* usando servicios de DNA 2.0, Inc. (Menlo Park, CA, EE.UU.) para producir el vector de expresión que codificaba α CD20scFv::SLT-1A versión 1.

20

25

[0179] Se construyó una proteína de unión a CD20 diferente que comprendía un antígeno de influenza y se produjo de manera similar. DNA 2.0, Inc. (Menlo Park, CA, EE.UU.) sintetizó los polinucleótidos múltiples, incluyendo la secuencia de antígeno (SEQ ID NO:3), y los componentes de polinucleótidos requeridos se unieron en marco usando el vector pJ201 para crear el marco de lectura abierto que codifica el siguiente polipéptido monocatenario (desde el extremo amino-terminal al extremo carboxi-terminal) Strep-tag® (SEQ ID NO:19), el scFv recombinante derivado de 1H4 (descrito anteriormente), la molécula de IgG3 murina (SEQ ID NO:20), el enlazador (SEQ ID NO:3) y la secuencia derivada de SLT-1A (residuos 1-251 de la SEQ ID NO: 1). Este polinucleótido recombinante se clonó en pTXB1 con fines de producción de polipéptidos. De nuevo, DNA 2.0, Inc. (Menlo Park, CA, EE.UU.) realizó la optimización de codones para una expresión eficiente en *E. coli* para producir el vector de expresión que codificaba α CD20scFv::SLT-1A versión 2.

30

35

[0180] En tercer lugar, ambas versiones 1 y 2 de las proteínas de unión a CD20 recombinantes α CD20scFv::SLT-1A se produjeron usando técnicas estándar para sistemas de traducción de proteínas tanto libres de células como bacterianas. A continuación, las proteínas de unión a CD20 se purificaron y se aislaron usando técnicas bien conocidas en la técnica.

40

EJEMPLO 2 - Determinación de la constante de disociación (K_D) de las proteínas de unión a CD20 ejemplares

[0181] Las características de unión celular de ambas versiones 1 y 2 de las proteínas de unión a CD20 α CD20scFv::SLT-1A se determinaron mediante un ensayo de citometría de flujo basado en fluorescencia. Cada muestra contenía $0,5 \times 10^6$ de células que expresaban CD20 (Raji (CD20+)) o células que no expresaban (BC1 (CD20-)) y se incubó con 100 μ l de diversas diluciones de las proteínas de unión a CD20 en una solución salina tamponada con fosfato Hyclone 1X PBS (Fisher Scientific, Waltham, MA) con albúmina sérica bovina (BSA) al 1 % (Calbiochem, San Diego, CA, EE.UU.), en lo sucesivo en esta invención denominado "1X PBS+BSA al 1 %" durante 1 hora a 4 grados Celsius ($^{\circ}$ C). La concentración más alta de proteína de unión a CD20 se seleccionó para conducir a la saturación de la reacción. Las células se lavaron dos veces con 1X PBS+BSA al 1 %. Las células se incubaron durante 1 hora a 4 $^{\circ}$ C con 100 μ l de 1X PBS+BSA al 1 % que contenía 0,3 μ g de mAb-FITC anti-Strep tag® (N.º A01736-100, Genscript, Piscataway, NJ, EE.UU.). Las células se lavaron dos veces con 1X PBS+BSA al 1 %, se suspendieron en 200 μ l de 1X PBS y se sometieron a citometría de flujo. Los datos iniciales de intensidad de fluorescencia media (MFI) corregidos para todas las muestras se obtuvieron restando la MFI de la muestra FITC en solitario (control negativo) de cada muestra experimental. Se trazaron gráficos de IMF frente a la "concentración de proteína" usando el software Prism (GraphPad Software, San Diego, CA, EE.UU.). Usando la función del software Prism de unión de un sitio [$Y = B_{\text{máx}} * X / (K_D + X)$] bajo el encabezado de saturación de unión, se calcularon $B_{\text{máx}}$ y K_D utilizando los datos iniciales corregidos. $B_{\text{máx}}$ es la unión específica máxima informada en las MFI. K_D es la constante de unión de equilibrio, informada en nanomolar (nM).

45

50

55

60

[0182] En múltiples experimentos, se determinó que la K_D de α CD20scFv::SLT-1A versión 1 para células Raji (CD20+) era de aproximadamente 80-100 nM. En un experimento, se midió que la $B_{\text{máx}}$ para la unión de la proteína de unión a CD20 α CD20scFv::SLT-1A versión 1 a las células CD20+ era de aproximadamente 140.000 MFI con una

65

K_D de aproximadamente 83 nM (Tabla 1), mientras que no hubo una unión significativa a las células CD20 observadas en este ensayo. En un experimento, se midió que la $B_{m\acute{a}x}$ para la unión de α CD20scFv::SLT-1A versión 2 a las células CD20+ era de aproximadamente 110.000 MFI con una K_D de aproximadamente 101 nM (Tabla 1), mientras que no hubo una unión significativa a las células CD20 observadas en este ensayo.

5

Tabla 1. Características de unión: Valores representativos para $B_{m\acute{a}x}$ y K_D para las proteínas de unión a CD20 ejemplares

Proteína de Unión a CD20	biomolécula diana	Células diana positivas		Células diana negativas	
		$B_{m\acute{a}x}$ (MFI)	K_D (nM)	$B_{m\acute{a}x}$ (MFI)	K_D (nM)
α CD20scFv::SLT-1A versión 1	CD20	139 000	82,5	15 800	1.050
α CD20scFv::SLT-1A versión 2	CD20	112 000	101,0	8300	280

EJEMPLO 3 - Determinación de la concentración inhibitoria máxima media (CI_{50}) de las proteínas de unión a CD20 ejemplares

10

[0183] Las capacidades de inactivación de ribosomas de ambas versiones 1 y 2 de las proteínas de unión a CD20 α CD20scFv::SLT-1A se determinaron utilizando un ensayo de traducción de proteínas *in vitro* sin células utilizando el kit de transcripción/traducción acoplada rápida TNT® (L1170 Promega Madison, WI, EE.UU.). El kit incluye ADN de control de Luciferasa T7 (L4821 Promega Madison, WI, EE.UU.) y la mezcla maestra rápida de TNT®. La reacción de actividad ribosómica se preparó según las instrucciones del fabricante.

15

[0184] Se preparó una serie de diluciones de 10 veces de la versión α CD20scFv::SLT-1A a ensayar en un tampón apropiado y se crearon una serie de componentes de mezcla de reacción de TNT idénticos para cada dilución. Cada muestra en la serie de dilución de las proteínas α CD20scFv::SLT-1A se combinó con cada una de las mezclas de reacción de TNT junto con el ADN de control de Luciferasa T7. Las muestras de prueba se incubaron durante 1,5 horas a 30 °C. Después de la incubación, se añadió el reactivo de ensayo de luciferasa (E1483 Promega, Madison, WI, EE.UU.) a todas las muestras de prueba y la cantidad de traducción de la proteína luciferasa se midió por luminiscencia según las instrucciones del fabricante. El nivel de inhibición traslacional se determinó mediante análisis de regresión no lineal de las concentraciones transformadas logarítmicamente de la proteína total frente a las unidades relativas de luminiscencia. Usando el software estadístico (GraphPad Prism, San Diego, CA, EE.UU.), se calculó el valor de la concentración inhibitoria máxima media (CI_{50}) para cada muestra usando la función del software Prism de log(inhibidor) frente a la respuesta (tres parámetros) [$Y = \text{Inferior} + ((\text{Superior}-\text{Inferior})/(1+10^{(X-\text{Log}CI_{50})}))$] bajo el encabezado inhibición de respuesta a la dosis. Se calculó la CI_{50} para proteínas experimentales y la proteína de control de solo SLT-1A. El porcentaje de proteína de control de solo SLT-1A se calculó por [$(CI_{50}$ de la proteína de control SLT-1A/ CI_{50} de la proteína experimental) x 100].

20

25

30

[0185] El efecto inhibitor de ambas versiones de α CD20scFv::SLT-1A sobre la síntesis de proteínas libres de células fue fuerte. Múltiples experimentos determinaron que la CI_{50} de ambas versiones de α CD20scFv::SLT-1A era de aproximadamente 50 picomolar (pM). En un experimento, la CI_{50} de α CD20scFv::SLT-1A versión 1 en la síntesis de proteínas fue de aproximadamente 38 pM o dentro del 19 % del control positivo de solo SLT-1A (Tabla 2). De manera similar, la CI_{50} de α CD20scFv::SLT-1A versión 2 en la síntesis de proteínas en este ensayo sin células fue de aproximadamente 58 pM o dentro del 18 % del control positivo de solo SLT-1A (Tabla 2).

