



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

Delegatura de propiedad Industrial

División de Nuevas Creaciones

PCT

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

05-48853

21. EXPEDIENTE No.

54. TÍTULO ANTICUERPOS ANTI-CD33 Y METODO PARA
TRATAMIENTO DE LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA
UTILIZANDO LOS MISMOS

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL

A61L39/395

71. SOLICITANTE IMMUNOGEN, INC.

DOMICILIO CAMBRIDGE, MASSACHUSETTS, ESTADOS UNIDOS
DE AMERICA

74. APODERADO HUMBERTO RUBIO CAMACHO

22. BOGOTÁ, D. C., Mayo 20 DE 2005.

PETITORIO

FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT

ENTRADA EN FASE NACIONAL 09-06-2005

① SOLICITUD DE:
☒ Patente de Invención ☐ Patente de Modelo de Utilidad
☐ Capítulo I ☒ Capítulo II

② Nombre: IMMUNOGEN, INC.
Dirección: 128 Sidney Street
SOLICITANTE Teléfono: 3132408 Fax: 3131647
(71) E-mail:
Domicilio: CAMBRIDGE, MASSACHUSSETTS, ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA
Lugar de constitución: MASSACHUSSETTS, ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA

③ Nombre: HUMBERTO RUBIO CAMACHO IDENTIFICACIÓN
REPRESENTANTE Dirección: Carrera 7 No. 74 - 64, Of. 506 C.C. ☒ NIT ☐
O APODERADO Teléfono: 3132408 Fax: 3131647 C.E. ☐ OTRO ☐
(74) E-mail: No. 17'192.062 T.P. 50.007 CSJ

④ Nombre: 1.- Mary, G. HOFFEE
2.- Daniel TAVARES
3.- Robert, J. LUTZ
INVENTOR(ES): Dirección: 1.- 59 Leland Road, Brookline
(72) 2.- 27 Sylvester Road, Natick
3.- 218 Old Connecticut Path, Wayland
Teléfono: 3132408 Fax: 3131647
E-mail:
Domicilio: MASSACHUSSETTS, ESTADOS UNIDOS DE AMERICA

⑤ PCT (86)
Solicitud Internacional No. PCT/US2003/032737 Fecha 5 DE NOVIEMBRE DE 2.003
Publicación Internacional No. WO 2004/043344 Fecha 27 DE MAYO DE 2.004

⑥ TÍTULO (54) "ANTICUERPOS ANTI-CD33 Y METODO PARA TRATAMIENTO DE
LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA UTILIZANDO LOS MISMOS"

⑦ Clasificación Internacional (51)

⑧ Prioridad (33) País de origen (32) Fecha (31) Número de
solicitud
SI ☒ NO ☐ ESTADOS UNIDOS DE AMERICA 07 DE NOVIEMBRE DE 2002 60/424,332

⑨ Comprobante de pago No. 05-25,924 Fecha: 11 DE ABRIL DE 2.005

cpfm

⑩

ANEXOS

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.
- ☒ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica *Repoco en el Exp. 05-014.917*
- ☒ Poderes, si fuere el caso. *Repoco en el Exp 05-014 917.*
- ☒ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- ___ Declaraciones
- ☒ Copia de la publicación PCT
- ☒ Copia informe búsqueda internacional.
- ___ Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen Preliminar (IPEA).
- ___ Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA.
- ☒ Copia de las modificaciones efectuadas de acuerdo con el Artículo 28 PCT en Fase Nacional.
- ___ De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- ___ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- ___ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.
- ☒ Arte final 12 x 12
- ___ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ___ De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.
- ___ Otros

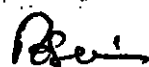
(11) Figura característica:

Módulo M24-CDR	
Letra Clave	SPOT 102
CDR1: KSSQSVFFSSQXNYLA	4
CDR2: WATYRRA	5
CDR3: HQYLSRY	4
Módulo Clave	
CDR1: SYVIR	3
CDR2: VIYPONDDISYNQEFKG	57
CDR3: EVRLRYFDV	3
Módulo M24-CDR	
CDR1: GYTFSTYVIR	56
CDR2: VIYPONDDIS	59
CDR3: EVRLRYFDV	3

(12)

HUMBERTO RUBIO CAMACHO

FIRMA



C.C.

17'192.062 de Bogotá

T.P.

50.007 Consejo Superior de La Judicatura

Folio 3 extracto
②

4
3

**REGISTRO
PATENTE DE INVENCION:
ANTICUERPOS ANTICO-33 Y
METODO PARA TRATAMIENTO DE
LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA
UTILIZANDO LOS MISMOS**

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

MIT : 800176089-2

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
Radicacion : 0504053 00000000 Folios: 160
Fecha (AMB): 2005-05-20 11:49:01
Tramite : 011 PCT-PATENT 379 FASE MCI 411 PRESENTM
Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 05 - 25,924
FECHA : ABRIL 11 DE 2005

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	Vr. PAGO
HUMBERTO RUBIO CAMACHO	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	38024233	11/04/2005	4,788,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT. RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1 50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	443,000.00
	TOTAL :	443,000.00

SON: CUATROCIENTOS CUARENTA Y TRES MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

**ANTICUERPOS ANTI-CD33 Y MÉTODO PARA TRATAMIENTO DE
LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA UTILIZANDO LOS MISMOS**

Esta solicitud reclama el beneficio de la Solicitud Provisional
No. 80/424,332 presentada el 7 de noviembre de 2002, la descripción
de la cual está incorporada a la presente mediante referencia.