35

40

Tabla 2. Inactivación de ribosomas: Concentraciones inhibitorias semimáximas representativas (CI_{50}) para proteínas de unión a CD20 ejemplares

Proteína de Unión a CD20	CI_{50} (pM)	CI_{50} de control positivo de solo SLT-1A (pM)	Porcentaje de CI_{50} de control SLT-1A
α CD20scFv::SLT-1A versión 1	38,3	31,2	81%
α CD20scFv::SLT-1A versión 2	58,3	47,8	82%

EJEMPLO 4 - Determinación de la internalización celular por ensayo de inmunofluorescencia

[0186] Se realizaron estudios de inmunofluorescencia para analizar los perfiles de unión e internalización de α CD20scFv::SLT-1A versión 1 en líneas celulares positivas CD20+ (Daudi, Raji y Ramos) en comparación con las líneas celulares CD20- (BC-1, Jurkat (J45.01) y U266). Por ejemplo, se incubaron 50 nM de las respectivas proteínas

45

de unión a CD 20 con $0,8 \times 10^6$ células Raji durante 1 hora a 37°C para permitir la unión e internalización de la proteína de unión a CD20. A continuación, las células se lavaron con 1XPBS, se fijaron y se permeabilizaron con BD cytofix/cytoperm (BD Biosciences, San Jose, CA, EE.UU.), y después se lavaron dos veces con tampón 1X BD Perm/Wash™ (BD Biosciences, San Jose, CA, EE.UU.). Las células se incubaron con el anticuerpo anti-SLT-1A de ratón marcado con Alexa Fluor®-555 (BEI Resources, Manassas, VA, EE.UU.) en tampón 1X BD Perm/Wash™ durante 45 minutos a temperatura ambiente. A continuación, las células se lavaron y se fijaron con BD cytofix (BD Biosciences, San Jose, CA, EE.UU.) durante 10 minutos a 4°C . A continuación, las células se lavaron con 1XPBS y se resuspendieron en 1XPBS, y después se permitió que las células se adhirieran a portaobjetos de vidrio recubiertos con poli-L-lisina (VWR, Radnor, PA, EE.UU.). Los portaobjetos se cubrieron con Vectashield que contenía 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) (Fisher Scientific, Waltham, MA, EE.UU.) y se vieron con el microscopio de fluorescencia Zeiss (Zeiss, Thornwood, NY, EE.UU.).

[0187] Los estudios de inmunofluorescencia mostraron que $\alpha\text{CD20scFv}::\text{SLT-1A}$ versión 1 y B9E9-SLT-1A se unieron a las superficies celulares y entraron en las células que expresaban CD20 en una hora a 37°C .

15

EJEMPLO 5 - Ensayo de destrucción de células CD20 +: Determinación de la selectividad citotóxica y las concentraciones citotóxicas semimáximas (CD_{50}) de las proteínas de unión a CD20

[0188] Los perfiles de citotoxicidad de ambas versiones de $\alpha\text{CD20scFv}::\text{SLT-1A}$ se determinaron mediante un ensayo de destrucción de células CD20+. Este ensayo determina la capacidad de una proteína de unión a CD20 para destruir células que expresan CD20 en una superficie celular en comparación con las células que no expresan la biomolécula diana. Las células se colocaron en placas (2×10^3 por pocillo) en $20\ \mu\text{l}$ de medio en placas de 384 pocillos. La proteína $\alpha\text{CD20scFv}::\text{SLT-1A}$ a ensayar se diluyó 5 veces o 10 veces en un 1X PBS, y se añadieron $5\ \mu\text{l}$ de las diluciones o control de tampón a las células. Se utilizaron pocillos de control que solo contenían medio para la corrección del valor inicial. Las muestras celulares se incubaron durante 3 días a 37°C y en una atmósfera de dióxido de carbono (CO_2) al 5 % con la $\alpha\text{CD20scFv}::\text{SLT-1A}$ a ensayar o solo tampón PBS. La supervivencia celular total o el porcentaje de viabilidad se determinó usando una lectura luminiscente usando el ensayo de viabilidad celular luminiscente CellTiter-Glo® (G7573 Promega Madison, WI, EE.UU.) según las instrucciones del fabricante. El "porcentaje de viabilidad" de los pocillos experimentales se calculó utilizando la siguiente ecuación: $(\text{RLU de prueba} - \text{RLU promedio del medio}) / (\text{RLU de las células promedio} - \text{RLU promedio del medio}) * 100$. La concentración polipeptídica logarítmica frente al porcentaje de viabilidad se representó usando el software Prism (GraphPad Prism, San Diego, CA, EE.UU.), y se usó un análisis log(inhibidor) frente a la respuesta normalizada (pendiente variable) para determinar el valor de la concentración citotóxica semimáxima (CD_{50}) para las proteínas de unión a CD20 ejemplares. Además, se analizaron muestras de células de pacientes con linfoma utilizando este ensayo de destrucción celular para determinar el perfil de citotoxicidad de $\alpha\text{CD20scFv}::\text{SLT-1A}$ versión 1.

[0189] En múltiples experimentos, ambas versiones de $\alpha\text{CD20scFv}::\text{SLT-1A}$ demostraron la destrucción celular específica de CD20 con una especificidad de 10 a 1000 veces en comparación con la destrucción celular de líneas celulares negativas CD20 (Tabla 3). El perfil de destrucción celular específico de CD20 de ambas versiones de $\alpha\text{CD20scFv}::\text{SLT-1A}$ también contrastaba con la capacidad del componente SLT-1A (251) de destruir células que carecían de especificidad de CD20 (Tabla 3). Se midió que los valores de CD_{50} de ambas versiones de la proteína $\alpha\text{CD20scFv}::\text{SLT-1A}$ eran de aproximadamente 3-70 nM para las células CD20+, dependiendo de la línea celular, en comparación con más de 600-2.000 para las líneas de células CD20 (Tabla 3). La CD_{50} de la proteína de unión a CD20 $\alpha\text{CD20scFv}::\text{SLT-1A}$ versión 1 fue de 100 a 400 veces mayor (menos citotóxica) para las células que no expresaron CD20 en una superficie celular en comparación con las células que expresaron CD20 en una superficie celular. La CD_{50} de la versión $\alpha\text{CD20scFv}::\text{SLT-1A}$ hacia las células de linfoma humano de las muestras de pacientes fue de aproximadamente 7-40 nM (Tabla 3).

Tabla 3. Citotoxicidad selectiva: Concentraciones citotóxicas semimáximas (CD_{50}) representativas para proteínas de unión a CD20 ejemplares

Línea celular	Estado de CD20	CD_{50} (nM)		
		$\alpha\text{CD20scFv}::\text{SLT-1A}$ versión 1	$\alpha\text{CD20scFv}::\text{SLT-1A}$ versión 2	Control negativo solamente de SLT-1A
Daudi	positivo	5,6	67,0	650
Raji	positivo	2,8	4,5	1.100
ST486	positivo	3,7	7,0	940
Ramos	positivo	27,0	33,0	470
BC-1	negativo	2000	2100,0	160

(continuación)

Jurkat	negativo	1400	600,0	120
U226	negativo	2500	no determinado	960
Muestras de pacientes				
Linfoma folicular refractario a rituximab	positivo	7,1	39,0	690 000
Linfoma de Burkitt transformado por el virus Epstein-Barr	positivo	9,0	12,0	960

EJEMPLO 6 - Destrucción comparativa de las células CD20+: Determinación de las citotoxicidades relativas de las proteínas de unión a CD20 con respecto a las células CD20+

5 [0190] Se ensayaron tres proteínas de unión a CD20 potencialmente citotóxicas usando el ensayo de destrucción de células CD20+ en células Raji (CD20+) como se ha descrito anteriormente en el Ejemplo 5. Un conjunto de resultados representativos se informa en la Tabla 4. En múltiples experimentos, α CD20scFv::SLT-1A versión 1 exhibió una función de destrucción celular de 50 a 100 veces mayor en comparación con la proteína de unión a CD20 B9E9 (SEQ ID NO:12) (Tabla 4).

10

Tabla 4. Concentraciones citotóxicas semimáximas (CD₅₀) representativas para proteínas de unión a CD20 ejemplares con respecto a células Raji CD20+

Proteína de Unión a CD20	CD50 (nM)
Control negativo de solo SLT-1A	429
α CD20scFv::SLT-1A versión 1	2
α CD20scFv-B9E9::SLT-1A	103

15 **EJEMPLO 7 - Determinación de la citotoxicidad dirigida para proteínas de unión a CD20 utilizando estudios de xenoinjerto *in vivo***

[0191] Se usaron dos sistemas modelo de xenoinjerto basados en cepas de ratón inmunocomprometidas para estudiar la capacidad de las proteínas de unión a CD20 ejemplares para destruir células tumorales CD20+ *in vivo* y en un entorno tumoral en el tiempo y para diversas dosis. Estos sistemas modelo de xenoinjerto se basan en cepas de ratón bien caracterizadas que carecen de respuestas de injerto contra huésped, entre otras deficiencias del sistema inunitario. En primer lugar, se estudió un modelo de tumor intravenoso usando ratones SCID (inmunodeficiencia combinada grave) para crear tumores diseminados en todos los ratones con el fin de ensayar los efectos *in vivo* de proteínas de unión a CD20 ejemplares en células tumorales humanas. En segundo lugar, se estudió un modelo de tumor subcutáneo utilizando ratones BALBc/sin pelo para crear tumores subcutáneos en los ratones, nuevamente para 25 ensayar los efectos *in vivo* de proteínas de unión a CD20 ejemplares en células tumorales humanas.

[0192] Para el primer sistema de xenoinjerto, treinta y dos ratones SCID CB-17 (en cuatro grupos de ocho animales) se expusieron a 1×10^7 células derivadas de linfoma humano Raji-luc (Molecular Imaging, Ann Arbor, MI, EE.UU.) en 200 μ l de PBS. Los días 5-9 y 12-16 después de la exposición al tumor, los siguientes grupos recibieron lo siguiente mediante administración intravenosa: Grupo 1: PBS; Grupo 2: α CD20scFv::SLT-1A versión 2 a una dosis de 2 mg/kg; Grupo 3: α CD20scFv::SLT-1A versión 1 a una dosis de 2 mg/kg; y Grupo 4: α CD20scFv::SLT-1A versión 1 a una dosis de 4 mg/kg (solo días 5-9). La bioluminiscencia, en unidades de 1×10^6 fotones/segundo (p/s), se midió los días 5, 10, 15 y 20 utilizando un sistema de imagen óptica Caliper IVIS 50 (Perkin Elmer, Waltham, MA, EE.UU.). La figura 2 muestra cómo ambas versiones de α CD20scFv::SLT-1A y α CD20scFv::SLT-1A versión 1 en ambos niveles 35 de dosificación, dieron como resultado una bioluminiscencia total estadísticamente menos significativa en comparación con el control de PBS. La disminución en la bioluminiscencia total fue reflejo de reducciones estadísticamente significativas en las cargas tumorales diseminadas después del tratamiento con una proteína de unión a CD20 de la invención. La figura 3 indica un aumento estadísticamente significativo en la supervivencia con la administración de cualquiera de las versiones de α CD20scFv::SLT-1A. La edad media de supervivencia aumentó en cinco días con todos 40 los tratamientos en comparación con el control negativo de PBS.

[0193] Para el segundo modelo de xenoinjerto, veintiocho BALBc/sin pelo (en cuatro grupos de seis o siete animales) se expusieron por vía subcutánea a $2,5 \times 10^6$ células de linfoma humano Raji (Washington Biotechnology, Simpsonville, MD, EE.UU.). El volumen tumoral se determinó utilizando procedimientos estándar conocidos en la 45 técnica utilizando calibradores. Se ajustó el día 0 en el punto en que el volumen tumoral promedio para cada ratón alcanzó aproximadamente 160 mm³ (un ratón de cada grupo tenía un tumor mayor de 260 mm³, por lo que se excluyó).

Los días 0-4 y 7-11 los grupos recibieron la administración intravenosa de lo siguiente por grupo: Grupo 1: PBS; Grupo 2: α CD20scFv::SLT-1A versión 2 a una dosis de 2 mg/kg; Grupo 3: α CD20scFv::SLT-1A versión 1 a una dosis de 2 mg/kg; Grupo 4: α CD20scFv::SLT-1A versión 1 a una dosis de 4 mg/kg. El volumen tumoral se midió y se representó gráficamente en función del día de estudio. La figura 4 demuestra cómo el tratamiento con α CD20scFv::SLT-1A versión 1 (en ambos niveles de dosificación) dio como resultado un volumen tumoral significativamente reducido en comparación con el control de PBS hasta el día 24. Esto también se refleja en el número de ratones libres de tumor hasta el día 54, informado en la Tabla 5.

10 **Tabla 5. Eliminación de tumores mediante proteínas de unión a CD20 ejemplares en un modelo de ratón de tumor subcutáneo**

Grupo	Ratones libres de tumor/ratones totales
PBS	0/7
α CD20scFv::SLT-1A versión 2, 2 mg/kg	6/7
α CD20scFv::SLT-1A versión 1, 2 mg/kg	5/6
α CD20scFv::SLT-1A versión 1, 4 mg/kg	6/7

EJEMPLO 8 - Determinación de los efectos *in vivo* de una proteína de unión a CD20 en primates no humanos

15 **[0194]** La proteína de unión a CD20 ejemplar α CD20scFv::SLT-1A versión 1 se administró a primates no humanos para ensayar los efectos *in vivo*. Se observó el agotamiento *in vivo* de linfocitos B de sangre periférica en primates cynomolgus después de la administración parenteral de diferentes dosis de α CD20scFv::SLT-1A versión 1.

20 **[0195]** En un experimento, se inyectó por vía intravenosa a diez primates cynomolgus PBS o α CD20scFv::SLT-1A versión 1 a diferentes dosis (50, 150 y 450 microgramos de fármaco/kilogramo de peso corporal (mcg/kg)) en días alternativos durante 2 semanas. A continuación, las muestras de sangre periférica extraídas antes de la dosificación los días 3 y 8 se analizaron para determinar el porcentaje de linfocitos B que expresaban CD20 (figuras 5 y 6). En los monos cynomolgus, se han descrito dos subconjuntos distintos de linfocitos B por citometría de flujo: (1) células CD21 negativas, CD40 positivas que expresan altos niveles de CD20, y (2) células CD21 positivas y CD40 positivas que expresan niveles inferiores de CD20 (Vugmeyster Y et al., Cytometry 52: 101-9 (2003)). Se observó un agotamiento de linfocitos B dependiente de la dosis en comparación con los niveles iniciales de las muestras de sangre extraídas antes del tratamiento el día 3 (disminución del 4, 14 y el 45 % en animales a los que se les administró una dosis de 50, 150 y 450 mcg/kg) y el día 8 (disminución del 32, 52 y el 75 % en animales a los que se les administró una dosis de 50, 150 y 450 mcg/kg) (Tabla 6). Este experimento mostró que α CD20scFv::SLT-1A versión 1 era capaz de destruir linfocitos B de primate CD20 positivos *in vivo*.

30 **Tabla 6. Agotamiento de linfocitos B dependiente de la dosis de proteínas de unión a CD20 en primates no humanos**

Día	Porcentaje de disminución en células CD40+, CD20+ (%)			Porcentaje de disminución en células CD21+, CD40+, CD20+ (%)		
	50 mcg/kg	150 mcg/kg	450 mcg/kg	50 mcg/kg	150 mcg/kg	450 mcg/kg
3	38	57	69	4	14	45
8	65	81	86	32	52	75

35 **EJEMPLO 9 - Una proteína de unión a CD20 derivada de la Subunidad A de la toxina-1 tipo Shiga y el anticuerpo ofatumumab**

40 **[0196]** En este ejemplo, la región efectora de toxina Shiga se deriva de la subunidad A de la Toxina 1 tipo Shiga (SLT-1A). Una región de unión de tipo inmunoglobulina α CD20 se deriva del anticuerpo monoclonal ofatumumab (Gupta I, Jewell R, Ann N Y Acad Sci 1263: 43-56 (2012)) que comprende una región de unión de tipo inmunoglobulina capaz de unirse a CD20 humano.

Construcción, producción y purificación de la proteína de unión a CD20 SLT-1A:: α CD20

45 **[0197]** La región de unión de tipo inmunoglobulina α CD20 y la región efectora de toxina Shiga están unidas entre sí para formar una proteína. Por ejemplo, una proteína de fusión se produce expresando un polinucleótido que codifica la proteína de unión a CD20 SLT-1A:: α CD20. La expresión de la proteína de unión a CD20 SLT-1A:: α CD20 se logra usando sistemas de traducción de proteínas sin células y/o bacterianos como se ha descrito en los ejemplos anteriores.

Determinación de las características *in vitro* de la proteína de unión a CD20 SLT-1A::αCD20

5 **[0198]** Las características de unión de la proteína de unión a CD20 de este ejemplo para células CD20+ y células CD20- se determinan mediante un ensayo de citometría de flujo basado en fluorescencia como se ha descrito anteriormente en los ejemplos anteriores. Se mide que la B_{max} para la unión de SLT-1A::αCD20 a las células CD20+ es de aproximadamente 50.000-200.000 MFI con una K_D dentro del intervalo de 0,01-100 nM, mientras que no hay una unión significativa a las células CD20- en este ensayo.

10 **[0199]** Las capacidades de inactivación de ribosomas de la proteína de unión a CD20 SLT-1A::αCD20 se determinan en una traducción de proteínas *in vitro* sin células como se ha descrito anteriormente en los ejemplos anteriores. El efecto inhibitorio de la proteína de unión a CD20 de este ejemplo sobre la síntesis de proteínas sin células es significativo. La CI_{50} de SLT-1A::αCD20 en la síntesis de proteínas en este ensayo sin células es de aproximadamente 0,1-100 pM.

15 Determinación de la citotoxicidad de la proteína de unión a CD20 SLT-1A::αCD20 usando un ensayo de destrucción celular

20 **[0200]** Las características de citotoxicidad de SLT-1A::αCD20 se determinan mediante el ensayo general de destrucción celular como se ha descrito anteriormente en los ejemplos anteriores usando células CD20+. Además, las características de citotoxicidad selectiva de SLT-1A::αCD20 se determinan mediante el mismo ensayo general de destrucción celular utilizando células CD20- en comparación con las células CD20+. La CD_{50} de la proteína de unión a CD20 de este ejemplo es aproximadamente 0,01-100 nM para las células CD20+ dependiendo de la línea celular. La CD_{50} de la proteína de unión a CD20 es aproximadamente 10-10.000 veces mayor (menos citotóxica) para las
25 células que no expresan CD20 en una superficie celular en comparación con las células que expresan CD20 en una superficie celular.