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a anticuerpos que enlazan
CD33. De manera más particular, la invención se refiere a
anticuerpos anti-CD33, fragmentos y homólogos de dichos
anticuerpos, versiones humanizadas y recubiertas de dichos
anticuerpos, equivalentes funcionales y versiones mejoradas de
dichos anticuerpos, Inmunoconjugados y composiciones que
comprenden dichos anticuerpos, y los usos de los mismos en el
diagnóstico, Investigación y aplicaciones terapéuticas.

En otro aspecto, la invención se refiere a un polinucleótido que
conjuga los anticuerpos, vectores que comprenden los
polinucleótidos, células huésped transformadas con polinucleótidos y
métodos de producción de los anticuerpos.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

El antígeno de diferenciación de leucocito CD33 es una
glicoproteína de transmembrana de aminoácido 364 con homología

de secuencia a membranas de la familia de sialoadhesina, incluyendo glicoproteína asociada con mielina y CD22, así como la sialoadhesina misma (S. Peiper, 2002, Leucocyte Typing VII, White Cell Differentiation, Antigens, Proceedings of Seventh International Workshop and Conference, Oxford University Press, p. 777).

La expresión de CD33 parece ser altamente específica para el compartimiento hematopoiético, con fuerte expresión por células precursoras mieloides (S. Peipe, 2002). Es expresada por células progenitoras mieloides tales como CFU-GEMM, CFU-GM, CFU-G y BFU-E, monolitos/macrófagos, precursores de granulocito tales como promielocitos y mielocitos aunque con expresión reducida a la maduración y diferenciación, y granulocitos maduros aunque con un bajo nivel de expresión (S. Peiper, 2002).

En contraste, las células de cepa hematopoiéticas pluripotentes que dan origen a una "ráfaga de colonias" *in vitro* (Leary, A. G. et al., 1987, Blood 69:953) y que inducen cultivos de médula a largo plazo hematopoiéticos (Andrews R.G. et al., 1989, J. Exp. Med. 169:1721; Sutherland, H. J. et al., 1989, Blood 74:1563) parece carecer de expresión de CD33.

En tanto que la función específica de CD33 es desconocida, su homología a la sialoadhesina sugirió un rol en la característica de enlace de carbohidrato de la familia de lectina, un rol confirmado posteriormente.

De manera importante, los anticuerpos monoclonales anti-CD33 han mostrado que CD33 es expresado por células de leucemia mielogénica aguda, clonogénicas (AML) en más del 80% de los casos

en seres humanos (Larissa, V.F. et al., 1992, Exp. Hemtol. 20:442-448).

Debido a la expresión selectiva de CD33, los inmunoconjugados que combinan fármacos citotóxicos con anticuerpos monoclonales que reconocen de manera específica y enlazan CD33 han sido propuestos para uso en el reconocimiento selectivo de células AML. Se espera que dichas terapias no afecten las células de cepa y los progenitores hematopoiéticos primitivos. Los inmunoconjugados que utilizan anticuerpos anti-CD33 incluyen inmunoconjugados anti-CD33-ricina que han demostrado ser ligeramente letales para las células AML (Roy, D.C. et al., 1991, Blood 77:2404; Lambert, J.M. et al., 1991, Biochemistry 30:3234), aunque evitan las células de cepa que soportan la reconstitución de hematopoyesis y hematopoiética normales (Larissa, V. F. et al., 1922, Exp. Hematol. 20:442-448).

Estudios adicionales que utilizan inmunoconjugados han demostrado rápido reconocimiento de anticuerpos anti-CD33 radioactivos para células de la ráfaga leucémicas en sangre periférica y médula cuando son administrados por vía intravenosa (Scheinberg, D. A. et al., 1991, J. Clin. Oncol. 9:478-490; Schwartz, M. A. et al., 1993, J. Clin. Oncol. 11:294-303). La rápida internación del anticuerpo por medio de la célula de la blanco se observó también en estudios *in vitro* (Tanilmot, M. et al. , 1989; Leucemia 3:339-348; Divgi, C.R. et al., 1989, Cancer Res. Suppl. Vol. 30:404a). La evaluación del anticuerpo anti-CD33 humanizados conjugados para la caliqueamicina antibiótica antitumoral potente en (ozogamicina de Gemtuzumab) en estudios pre-clínicos demostraron

eliminación específica de células de leucemia en cultivos de célula HL-60, xenoinjertos de tumor HL-60 en ratones, y muestras de médula a partir de pacientes AML (Hamann, P.R. et al., 2002, Bioconjugate Chem. 13:47-58).