Determinación de los efectos *in vivo* de la proteína de unión a CD20 SLT-1A::αCD20 utilizando modelos animales

30 **[0201]** Los modelos animales se usan para determinar los efectos *in vivo* de la proteína de unión a CD20 SLT-1A::αCD20 en células neoplásicas. Se usan diversas cepas de ratones para ensayar el efecto de la proteína de unión a CD20 después de la administración intravenosa en tumores de xenoinjerto en ratones como resultado de la inyección en estos ratones de células neoplásicas humanas que expresan CD20 en sus superficies celulares. Se pueden usar primates no humanos para ensayar el efecto de SLT-1A::αCD20 en los linfocitos B de sangre periférica como se ha
35 descrito anteriormente en el Ejemplo 8.

EJEMPLO 10 - Proteínas de unión a CD20 basadas en diversos dominios de unión a CD20

40 **[0202]** En este ejemplo, la región efectora de toxina Shiga se deriva de la subunidad A de la Toxina 1 tipo Shiga (SLT-1A), la toxina Shiga (StxA), y/o la Toxina 2 tipo Shiga (SLT-2A). Una región de unión de tipo inmunoglobulina se deriva del dominio de inmunoglobulina de la molécula elegida de la Tabla 7 y que se une a una parte extracelular de CD20. Las proteínas citotóxicas ejemplares de este ejemplo se crean y se ensayan como se describe en los ejemplos anteriores usando células CD20+ que expresan CD20 en una superficie celular.

45 **Tabla 7. Dominios de unión a CD20 ejemplares**

Fuente del dominio de unión a CD20
ibritumomab
obinutuzumab
ocaratuzumab
ocrelizumab
Obinutuzumab
ofatumumab
rituximab
tositumomab
ublrituximab
ScFv(s) de unión a CD20 en Geng S et al., Cell Mol Immunol 3: 439-43 (2006)
ScFv de unión a CD20 en Olafsen T et al., Protein Eng Des Sel 23: 243-9 (2010)

(continuación)

Lista de secuencias		
Número de ID	Descripción del texto	Secuencia
SEQ ID NO:1	Subunidad A de Toxina 1 tipo Shiga (SLT-1A)	KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSA IGTPLQTISSGGTSLLMIDSGSGD NLFAVDVRGIDPEEGRFNNLRLI VERNPLYVTGFVNRNTNNVFYRF ADFSHVTFPGTTAVTLSGDSSYT TLQRVAGISRTGMQINRHSLTTS YLDLMSHSGTSLTQSVARAMLR FVTVTAEALRFRQIQRGFRTTLD DLSGRSYVMTAEDVDLTLNWG RLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFG SINAILGSVALILNCHHHASRVA RMASDEFPSMCPADGRVVRGITH NKILWDSSTLGAILMRRTISS
SEQ ID NO:2	Polinucleótido que codifica la subunidad A de SLT-1 (consenso)	aargarttyacnyngayttywsnacngcnaara cntaygtngaywsnytnaaygnathmgnws ngcnathggnacncnytnacaracnathwsnw sngnggnacnwsnytnatgathgayws nggnwsngngayaaytnttygcngtngay gtmngngnathgayccngargargnmgt tyaayaaytnmgnytnathgtngarmgnaay aaytntaygtnacngnttygtnaaymgnac naayaaygtnttytymgnttygcngayttyws ncaygtnacnttyccnggnacnacngcngtnac nytnwsngngaywsnwsntayacnacnytn carmngntngcnggnathwsnmgnacnggn atgcarathaaymgncaaywsnytnacnacw sntayyngayytnatgwsncaywsnggnacn wsnytnacncarwsngtngcnmgngcnatgy tnmgnttygtnacngtnacngcngargcnytn mgnttymgncarathcarmngngnttymgna cnacnyngaygayytnwsnggnmgnwsnt aygtnatgacngcngargaygtngayytnacny tnaaytgggngmnytnwsnwsngtntncc ngaytaycayggncargaywsngtnmgngtn ggmngnathwsnttygnwsnathaaygena thynggnwsngtngcnytnathytnaaytgy aycaycaygenwsnmngntngcnmgntatgg cnwsngaygarttyccnwsnatgtgyccngcn gayggnmngntnmngngnathacncayaay aarathyntggaywsnwsnacnyngngnc nathytnatgmgnmgnacnathwsnwsntrr
SEQ ID NO:3	Extensión de enlazador para polipéptido anti-CD20-scFv.: SLT-1A versión 2 (Matrix 58-66 de influenza)	GILGFVFTL

(continuación)

Lista de secuencias		
Número de ID	Descripción del texto	Secuencia
SEQ ID NO:4	Polipéptido anti-CD20-scFv::SLT-1A versión 1	MQVQLQQPGAELVKPGASVKM SCKTSGYTFSTSYNVHWVKQTPG QGLEWIGAIYPGNGDTSFNQKF KGKATLTADKSSSTVYMQLSL TSEDSAVYYCARSNYYGSSYV WFFDVWGAGTTVTVSSGSTSGS GKPGSGEGSQIVLSQSPTILSASP GEKVTMTCRASSSVSYMDWYQ QKPGSSPKWIYATSNLASGVPA RFSGSGSGTSYSLTISRVEAEDA ATYYCQQWISNPPTFGAGTKLE LKEFPKPSTPPGSSGGAPKEFTL DFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPL QTISSGGTSLLMIDSGSGDNLFA VDVRGIDPEEGRFNNLRLIVERN NLYVTGFVNRTNNVFYRFADFS HVTFPGTTAVTLSGDSSYTTLQR VAGISRTGMQINRHSLTTSYLDL MSHSGTSLTQSVARAMLRFVTV TAEALRFRQIQRGFRITLDDLSG RSYVMTAEDVDLTLNWGRLSS VLPDYHGQDSVRVGRISFGSINA ILGSVALILNCHHHASRVAR
SEQ ID NO:5	Polinucleótido que codifica anti-CD20-scFv::SLT-1A versión 1	atgcargtncarytncarcarcncngngcngary tngtncarcncngngcnwsngtncaratgwsnt gyaacnwsngntayacnttyacnwsntay aaygtncaytgggtnaarcarcncnggncar ggnytngartggathgngcnathtaycnggn aayggngaycnwsnttyaaycaraarttyaar ggnaargcnacnytnacngcngayaarwsnw snwsnacngntayatgcarytnwsnwsnytn acnwsngargaywsngcngntaytaytgygc nmgnwsnaaytaytaygggnwsnwsntaygt ntggtytygaygtntggggngcnggnacnac ngtnacngtnwsnwsnggnwsnacnwsngg nwsnggnaarcnggnwsnggngarggnws ncarathgtnytnwsncarwsnccnacnathyt nwsngcnwsnccngngaraargtnacnatga cntgymgngcnwsnwsnwsngtnwsntaya tggaytggatycarcaraarcnggnwsnwsn ccnaarcntggathtaygnacnwsnaayytn genwsngngntncngcnmgnttywsnggn wsnggnwsnggnacnwsntaywsnytnacn athwsnmngntngargcngargaygcngcna cntaytaytgyc arcartggathwsnaayccncc nacnttyggngcnggnacnaarytngarytnaa

(continuación)

		rgarttyccnaarccnwsnacccncncnggnw snwsnggngngncncnaargarttyacnytn gayttywsnacngenaaracntaygtngayws nytnaaygtfnathmgnwsngcnathgggnacn ccnytnacaracnathwsnwsnggnggnacnw snytnytnatgathgaywsnggnwsnggnga yaayytnttygcngtngaygtmngngnathg ayccngargarggnmgnttyaayaaytnmg nytnathgtngarmgnaayaayytntaygtnac nggnttygtnaaymgnacnaayaaygtnttyta ymgnttygcngayttywsncaygtnacnttycc nggnacnacngcngtnacnytnwsngngay wsnwsntayacnacnytnarmgngtngcng gnathwsnmgnacnggnatgcarathaaymg ncaywsnytnacnacnwsntayytngayytna tgwsncaywsnggnacnwsnytnacncarws ngtngcnmgngcnatgymgnttygtnacn gtnacngcngargcnytnmgnttymgncarat harmgnggnttymggnacnacnyngaygay ytnwsnggnmgnsntaygtnatgacngcng argaygtngayytnacnytnaaytggggnmg ytnwsnwsngtntnccngaytaycayggnc rgaywsngtngngtnggnmggnathwsntty ggnwsnathaaygnathytnggnwsngtng cnytnathytnaaytgycaycaycaygnwsn mgngtngcnmg
SEQ ID NO:6	CDR1 de cadena pesada	GYTFTSYNVH
SEQ ID NO:7	CDR2 de cadena pesada	AIYPGNGDTSFNQKFKG
SEQ ID NO:8	CDR3 de cadena pesada	SNYYGSSYVWFFDV
SEQ ID NO:9	CDR1 de cadena ligera	RASSSVSYMD
SEQ ID NO:10	CDR2 de cadena ligera	ATSNLAS
SEQ ID NO:11	CDR3 de cadena ligera	QQWISNPPT

(continuación)

Lista de secuencias		
Número de ID	Descripción del texto	Secuencia
SEQ ID NO:12	Polipéptido anti-CD20-scFv-B9E9::SLT-1A	MQVQLVQSGAELVKPGASVKM SCKASGYTFTSYNMHWVKQTP GQGLEWIGAIYPGNGDTSYNQK FK GKATLTADKSSSTAYMQLSS LTSEDSAVYYCARAQLRPNYW YFDVWGAGTTVTVSSGGGGSG GGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIV LSQSPAILSASPGEKVTMTCRAS SSVSYMHWYQQKPGSSPKPWIY ATSNLASGVPARFSGSGSSTYS LTISRVEAEDAATYYCQQWISNP PTFGAGTKLELKG GGGSGGKEF TLD FSTAKTYVDSLNVIRSAIGT PLQTISSGGTSLLMIDSGSGDNLF AVDVRGIDPEEGRFNRLRIVER NNLYVTGFVNRTNNVFYRFADF SHVTFPGTTAVTLSGDSSYTTLQ RVAGISRTGMQINRHSLTTSYLD LMSHSGTSLTQSVARAMLRFVT VTAEALRFRQIQRGFRTTLDDLS GRSYVMTAEDVDLTLNWGRLS SVLPDYHGQDSVRVGRISFGSIN AILGSVALILNCHHHASRVAR

(continuación)

Lista de secuencias		
Número de ID	Descripción del texto	Secuencia
SEQ ID NO:13	Polinucleótido que codifica anti-CD20-scFv-B9E9::SLT-1A (consenso)	<p>atgcargtncarytngtncarwsnggngcngar ytngtbaarccnggngcnwsngtbaaratgws ntgyaargcnwsnggntayacnttyacnwsnt ayaayatgcaytgggtnaarcaracnccnggnc arggnytngartggathggngcnathtayccng gnaayggngayacnwsntayaaycaraarttya arggnaargcnacnytnacngcngayaarwsn wsnwsnacngcntayatgcarytnwsnwsny tnacnwsngargaywsngcngtntaytaytgy gcnmgngcncarytnmgncnaaytaytggf ayttygaygtntggggngcnggnacnacngtn acngtnwsnwsnggngggnggnwsngg nggngggnggnwsnggngggnggnwsng gnggngggnggnwsnggngggnggnwsn gayathgtnytnwsncarwsnccngcnathyt nwsngcnwsnccnggngaraargtnacnatga cntgymgngcnwsnwsnwsngtnwsntaya tgcaytggtaycarcaraarcnggnwsnwsnc cnaarccntggathtaygcnacnwsnaayytng cnwsnggngtncngcnmgnttywsnggnw snggnwsnggnacnwsntaywsnytnacnat hwsnmgngtngargcngargaygcngcnacn taytaytgycarcartggathwsnaaycncncna cnttyggngcnggnacnaarytngarytnaarg gnggngggnggnwsnggnggnaargarttyac nytngayttywsnacngcnaaracntaygtnga ywsnytnaaygtathmgnwsngcnathggna acnccnytnaracnathwsnwsnggnggna cnwsnytnytnatgathgaywsnggnwsngg ngayaayynttygcngtngaygtmngnggna thgayccngargarggnmgnttyaayaaytn mgnytnathgtngarmgnaayaayyntaygt nacnggnttygtnaaymgnacnaayaaygtntt ytaymgnttygcngayttywsncaygtnacntt ycnggnacnacngcngtnacnytnwsnggn gaywsnwsntayacnacnytnarmgngtng cnggnathwsnmgnacnggnatgcarathaa ymgncaywsnytnacnacnwsntayytngay ytnatgwsncaywsnggnacnwsnytnacnc</p>

ES 2 808 726 T3

(continuación)

Lista de secuencias		
Número de ID	Descripción del texto	Secuencia
		arwsngtngcnmgngcnatgytnmgnttygt nacngtnacngcngargcnytnmgnttymgn carathcarmgnggnttymgnacnacnytnga ygayytnwsnggnmgnwsntaygtnatgacn gngargaygtngaytnacnytnaaytgggg nmgnytnwsnwsngtnytnccngaytaycay ggncargaywsngtnmgngtnggnmgnath wsnttyggwnsnathaaygnathytnggnw sngtngcnytnathytnaaytgyccaycaycay cnwsnmgngtngcnmgn
SEQ ID NO:14	Polipéptido anti-CD20-scFv-C2B8::SLT-1A	MQVQLQQPGAELVKPGASVKM SCKASGYTFTSYNMHWVKQTP GRGLEWIGAIYPGNGDTSYNQK FKGKATLTADKSSSTAYMQLSS LTSEDSAVYYCARSTYYGGDW YFNVWGAGTTVTVSAGSTSGSG KPGSGEGSTKGQIVLSQSPAILS ASPGKVTMTCRASSSVSYIHW FQKPGSSPKPWYATSNLASGV PVRFSGSGSGTSYSLTISRVEAE DAATYYCQQWTSNPPTFGGGT KLEIKEFPKPSTPPGSSGGAPKEF TLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGT PLQTISSGGTSLLMIDSGSGDNLF AVDVRGIDPEEGRFNNRLRIVER NNLYVTGFVNRTNNVFYRFADF SHVTFPGTTAVTLSGDSSYTTLQ RVAGISRTGMQINRHSLTTSYLD LMSHSGTSLTQSVARAMLRFVT VTAEALRFRQIQRGFRTTLDDLS GRSYVMTAEDVDLTLNWGRLS SVLPDYHGQDSVRVGRISFGSIN AILGSVALILNCHHHASRVAR

ES 2 808 726 T3

(continuación)

Lista de secuencias		
Número de ID	Descripción del texto	Secuencia
SEQ ID NO:15	Polinucleótido anti-CD20-scFv-C2B8::SLT-1A (consenso)	atgcargtncarytncarcarcnngngngary tngtnaarcnngngcnwsngtnaaratgwsnt gyaargcnwsnggtayacnttyacnwsntay aayatgcaytgggtnaarcaracnccnggnmg nggnytngartggathggngcnathtayccngg naayggngayacnwsntayaaycaraarttyaa rggnaargcnacnytnacngngayaarwsn wsnwsnacngentayatgcarytnwsnwsny tnacnwsngargaywsngcngtntaytaytgy genmgnwsnacntaytayggngngaytggt ayttyaaygtntggggngcnggnacnacngtna cngtnwsngcnggnwsnacnwsnggnwsn ggnaarcnngnwsngngarggnwsnacn aargncarathgtnytnwsncarwsnccngc

(continuación)

Lista de secuencias		
Número de ID	Descripción del texto	Secuencia
		nathytnwsngcnwsnccnggngaraargtna cnatgaentgymngcnwsnwsnwsngtnw sntayathcaytggttycarcaraarcnggnws nwsnccnaarccntggathtaygnacnwsna ayytngcnwsnggngtncngtnmgnttyws nggnwsnggnwsnggnacnwsntaywsnyt nacnathwsnmngntngargcngargaygn gcnactaytaytgyrcartggacnwsnaay cccnccnccnttyggnggnggnacnaarytngar athaargarttyccnaarccnwsnacnccnccn ggnwsnwsnggnggngcncnccnaargarttya cnytngayttywsnacngcnaaracntaygtng aywsnytnaaygnathmgnwsngcnathgg nacnccnytnaracnathwsnwsnggnggn acnwsnytnytnatgathgaywsnggnwsng gngayaayynttygcngtngaygtngmgngn athgayccngargarggnmgnttyaayaayyt nmgnynathgtngarmgnaayaayyntayg tnacngnttygtnaaymgnacnaayaaygnt tytaymgnttygcngayttywsncaygtnacnt tycnggnacnacngngtnacnytnwsngg ngaywsnwsntayacnacnytnarmngntn gcnggnathwsnmgnacnggnatgcaratha aymgncaywsnytnacnacnwsntayytnga yytnatgwsncaywsnggnacnwsnytnacn carwsngtngcnmgngcnatgytnmgnttygt nacngtnacngcngargcnytnmgnttymgn carathcarmngngnttymgnacnacnytnga ygayytwnwsnggnmgnwsntaygtnatgacn gcngargaygtngayytacnytnaaytgggg nmgnynwsnwsngtntnccngaytaycay ggncargaywsngtnmgntnggnmgnath wsnttyggwnsnathaaygnathytnggnw sngtngcnytnathytnaaytgycaycaycayg cnwsnmngntngcnmgn

(continuación)

Lista de secuencias		
Número de ID	Descripción del texto	Secuencia
SEQ ID NO: 16	Polipéptido anti-CD20-scFv::SLT-1A versión 2	MQVQLQQPGAELVKPGASVKM SCKTSGYTFTSYNVHWVKQTPG QGLEWIGAIYPGNGDTSFNQKF KGKATLTADKSSSTVYMQQLSSL TSEDSAVYYCARSNYYGSSYV WFFDVWGAGTTVTVSSGSTSGS GKPGSGEGSQIVLSQSPTILSASP GEKVTMTCRASSSVSYMDWYQ QKPGSSPKPWIYATSNLASGVPA RFSGSGSGTSYSLTISRVEAEDA ATYYCQQWISNPPTFGAGTKLE LKEFPKPSTPPGSSGGAPGILGFV FTLKEFTLDFSTAKTYVDSLNI RSAIGTPLQTISSGGTSLLMIDSG SGNLFAVDVRGIDPEEGRFNN LRLIVERNNLYVTGFVNRTNNV FYRFADFSHVTFPGTTAVTLSGD SSYTTLQRVAGISRTGMQINRHS LTTSYLDLMSHSGTSLTQSVAR AMLRFVTVTAEALRFRQIQRGF RTTLDDLSGRSYVMTAEDVDLT LNWGRLSSVLPDYHGQDSVRV GRISFGSINAILGSVALILNCHHH ASRVAR