5 Con base en los resultados positivos de esos estudios pre-clínicos, se evaluó la ozogamicina de Gemtuzumab en estudios clínicos de fase I y II. En los estudios de Fase I, la mayor toxicidad observada fue la mielosupresión debida a la expresión de CD33 en las células progenitoras mieloides (Sievers, E.L. et al., 1999, Blood 93:3678-3684; Sievers E.L. et al., 2001, J. Clin. Oncol. 19:3244-3254) los estudios de Fase II con una dosis de 9 mg/m² intravenosa durante 4 horas, repetida después de 14 días, produjo un índice de respuesta de 30%. La aprobación de comercialización de la ozogamicina de Gemtuzumab fue concedida por la FDA en mayo de 10 2000 con indicación para el tratamiento de pacientes con AML positiva CD33 en primera recaída con una edad de 60 años o mayores que no son considerados candidatos para quimioterapia citotóxica. Los reportes post-comercialización han indicado el potencial de toxicidad significativa, especialmente enfermedad veno-oclusiva (VOD), lo cual ha conducido a revisiones de etiquetado e 15 iniciación de un programa de supervisión del paciente. Gran parte de esta toxicidad puede estar relacionada con la caliqueamicina componente de fármaco, la cual demostró ocasionar hepatotoxicidad en modelos pre-clínicos, y por lo tanto no puede ser un resultado 20 directo de reconocimiento CD33.

25

En tanto que los resultados antes descritos sugirieron que los

8-4

inmunos conjugados que comprenden un anticuerpo anti-CD33 y un fármaco citotóxico pueden ser utilizados de manera exitosa en el tratamiento de AML, existe una necesidad de inmunos conjugados que sean seguros y efectivos. La presente invención está dirigida a estos y otros importantes fines.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

En consecuencia, es un objeto de la presente invención el proporcionar anticuerpos que enlacen de manera específica a CD33, y que puedan ser utilizados en el tratamiento de AML.

Por lo tanto, en una primera modalidad, se proporciona un anticuerpo, o fragmento de enlace epítopo del mismo, que tiene la habilidad de enlazar CD33.

En una segunda modalidad, se proporciona el anticuerpo murino My9-6, el cual está completamente caracterizado en la presente con respecto a las secuencias de aminoácidos de sus regiones variables de cadena ligera y pesada, las secuencias cADN de los genes para las regiones variables de cadena ligera y pesada, la identificación de sus CDRs (regiones de determinación complementarias), la identificación sobre sus aminoácidos de superficie, y medios para su expresión en forma recombinante.

En una tercera modalidad, se proporcionan versiones humanizadas o recubiertas del anticuerpo My9-6 en donde los residuos expuestos en superficie del anticuerpo My9-6 o fragmentos de enlace de epítopo del mismo en ambas cadenas ligera y pesada

para asemejar más estrechamente las superficies de anticuerpo humano. Dichos anticuerpos humanizados pueden tener utilidad incrementada, en comparación con la murina My9-8, como agentes terapéuticos o de diagnóstico. Las versiones humanizadas del anticuerpo My9-8 están también totalmente caracterizadas en la presente con respecto a sus secuencias de aminoácidos respectivas de regiones variables de cadena ligera y pesada, las secuencias AND de los genes para las regiones variables de cadena ligera y pesada, la identificación de los CDRs, la identificación de sus aminoácidos de superficie, y la descripción de medios para su expresión en forma recombinante.

En una modalidad adicional, se proporcionan anticuerpos o fragmentos de enlace de epítipo de los mismos que comprende por lo menos una región de determinación complementaria que tiene una secuencia de aminoácido seleccionada a partir del grupo que comprende SEC ID NOs: 1-6:

SYIYH (SEC ID NO: 1),
 VIYPGNDDISYNQKFXG (SEC ID NO: 2), en donde X es K o Q,
 EVRLRYFDV (SEC ID NO: 3),
 KSSQSVFFSSSQKNYLA (SEC ID NO: 4),
 WASTRES (SEC ID NO: 5),
 HQYLSSRT (SEC ID NO : 6),

y que tiene la habilidad para enlazar CD33.

En una modalidad adicional, se proporcionan anticuerpos o

fragmentos de enlace de epítipo de los mismos que comprenden por lo menos una región variable de cadena pesada y por lo menos una región variable de cadena ligera, en donde dicha región variable de cadena pesada comprende tres regiones de determinación complementaria que tienen secuencias de aminoácidos representadas por SEC ID NOs: 1-3, respectivamente,

SYYIH (SEC ID NO: 1),

VIYPGNDDISYNQKFXG (SEC ID NO: 2), en donde X es K o Q,

EVRLRYFDV (SEC ID NO: 3),

y en donde la región variable de cadena ligera comprende tres regiones de determinación complementaria que tienen secuencias de aminoácidos representadas por SEC ID NOs: 4-6, respectivamente,

KSSQSVFFSSSQKNYLA (SEC ID NO: 4),

WASTRES (SEC ID NO: 5),

HQYLSSRT (SEC ID NO: 6).