(continuación)

Lista de secuencias		
Número de ID	Descripción del texto	Secuencia
SEQ ID NO:17	Polinucleótido que codifica anti-CD20-scFv:: SLT-1A versión 2 (consenso)	atgcargtncarytncarcarcncngngcngary tngnaarcncngngcnwsngtnaaratgwsnt gyaacnwsnggntayacnttyacnwsntay aaygtncaytgggtnaarcaracncnggncar ggnytngartggathggngcnathtaycnggn aayggngayacnwsnttyaaycaraartyaar gnaargcnacnytnacngcngayaarwsnw snwsnacngntayatgcarytnwsnwsnytn acnwsngargaywsngcngntaytaytygc nmgnwsnaaytaytayggwnwsntaygt ntggtytygaygtntggggngcnggnacnac ngtnacngtnwsnwsnggnwsnacnwsngg nwsnggnaarcncnggnwsngngarggnws ncarathgtnytnwsncarwsnccnacnathyt nwsngcnwsnccngngaraargtnacnatga cntgymgngcnwsnwsnwsngtnwsntaya tggaytggtaycarcaraarcncnggnwsnwsn ccnaarcntggathtaygnacnwsnaayytn gcnwsngngtncngcnmgnttywsnggn wsnggnwsnggnacnwsntaywsnytnacn athwsnmgngtngargcngargaygcngcna cntaytaytycarcartggathwsnaayccnc nacnttyggngcnggnacnaarytngarytnaa rgartyccnaarcnwsnacncncncnggnw snwsngngngngcncnggnathytnggntty gtnttyacnytnaargartyacnytngaytyws nacngcnaaractaygtngaywsnytnaayg tnathmgnwsngcnathggnacncnytnear acnathwsnwsngnggnacnwsnytnytna tgathgaywsnggnwsngngayaayytnntty gcngtngaygtnmgnggnathgayccngarg arggnmgnttyaayaayytnmgnytnathgt garmgnaayaayytnaygtnacnggnttygt aaymgnacnaayaaygtnttytaymgnttygc ngaytywsncaygtnacnttyccnggnacnac

(continuación)

Lista de secuencias		
Número de ID	Descripción del texto	Secuencia
		ngcngtnacnytnwsngngngaywsnwsntay acnacnytnacarmgngtngcnggnathwsnm gnacnggnatgcarathaaymgncaywsnyt nacnacnwsntayytngayytnatgwsncay wsnggnacnwsnytnacncarwsngtngcn mgngcnatgytnmgnttygtnacngtnacngc ngargcnytnmgnttymgncarathcarmgn ggnttymgnacnacnytngayytnwsng gnmgnwsntaygtnatgacngcngargaygt ngayytnacnytnaaytggggngmnytnwsn wsngtnytncngaytaycayggncargayws ngtnmgngtnggnmggnathwsnttygggnws nathaaygnathytnnggnwsngtngcnytnat hytnaaytgycaycaycaygcnwsnmngntn gcnmgm
SEQ ID NO:18	Enlazador (218)	GSTSGSGKPGSGEGS
SEQ ID NO:19	Strep-tag®	WSHPQFEK
SEQ ID NO:20	Bisagra murina (IgG3 murina)	EFPKPSTPPGSSGGAP
SEQ ID NO:21	CDR1 de cadena pesada	GYTFTSYNMH
SEQ ID NO:22	CDR2 de cadena pesada	AIYPGNGDTSYNQKFKG
SEQ ID NO:23	CDR3 de cadena pesada	AQLRPNYWYFDV
SEQ ID NO:24	CDR1 de cadena ligera	RASSSVSYMH
SEQ ID NO:25	Subunidad A de toxina Shiga (StxA)	KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSA IGTPLQTISSGGTSLLMIDSGTGD NLFAVDVVRGIDPEEGRFNNLRLI VERNLYVTGFVNRTNNVFYRF ADFSHVTFPGTTAVTLSGDSSYT TLQRVAGISRTGMQINRHSLTTS YLDLMSHSGTSLTQSVARAMLR FVTVTAEALRFRQIQRGFRTTLD DLSGRSYVMETAEDVDLTLNWG RLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFG SINAILGSVALILNCHHHASRVA RMASDEFPSMCPADGRVRGITH NKILWDSSTLGAILMRRTISS

ES 2 808 726 T3

(continuación)

Lista de secuencias		
Número de ID	Descripción del texto	Secuencia
SEQ ID NO:26	Subunidad A de la toxina 2 tipo Shiga (SLT-2A)	DEFTVDFSSQKSYVDSLNSIRSAI STPLGNISQGGVSVSVINHVLGG NYISLNVRLDPYSERFNHLRLI MERNNLYVAGFINTETNIFYRFS DFSHISVPDVITVSMTTDSSYSSL QRIADLERTGMQIGRHSLVGSY LDLMEFRGRSMTRASSRAMLRF VTVIAEALRFRQIQRGFRPALSE ASPLYTMTAQDVDLTLNWGRIS NVLPEYRGEEGVRIGRISFNLS AILGSVAVILNCHSTGSYSVRSV SQKQKTECQIVGDRAAIKVNNV LWEANTIAALLNRKPQDLTEPN Q
SEQ ID NO:27	CDR3 de cadena pesada	STYYGGDWYFNV
SEQ ID NO:28	CDR1 de cadena ligera	RASSSVSYIH
SEQ ID NO:29	CDR3 de cadena ligera	QWTSNPPT

REIVINDICACIONES

1. Una proteína de unión a CD20 que comprende:

5 a) una región de unión a CD20 que comprende una región de unión de tipo inmunoglobulina:

- (i) capaz de unirse específicamente a una parte extracelular de la molécula CD20; y
 (ii) que comprende uno o más de: fragmento de anticuerpo de dominio único, fragmento variable monocatenario, fragmento variable de anticuerpo, fragmento de unión a antígeno, y fragmento Fd; y

10

b) un polipéptido efector de toxina Shiga;

en la que el polipéptido efector de toxina Shiga comprende: una secuencia de aminoácidos que es al menos un 85 % idéntica a la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 25; o una secuencia de aminoácidos seleccionada de:

15

- (i) aminoácidos 75 a 251 de la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 25;
 (ii) aminoácidos 1 a 241 de la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 25;
 (iii) aminoácidos 1 a 251 de la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 25; o
 (iv) aminoácidos 1 a 261 de la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 25;

20

donde, tras la administración de la proteína de unión a CD20 a una célula que expresa CD20 en una superficie celular, la proteína de unión a CD20 es apta para la internalización celular en la célula en menos de seis horas.

25 2. Una proteína de unión a CD20 según la reivindicación 1, en la que la proteína de unión a CD20 es apta para la internalización celular en la célula en 1 a 5 horas, o en menos de aproximadamente una hora.

3. Una proteína de unión a CD20 según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, donde, tras la administración de la proteína de unión a CD20 a una célula, la proteína de unión a CD20 es capaz de inducir la internalización celular de CD20 presente de forma nativa en la superficie de una célula en menos de seis horas; opcionalmente en la que la proteína de unión a CD20 es capaz de inducir, en menos de aproximadamente una hora, la internalización celular de CD20 presente de forma nativa en la superficie de una célula, tal como una célula que es miembro de un linaje de linfocitos B.

30

35 4. Una proteína de unión a CD20 según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en la que la región de unión a CD20 es capaz de unirse específicamente a una parte extracelular de una molécula CD20 con una constante de disociación de 10^{-5} a 10^{-12} moles por litro.

40 5. Una proteína de unión a CD20 según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en la que la célula que expresa CD20 en una superficie celular es un miembro de un linaje de linfocitos B.

6. Una proteína de unión a CD20 según cualquiera de las reivindicaciones 1-5, donde, tras la administración de la proteína de unión a CD20 a una célula que expresa CD20 en una superficie celular, la proteína de unión a CD20 es capaz de provocar la muerte de la célula.

45

7. Una proteína de unión a CD20 según la reivindicación 6, donde, tras la administración de la proteína de unión a CD20 a una primera población de células cuyos miembros expresan CD20, y una segunda población de células cuyos miembros no expresan CD20, un efecto citotóxico de la proteína de unión a CD20 en los miembros de la primera población de células con respecto a los miembros de la segunda población de células es al menos 3 veces mayor.

50

8. Una proteína de unión a CD20 según cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en la que el polipéptido efector de toxina Shiga comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada de:

- (i) aminoácidos 75 a 251 de la SEQ ID NO:1 o la SEQ ID NO:25;
 (ii) aminoácidos 1 a 241 de la SEQ ID NO:1 o la SEQ ID NO:25;
 (iii) aminoácidos 1 a 251 de la SEQ ID NO:1 o la SEQ ID NO:25; y
 (iv) aminoácidos 1 a 261 de la SEQ ID NO:1 o la SEQ ID NO:25.

55

9. Una proteína de unión a CD20 según la reivindicación 8, en la que el polipéptido efector de toxina Shiga comprende los aminoácidos 75 a 251 de la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 25.

60

10. Una proteína de unión a CD20 según cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en la que la región de unión a CD20 comprende los polipéptidos seleccionados del grupo que consiste en:

65 a) un dominio variable de cadena pesada (V_H) que comprende las secuencias de aminoácidos de HCDR1, HCDR2,

- y HCDR3 como se muestra en la SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, y SEQ ID NO:8, respectivamente, y un dominio variable de cadena ligera (V_L) que comprende las secuencias de aminoácido de LCDR1, LCDR2, y LCDR3 como se muestra en la SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, y SEQ ID NO:11, respectivamente;
- 5 b) un dominio variable de cadena pesada (V_H) que comprende las secuencias de aminoácidos de HCDR1, HCDR2, y HCDR3 como se muestra en la SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:22, y SEQ ID NO:23, respectivamente, y un dominio variable de cadena ligera (V_L) que comprende las secuencias de aminoácidos de LCDR1, LCDR2, y LCDR3 como se muestra en la SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:10, y SEQ ID NO:11, respectivamente; y
- 10 c) un dominio variable de cadena pesada (V_H) que comprende las secuencias de aminoácidos de HCDR1, HCDR2, y HCDR3 como se muestra en la SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:22, y SEQ ID NO:27, respectivamente, y un dominio variable de cadena ligera (V_L) que comprende las secuencias de aminoácidos de LCDR1, LCDR2, y LCDR3 como se muestra en la SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:10, y SEQ ID NO:29, respectivamente.
11. Una proteína de unión a CD20 según la reivindicación 10, en la que la región de unión a CD20 comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos 2 a 245 de la SEQ ID NO:4.
- 15 12. Una proteína de unión a CD20 según cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en la que el polipéptido efector de toxina Shiga comprende una mutación relativa a una Subunidad A de origen natural de un miembro de la familia de la toxina Shiga que cambia la actividad enzimática del polipéptido efector de toxina Shiga, en la que la mutación se selecciona de al menos una delección o sustitución de residuo aminoacídico.
- 20 13. Una proteína de unión a CD20 según cualquiera de las reivindicaciones 8-11, que comprende o consiste en una secuencia polipeptídica que es al menos un 85 % idéntica a la secuencia mostrada en la SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:12, o SEQ ID NO:14; en la que la proteína de unión a CD20 conserva la actividad de unión a CD20, y opcionalmente también conserva una o más actividades biológicas seleccionadas del grupo que consiste en: citotoxicidad, catálisis
- 25 enzimática y enrutamiento subcelular.
14. Una proteína de unión a CD20 según la reivindicación 13, que comprende o consiste en el polipéptido mostrado en la SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:12 o SEQ ID NO:14.
- 30 15. Una proteína de unión a CD20 según la reivindicación 14, que comprende o consiste en el polipéptido mostrado en la SEQ ID NO: 4.
16. Una proteína de unión a CD20 según cualquiera de las reivindicaciones 1-12 para el suministro de un material exógeno adicional en una célula que expresa CD20 en una superficie celular, en la que la proteína de unión a CD20
- 35 comprende además un material exógeno adicional seleccionado del grupo que consiste en: una proteína, un ácido nucleico, un péptido y un agente de diagnóstico; donde, tras la administración de la proteína de unión a CD20 a una célula que expresa CD20, la proteína de unión a CD20 es capaz de suministrar el material exógeno adicional a la célula.
- 40 17. Una proteína de unión a CD20 según la reivindicación 16, en la que el material exógeno se selecciona del grupo que consiste en:
- (i) una proteína que comprende un antígeno o enzima;
- (ii) un ácido nucleico que comprende un ácido ribonucleico; y
- 45 (iii) un péptido que comprende un antígeno.
18. Una proteína de unión a CD20 según la reivindicación 17, en la que el antígeno es: de una proteína bacteriana o viral; de una proteína mutada en cáncer; de una proteína expresada de forma aberrante en cáncer; o una región determinante de la complementariedad de linfocitos T.
- 50 19. Una proteína de unión a CD20 según cualquiera de las reivindicaciones 16-18, en la que la célula que expresa CD20 en una superficie celular es un miembro de un linaje de linfocitos B.
20. Una proteína de unión a CD20 según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en forma de un homomultímero o un heteromultímero.
- 55 21. Una proteína de unión a CD20 según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en forma de un solvato o sal farmacéuticamente aceptable.
- 60 22. Una composición farmacéutica que comprende una proteína de unión a CD20 según cualquiera de las reivindicaciones 1-21, y al menos un excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable.
23. Una composición farmacéutica según la reivindicación 22, en la que el al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable se selecciona de un disolvente, medio de dispersión, recubrimiento, agente antimicrobiano, agente isotónico,
- 65 agente retardante de la absorción, solución o dispersión acuosa estéril o polvo estéril fisiológicamente aceptables; o

en la que el vehículo farmacéuticamente aceptable comprende un vehículo acuoso o no acuoso, tal como agua, alcohol (por ejemplo, etanol), poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol o polietilenglicol) y mezclas de los mismos; aceite vegetal; o un éster orgánico inyectable, tal como oleato de etilo.

5 24. Una composición farmacéutica según la reivindicación 22 o 23, que comprende además un adyuvante, tal como un conservante, agente humectante, agente emulsionante o agente dispersante; un agente antibacteriano o antifúngico, tal como un parabeno, clorobutanol, fenol o ácido sórbico; un agente isotónico, tal como un azúcar, un polialcohol, tal como manitol o sorbitol, o cloruro de sodio; un agente retardante de la absorción, tal como monoestearato de aluminio o gelatina; un recubrimiento, tal como lecitina; un antioxidante farmacéuticamente
10 aceptable; un tensioactivo; un tampón; y/o un estabilizador.

25. Una composición farmacéutica según la reivindicación 24, en la que el antioxidante farmacéuticamente aceptable es un antioxidante soluble en agua, tal como ácido ascórbico, clorhidrato de cisteína, bisulfato de sodio, metabisulfito de sodio o sulfito de sodio; un antioxidante soluble en aceite, tal como palmitato de ascorbilo, hidroxianisol butilado
15 (BHA), hidroxitolueno butilado (BHT), lecitina, propilgalato o alfa-tocoferol; o un agente quelante metálico, tal como ácido cítrico, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), sorbitol, ácido tartárico o ácido fosfórico.

26. Una composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 22-25, en la que la proteína de unión a CD20 comprende o consiste en el polipéptido mostrado en la SEQ ID NO:4 o SEQ ID NO:12.
20

27. Una composición farmacéutica según la reivindicación 26, en la que la proteína de unión a CD20 consiste en el polipéptido mostrado en la SEQ ID NO: 4.

28. Una composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 22-27, que está formulada para
25 administración oral, rectal o nasal; o para administración parenteral, tal como administración subcutánea, intramuscular, intravenosa, intradérmica o transdérmica.

29. Un ácido nucleico capaz de codificar una proteína de unión a CD20 según cualquiera de las reivindicaciones 1-19, o un complemento del mismo.
30

30. Un vector de expresión que comprende un ácido nucleico según la reivindicación 29.

31. Una célula huésped que comprende un ácido nucleico según la reivindicación 29 o un vector de expresión según la reivindicación 30.
35

32. Un procedimiento *in vitro* para inducir la internalización celular de una proteína de unión a CD20 en una célula que expresa CD20 en menos de seis horas, comprendiendo el procedimiento la etapa de poner en contacto la célula con una proteína de unión a CD20 según cualquiera de las reivindicaciones 1-21.

40 33. Un procedimiento *in vitro* según la reivindicación 32, en el que la proteína de unión a CD20 se internaliza en la célula que expresa CD20 en menos de una hora.

34. Un procedimiento *in vitro* para suministrar un material exógeno en una célula que expresa CD20, comprendiendo el procedimiento la etapa de poner en contacto la célula con una proteína de unión a CD20 según cualquiera de las
45 reivindicaciones 16-19.

35. Un procedimiento *in vitro* para destruir una célula que expresa CD20, comprendiendo el procedimiento la etapa de poner en contacto la célula con una proteína de unión a CD20 según cualquiera de las reivindicaciones 1-21, donde, tras la administración de la proteína de unión a CD20 a una célula que expresa CD20 en una superficie celular, la
50 proteína de unión a CD20 es capaz de provocar la muerte de la célula.

36. Un procedimiento *in vitro* según la reivindicación 34 o 35, en el que la célula que expresa CD20 es un miembro neoplásico de un linaje de linfocitos B, una célula de melanoma y/o una célula hematopoyética neoplásica.

55 37. Una proteína de unión a CD20 según cualquiera de las reivindicaciones 1-21, o una composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 22-28 para su uso en el tratamiento de una enfermedad, trastorno o afección en un paciente que lo necesite.

38. La proteína de unión a CD20 o composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 37, en la que el
60 tratamiento es de un cáncer, un tumor, un trastorno inmunitario o una infección microbiana; opcionalmente en la que el tratamiento implica una célula cancerosa, célula tumoral o célula inmune que expresa CD20 en una superficie celular; tal como en la que el cáncer o tumor se selecciona del grupo que consiste en: cáncer óseo, leucemia, linfoma, melanoma y mieloma; u opcionalmente en la que el tratamiento es de un trastorno inmunitario asociado con una enfermedad seleccionada
65 del grupo que consiste en: amiloidosis, espondilitis anquilosante, asma, enfermedad de Crohn, diabetes, rechazo de

injerto, enfermedad de injerto contra huésped, tiroiditis de Hashimoto, síndrome urémico hemolítico, enfermedad relacionada con VIH, lupus eritematoso, esclerosis múltiple, poliarteritis, psoriasis, artritis psoriásica, artritis reumatoide, esclerodermia, choque séptico, síndrome de Sjogren, colitis ulcerosa y vasculitis.