En una modalidad adicional, se proporcionan anticuerpos que tienen una región variable de cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácido que comparte por lo menos 90% de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácido representada por SEC ID NO: 7:

QVQLQQPGAIEWKPGASVKMSCKASGYTFTSYIHWIKQTPGQGLEW

**VGVIYPGNDDISYNQKFKGKATLTADKSSTTAYMQLSSLTSEDSAVYY
CAREVRLRYFDVWGAGTTVTVSS,**

5 de manera más preferible 95% de identidad de secuencia con SEC ID
NO: 7, de manera más preferible 100% de identidad de secuencia
con SEC ID NO: 7.

De manera similar, se proporcionan anticuerpos que tienen una
región variable de cadena aligera que tiene una secuencia de
aminoácido que comparte por lo menos el 90% de identidad de
10 secuencia con una secuencia de aminoácido representada por SEC
ID NO: 8:

**NIMLTQSPSSLAVSAGEKVTMSCKSSQSVFFSSSQKNYLAWYQQIPGQ
SPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISVQSEDLAIYYCHQY
15 LSSRTFGGGTKLEIKR,**

de manera más preferible 95% de identidad de secuencia con SEC ID
NO: 8, de manera más preferible del 100% de identidad de secuencia
con SEC ID NO: 8.

20 En una modalidad adicional, se proporcionan anticuerpos que
tienen una región variable de cadena pesada humanizados o
recubiertos que comparte por lo menos el 90% de identidad de
secuencia con una secuencia de aminoácido representada por SEC
ID NO: 9:

25

QVQLQQPGAIEVVKPGASVKMSCKASGYTFTSYIHWIKQTPGQGLEW

VGVIYPGNDDISYNQKFQGKATLTADKSSTTAYMQLSSLTSEDSAVYY
CAREVRLRYFDVWGQGTTVTVSS,

5 de manera más preferible del 95% de identidad de secuencia con
SEC ID NO: 9, de manera más preferible del 100% de identidad de
secuencia con SEC ID NO: 9.

De manera similar, se proporcionan anticuerpos que tienen una
región variable de cadena ligera humanizados o recubiertos que
comparte por lo menos el 90% de identidad de secuencia con una
10 secuencia de aminoácido que corresponde a SEC ID NO: 10:

EIVLTQSPGSLAVSPGERVTMSCKSSQSVFFSSSQKNYLAWYQQIPGQS
PRLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISVQPEDLAIYYCHQYLS
SRTFGQGGTKLEIKR,

15 de manera más preferible del 95% de identidad de secuencia con
SEC ID NO: 10, de manera más preferible del 100% de identidad de
secuencia con SEC ID NO: 10.

En una modalidad adicional, la presente invención proporciona
20 inmunoconjugados que comprenden un fármaco o profármaco unido
de manera covalente, directamente o por medio de un enlazador
divisible o no divisible, para un anticuerpo o fragmento de enlace de
epítipo del mismo de la presente invención. En modalidades
preferidas, el fármaco o profármaco es un fármaco o profármaco
25 citotóxico tal como un maitansinólido, un taxoide, CC-1065, un
análogo CC-1065, dolastatina y un análogo de dolastatina.

En una modalidad adicional, la presente invención proporciona una composición que comprende un anticuerpo o fragmento de epítoto del mismo de la presente invención y un fármaco o profármaco.

5 En una modalidad adicional, la presente invención comprende composiciones farmacéuticas que comprenden un anticuerpo, fragmento de enlace de epítoto del mismo o inmunoconjugado de la presente invención, ya sea solo o en combinación con un fármaco o profármaco u otro agente terapéutico, en presencia de uno o más agentes farmacéuticamente aceptados.

10 En una modalidad adicional, la presente invención proporciona un anticuerpo o fragmento de enlace de epítoto del mismo que está etiquetado para uso en aplicaciones de investigación o diagnóstico. En modalidades preferidas, la etiqueta es una etiqueta de biotina, una etiqueta de enzima, una radio-etiqueta, un fluoroforo, un cromóforo, un agente de formación de imagen o un ión metálico.

15 En una modalidad adicional, la presente invención proporciona métodos para inhibir el crecimiento de una célula que expresa CD33 a través del uso de un anticuerpo, fragmento de enlace de epítoto del mismo o inmunoconjugado de la presente invención, ya sea solo o en combinación con un fármaco o profármaco u otro agente terapéutico, ya sea solo o en presencia de uno o más agentes farmacéuticamente aceptados.

20 En una modalidad adicional, la invención proporciona métodos para el tratamiento de un sujeto que tiene una enfermedad en donde se expresa CD33 que comprende la administración de un anticuerpo,

un fragmento de enlace de epítipo del mismo o inmunoconjugado de la presente invención, ya sea solo o en combinación con otro fármaco o profármaco u otro agente terapéutico, ya sea solo o en presencia de uno o más agentes farmacéuticamente aceptados. La enfermedad puede ser una o más de, por ejemplo, síndrome mielodisplástico (MDS), leucemia mieloide aguda (AML), leucemia mieloide crónica (CML) y leucemia pro-mielocítica (PML), u otra enfermedad por ser determinada en la cual se expresa CD33.