Figura 1. Dibujo esquemático de la arquitectura general de proteínas de unión a CD20 ejemplares

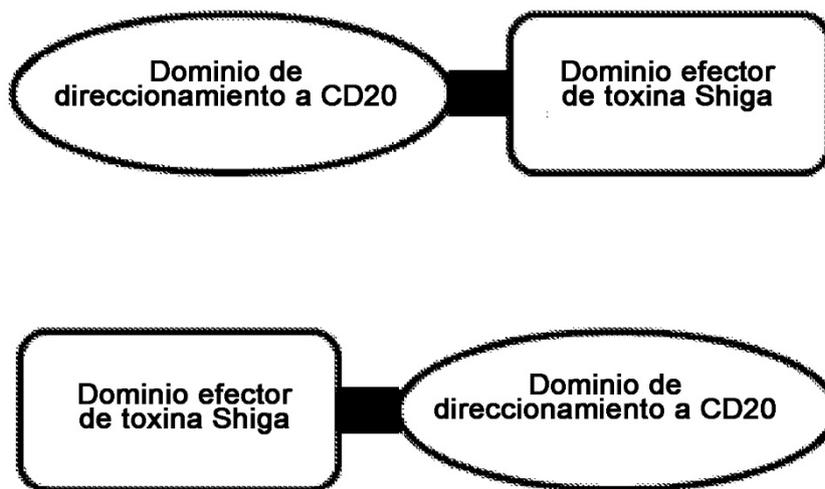


Figura 2. Resultados del xenoinjerto tumoral diseminado: las proteínas de unión a CD20 ejemplares redujeron los volúmenes tumorales diseminados *in vivo*

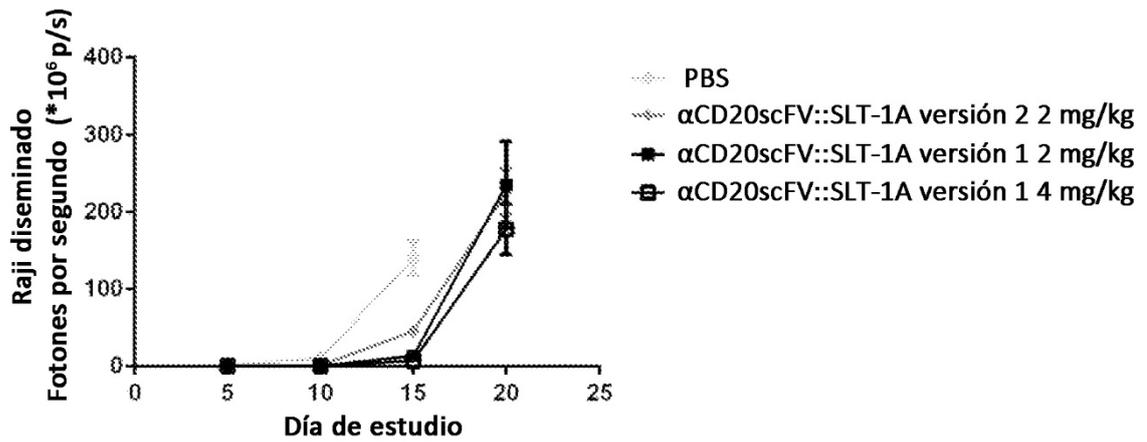


Figura 3. Resultados del xenoinjerto tumoral diseminado: las proteínas de unión a CD20 ejemplares prolongaron la vida

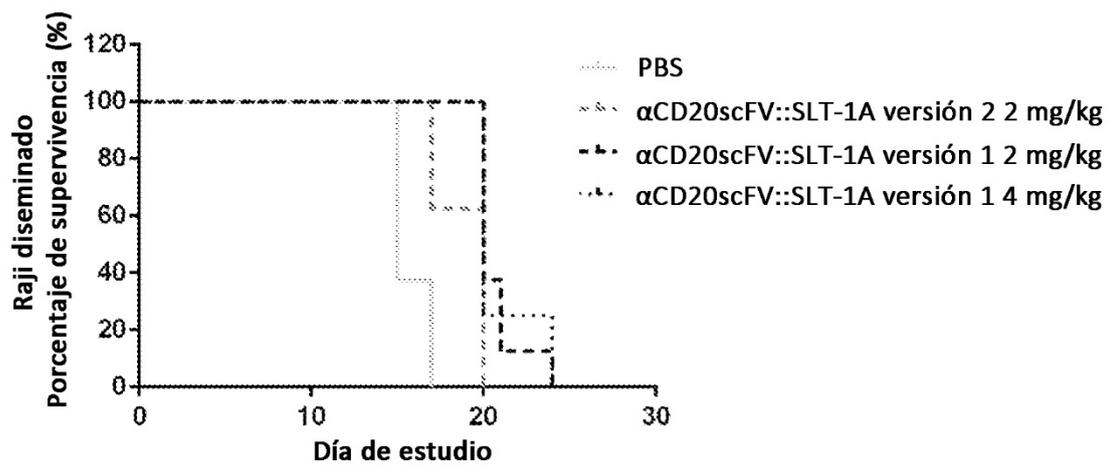


Figura 4. Resultados del xenoinjerto subcutáneo: la mayoría de los ratones mostraron una regresión completa del volumen tumoral el día 54

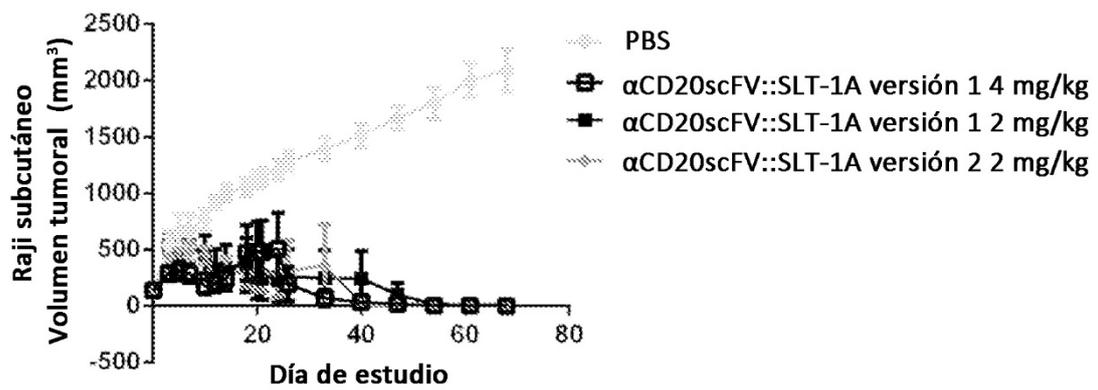


Figura 5. Resultados de primates no humanos: tras la administración parenteral de una proteína de unión a CD-20 ejemplar, se observó un agotamiento dependiente de la dosis de linfocitos B de sangre periférica en el tiempo

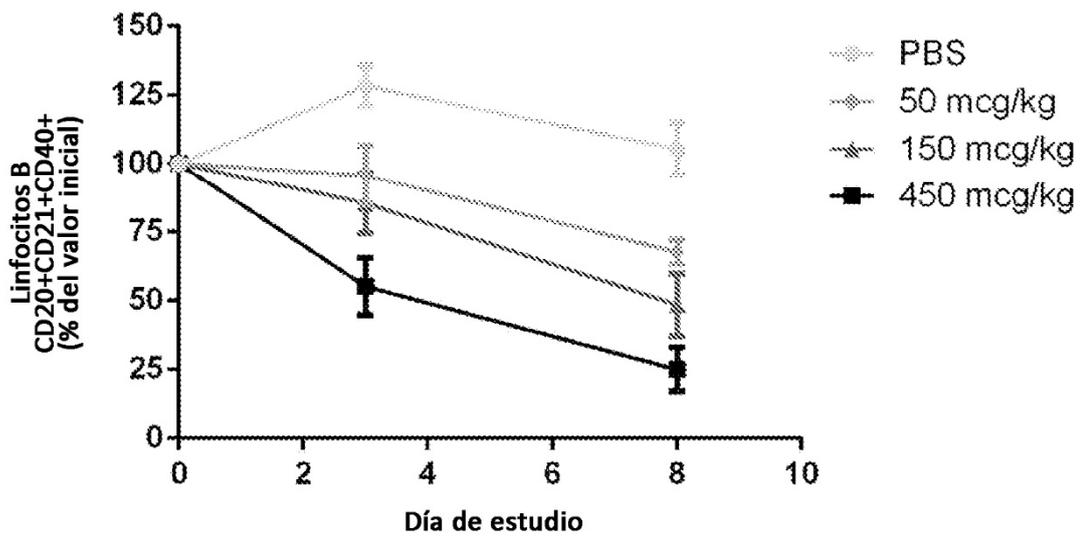


Figura 6. Resultados de primates no humanos: tras la administración parenteral de una proteína de unión a CD-20 ejemplar, se observó un agotamiento dependiente de la dosis de linfocitos B de sangre periférica en el tiempo