Los métodos de tratamiento incluyen aplicación in vivo, ex vivo e in vitro de los anticuerpos, fragmentos de anticuerpo e inmunoconjugados de la presente invención, ya sea solo o en combinación con un fármaco o profármaco u otro agente terapéutico, ya sea solo o en presencia de uno o más agentes farmacéuticamente aceptados.

En una modalidad adicional, se proporciona un método para determinar si una muestra biológica contiene o no una célula cancerígena mielogénica en donde una muestra biológica se pone en contacto con un reactivo de diagnóstico, tal como un anticuerpo etiquetado o fragmento de enlace de epítipo del mismo de la presente invención, y se detecta la distribución del reactivo dentro la muestra. Este método puede ser utilizado para diagnosticar un cáncer tal como una leucemia mieloide aguda (AML), leucemia mieloide crónica (CML) y leucemia pro-mielocítica (PML).

En una modalidad adicional, se proporcionan anticuerpos o fragmentos de enlace de epítipo de los mismos de la presente invención que tienen propiedades mejoradas. Por ejemplo, los

anticuerpos o fragmentos de enlace de epítoto de los mismos que tienen afinidad mejorada para CD33 pueden ser preparados por las técnicas estándar de inmunización animal, formación de hibridoma y selección de anticuerpos con características específicas.

5 También se pueden preparar anticuerpos mejorados por medio de maduración de afinidad de un anticuerpo o fragmento de enlace de epítoto del mismo de la presente invención a través de, por ejemplo, mutagénesis dirigida de sitio mediada por oligonucleótido, mutagénesis de casete, redistribución PCR, ADN susceptible a error y uso de cepas de mutador de E. coli.

10 En una modalidad adicional, la presente invención proporciona polinucleótido que codifican los anticuerpos o fragmentos de enlace de epítoto de los mismos de la presente invención, vectores recombinantes que comprenden los polinucleótidos, células huésped transformadas con los vectores recombinantes y métodos para producir dichos anticuerpos y fragmentos de enlace de epítoto de los mismos por medio del cultivo de dichas células huésped.

15 En una modalidad final, la presente invención proporciona un método para obtener CD33 a partir de material biológico utilizando un anticuerpo o fragmento de enlace de epítoto del mismo de la presente invención.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

25 La Figura 1 muestra los resultados de un experimento de enlace de competencia en el cual se ensayo el enlace del anticuerpo

¹²⁵I-etiquetado My9-6 (3 x 10⁻⁹ M) a las células U-937 CD33-positivas en presencia de concentraciones crecientes ya sea de anticuerpo My9 o My9-6.

5 **La Figura 2 muestra la cartilla degenerada My9-6 para la secuencia de señal de cadena ligera.**

La Figura 3 muestra los nombres de archive de las estructuras de anticuerpo 127 a partir de la base de datos Brookhaven que se utilizaron para pronosticar la superficie de la región variable muMy9-6.

10 **La Figura 4 muestra la cartilla PCR utilizada para construir las versiones 16 recubiertas My9-6 así como anticuerpo My9-6 quiméricos.**

15 **La Figura 5 muestra los plásmidos utilizados para construir y expresar los anticuerpos humanizados. (A): el plásmido de clonación de cadena ligera. (B): el plásmido de clonación de cadena pesada. (C): el plásmido de expresión de anticuerpo de mamífero.**

20 **La Figura 6A muestra los resultados de secuenciamiento Edman comparados con la secuencia de aminoácido derivada a partir de clones generados de ADN complementario RT-PCR para cadena ligera muMy9-6.**

La Figura 6B muestra los resultados a partir del análisis de secuencia MS-MS de los fragmentos péptido 1319 Da y 1122 Da que contienen secuencias CDR1 y CDR2 respectivamente. Las secuencias CDR están en negrillas.

25 **La Figura 7 muestra los resultados a partir del análisis de secuencia MS-MS del péptido 1788 Da y la secuencia**

correspondiente derivada a partir de dos clones cADN.

La Figura 8A muestra la secuencia cADN y la secuencia de aminoácido deducida de la región variable de cadena ligera para el anticuerpo para el anticuerpo My9-6 murina. Los tres CDRs están subrayados.

La Figura 8B muestra la secuencia cADN y la secuencia de aminoácido deducida de la región variable de cadena pesada para el anticuerpo My9-6 murina. Los tres CDRs están subrayados.

La Figura 9 muestra los CDRs de cadena ligera y pesada como se determina por medio de las definiciones Kabat.

La Figura 10 muestra la secuencia de aminoácido de cadena ligera y pesada para el anticuerpo My9-6 murina alineada con las secuencias germLine para los genes 8-27 y V102. Los puntos (.) indican la identidad de secuencia.

Las Figuras 11A & B muestran las diez secuencias de anticuerpo de cadena ligera (A) y de cadena pesada (B) más homólogas a las secuencias muMy9-6 que tienen archivos solucionados en la base de datos Brookhaven. Las secuencias están alineadas en orden de mayor a menor homología.

Las Figuras 12A & B muestran la accesibilidad promedio para cada posición Kabat de las cadenas ligera (A) y pesada (B) del anticuerpo muMy9-6. Las accesibilidades relativas para cada posición Kabat de las diez secuencias de cadena ligera y pesada más homólogas se promediaron y se presentan a lo largo del eje x.

La Figura 13A muestra las accesibilidades de solvente de residuo para las diez estructuras de cadena ligera más homólogas,

calculadas con el software MC, y muestra los promedios para cada posición Kabat, tabulados con Excel. Esta tabla presenta los datos para posiciones non-CDR con accesibilidades de solvente promedio mayores al 25%. Un residuo de superficie está definido como un residuo con más de un 30% de accesibilidad de solvente promedio. Las posiciones con 25%-35% de accesibilidades promedio fueron analizadas adicionalmente por medio del cálculo de accesibilidades promedio de estructuras solamente con residuos idénticos en esa posición así como en las dos posiciones de lado en cualquier lado. NA se refiere a posiciones de lado idénticas no disponibles. Las posiciones 15 y 70 requirieron de cálculos adicionales para llegar a los pronósticos de superficie finales dadas en la última columna.

La Figura 13B muestra las accesibilidades de solvente de residuo para las diez estructuras de cadena pesada más homólogas, calculadas con el software MC, y muestra los promedios para cada posición Kabat, tabulados con Excel. Esta tabla presenta los datos para posiciones no-CDR con accesibilidades de solvente promedio mayores del 25%. Un residuo de superficie está definido como un residuo con más de un 30% de accesibilidad de solvente promedio. Las posiciones con 25%-35% de accesibilidades promedio fueron analizadas de manera adicional por medio del cálculo de accesibilidades promedio de estructuras solamente con residuos idénticos en esa posición así como en las dos posiciones de flanco en cualquier lado. NA se refiere a posiciones de flanco idénticas no disponibles.

La Figura 14 muestra los residuos de superficie de estructura

My9-6 que quedan dentro de 5 Å de un residuo CDR.

La Figura 15 muestra las cinco secuencias humanas superiores extraídas a partir de la base de datos Kabat. Las alineaciones se generaron por medio de SR (Pedersen, 1993). Los residuos muMy9-6 que quedan dentro de 5 Å de un CDR están subrayados.

Las Figuras 16A & B muestran las 16 secuencias de región variable de cadena ligera My9-6 humanizadas (A) y las 16 secuencias de región variable de cadena pesada My9-6 humanizadas (B) alineadas con murina My9-6. Los puntos (.) representan identidad de secuencia con la versión humanizada 1.0. Los residuos de superficie que difieren en My9-6 murina y humano están subrayados.

La Figura 17 muestra los valores My9-6 K_D calculados por ensayo de enlace directo en membranas HL-60 y células enteras HL-60, así como ensayo de enlace competitivo en membranas HL-60. N = 3 excepto para * en donde N = 2.

La Figura 18 muestra las curvas de enlace para huMy9-6V1. 0. (A): enlace directo sobre membranas HL-60 (B): enlace directo en células enteras HL-60. (C): enlace competitivo en membranas HL-60.

La Figura 19 muestra una comparación de enlace de My9-6-DM1 con anticuerpo My9-6 en células HL-60.

La Figura 20 muestra la citotoxicidad in vitro de My9-6-DM1 hacia células tumorales humanas que expresan CD33.

La Figura 21 muestra los resultados de los experimentos de eficacia de My9-6-DM1 en ratones SCID que tienen xenoinjertos HL-60. Se evaluó el efecto de My9-6-DM1 (A) y anticuerpo My9-6 no modificado (C) en el crecimiento de los tumores HL-60. El peso

corporal del ratón fue monitoreado como una indicación de citotoxicidad (B, D).

La Figura 22 muestra una comparación de la eficacia de My9-6-DM1 con la medicina libre maitansina en ratones SCID que tienen xenoinjertos HL-60 (A). El peso corporal del ratón fue monitoreado como una indicación de toxicidad (B). Los tumores recurrentes en dos ratones tratados fueron tratados con un Segundo curso de My9-6-DM1.

Las Figuras 23 A & B muestran una comparación de la eficacia anti-tumoral de My9-6-DM1 con quimioterapia estándar en ratones SCID que tienen xenoinjertos HL-60 grandes (A). El peso corporal del ratón fue monitoreado como una indicación de toxicidad (B). Los tumores recaídos en dos ratones tratados fueron tratados nuevamente con un segundo curso de My9-6-DM1.

Las Figuras 24A & B muestran la eficacia anti-tumoral de My9-6-DM1 en comparación con ozogamicina Gentuzumab y quimioterapia estándar en un modelo HL-60 subsistente. Las células HL-60 fueron inyectadas por vía intravenosa dentro de los ratones SCID. Los tratamientos indicados se iniciaron 11 días después de la inyección de las células. Los tratamientos fueron por vía intravenosa diariamente x 5 excepto para la ozogamicina Gentuzumab (Q4Dx3).

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención proporciona un anticuerpo murina anti-CD33 novedoso y versiones humanizadas de este anticuerpo. Se

proporcionan además anticuerpos que comprenden uno o más de los CDRs del anticuerpo de murina anti-CD33 o versión humanizada del mismo que reconoce de manera específica y se enlaza a CD33.

5 **Anticuerpo de Murina My9-6**

El anticuerpo murina anti-CD33 de la presente invención, designado de manera variada en la presente como "My9-6", "murina My9-6" y "muMy9-6", está completamente caracterizado con respecto a la secuencia de aminoácido germline putativa de ambas regiones variables de cadena ligera y de cadena pesada (Figura 10), secuencias de aminoácido de ambas regiones variables de cadena ligera y pesada (Figuras 8A & B), la identificación de los CDRs (Figure 9), la identificación de aminoácidos de superficie (Figuras 13A & B), y medios para su expresión en forma recombinante.

Además el anticuerpo My9-6 ha sido caracterizado funcionalmente y mostró enlace con alta afinidad a CD33 en la superficie de células U-937 CD33-positivas (Figura 1). My9-6 etiquetado-121 I se enlaza a células U-937 y compitiendo con las células por medio de My9-6 no etiquetado y el anticuerpo My9 anti-CD33 caracterizado previamente (BioGenex, cat. no. 267M).

El término "región variable" se utiliza en la presente para describir ciertas porciones de las cadenas pesadas y de las cadenas ligeras del anticuerpo que difieren en secuencia entre los anticuerpos y que cooperan en el enlace y la especificidad de cada anticuerpo particular para su antígeno.

Usualmente la variabilidad no está distribuida de manera uniforme a través de las regiones variables del anticuerpo. De manera común está concentrada dentro de tres segmentos de una región variable llamada regiones de determinación complementaria (CDRs) o regiones hipervariables, tanto en las regiones variables de cadena ligera como de cadena pesada. Las porciones más altamente conservadas de las regiones variables reciben el nombre de regiones de estructura. Las regiones variables de cadenas pesada y ligera comprenden cuatro regiones de estructura, que adoptan en gran medida una configuración de hoja beta, con cada región de estructura conectada por las tres CDRs, las cuales forman ciclos que conectan la estructura de hoja beta, y en algunos casos forman parte de la estructura de hoja beta. Las CDRs en cada cadena son sostenidas en estrecha proximidad por las regiones de estructuras y con las CDRs de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de enlace de antígeno de los anticuerpos (E. A. Kabat et al. *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Fifth Edition, 1991, NIH).

The región "constante" no está involucrada directamente en el enlace de un anticuerpo a un antígeno, aunque exhibe varias funciones del determinante, tal como la participación del anticuerpo en la toxicidad celular dependiente de anticuerpo.

Anticuerpo My9-6 Humanizado

Se han preparado también las versiones humanizadas de My9-

24
23

6, designadas de manera variada en la presente como "huMy9-6", y "My9-6 humanizado".

El objetivo de la humanización es una reducción en la inmunogenicidad de un anticuerpo xenogénico, tal como el anticuerpo de murina, para la introducción en un ser humano, en tanto que mantiene la afinidad de enlace de antígeno completa y la especificidad del anticuerpo.

Los anticuerpos humanizados pueden ser producidos utilizando varias tecnologías tales como recubrimiento e injerto de CDR. Como se utiliza en la presente, la tecnología de recubrimiento emplea una combinación de modelado molecular, análisis estadístico y mutagénesis para alterar las superficies no-CDR de las regiones variables del anticuerpo para asemejarse a las superficies de anticuerpos conocidos del huésped meta.

Las estrategias y métodos para el recubrimiento de anticuerpos y otros métodos para reducir la inmunogenicidad de los anticuerpos dentro de un huésped diferente, se describen en la Patente de los Estados Unidos de Norteamérica 5,639, 841 (Pedersen et al.), la cual está incorporada a la presente en su totalidad mediante referencia. En pocas palabras, en un método preferido, (1) se generan alineaciones de posición de un depósito de regiones variables de cadena pesada y de cadena ligera de anticuerpo para proporcionar un conjunto de posiciones expuestas de superficie de estructura de región variable de cadena pesada y ligera en donde las posiciones de alineación para todas las regiones variables son por lo menos aproximadamente 98% idénticas; (2) se define un conjunto de

25
24

residuos de aminoácido expuestos de superficie de estructura de región variable para un anticuerpo de roedor (o fragmento del mismo); (3) se identifica un conjunto de residuos de aminoácido expuestos de superficie de estructura de región variable de cadena pesada y ligera que son más estrechamente idénticos al conjunto de residuos de aminoácido expuestos de superficie de roedor; (4) el conjunto de residuos de aminoácido expuestos de superficie de estructura de región variable de cadena pesada y ligera definidos en la etapa (2) es sustituido con el conjunto de residuos de aminoácido expuestos de superficie de estructura de región variable de cadena pesada y ligera identificados en la etapa (3), excepto para aquellos residuos de aminoácido que están dentro de 5A de cualquier átomo de cualquier residuo de las regiones de determinación complementarias del anticuerpo de roedor; y (5) se produce el anticuerpo de roedor humanizado que tiene especificidad de enlace.

Los anticuerpos pueden ser humanizados utilizando una variedad de otras técnicas incluyendo injerto CDR (EP 0 239 400; WO 91/09967; Patentes de los Estados Unidos de Norteamérica Nos. 5,530, 101; y 5,585, 089), revestimiento o recubrimiento (EP 0 592 106; EP 0 519 596; Padlan E. A., 1991, Molecular Immunology 28 (4/5): 489-498; Studnicka G. M. et al., 1994, Protein Engineering 7 (6): 805-814; Roguska M. A. et al., 1994, PNAS 91: 969-973), y redistribución de cadena (Patente de los Estados Unidos de Norteamérica No. 5,565, 332). Los anticuerpos humanos pueden ser generados a través de una variedad de métodos conocidos en la técnica incluyendo métodos de despliegue de fago. Véanse también

las Patentes de los Estados Unidos de Norteamérica Nos. 4,444, 887,4, 716,111, 5,545, 806, y 5,814, 318; y los números de publicación de solicitud de patente internacional WO 98/46645, WO 98/50433, WO 98/24893, WO 98/16654, WO 98/34096, WO 96/33735, y WO 91/10741 (dichas referencias incorporadas a la presente mediante referencia en su totalidad).

Como se describe de manera adicional en la presente, las CDRs de My9-6 fueron identificadas por medio de modelado y se pronosticaron sus estructuras moleculares. Los anticuerpos My9-6 humanizados fueron preparados después y han sido completamente caracterizados. Las secuencias de aminoácido de las cadenas ligera y pesada de un número de anticuerpos huMy9-6 se muestran en la Figura 16A y 16B. Los valores de enlace comparativos para anticuerpos de murina y My9-6 humanizados se proporcionan en la Figura 17. Las curvas de enlace se muestran en la Figura 18.

Fragmentos de Enlace de Epitope de los Anticuerpos My9-6

Aunque los fragmentos de enlace de epítipo del anticuerpo My9-6 de murina y los anticuerpos My9-6 humanizados se describen en la presente por separado del anticuerpo My9-6 de murina y las versiones humanizadas del mismo, se comprende que el término "anticuerpo" o "anticuerpos" de la presente invención pueden incluir tanto los anticuerpos muMy9-6 de longitud completa como los huMy9-6 así como los fragmentos de enlace de epitope de esos anticuerpos.

Como se utilizan en la presente, "fragmentos de anticuerpo"

incluyen cualquier porción de un anticuerpo que retiene la habilidad enlazarse a CD33, denominados de manera general como "fragmentos de enlace de epítotope." Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen de manera preferible, pero sin limitarse a, Fab, Fab' y F(ab')₂, Fd, Fvs (scFv) de cadena simple, anticuerpos de cadena simple, Fvs (sdFv) enlazados con disulfuro y fragmentos que comprenden ya sea un dominio V_L o V_H. Los fragmentos de enlace de epítotope, que incluyen anticuerpos de cadena simple, pueden comprender la(s) región(es) variable(s) sola(s) o en combinación con la totalidad o una porción de la siguiente: región de articulación, dominios C_H1, C_H2, y C_H3.

Dichos fragmentos pueden contener uno o ambos fragmentos Fab o el fragmento F(ab')₂. De manera preferible, los fragmentos de anticuerpo contiene las seis CDRs del anticuerpo completo, aunque los fragmentos que contienen menos de dichas regiones, por ejemplo tres, cuatro o cinco CDRs, también son funcionales. Además, los equivalentes funcionales pueden ser o pueden combinar miembros de una de las siguientes clases de inmunoglobulina: IgG, IgM, IgA, IgD, o IgE, y las subclases de las mismas.

Los fragmentos Fab y F(ab')₂ pueden ser producidos por medio de división fotovoltáica, utilizando enzimas tales como papaina (fragmentos Fab) o pepsina (fragmentos F(ab')₂).

Los fragmentos FVs (scFvs) de cadena simple son fragmentos de enlace de epítotope que contienen por lo menos un fragmento de una región variable de cadena pesada de anticuerpo (V_H) enlazada a por lo menos un fragmento de una región variable de cadena ligera

de anticuerpo (V_L). El enlazador puede ser un péptido flexible corto seleccionado para asegurar que el doblamiento tridimensional adecuado de las regiones (V_L) y (V_H) ocurra una vez que están enlazados a fin de mantener la especificidad de enlace de la molécula de objetivo del anticuerpo completo a partir del cual se deriva el fragmento de anticuerpo de cadena simple. El término carboxilo de la secuencia (V_L) o (V_H) puede ser enlazado en forma covalente por un enlazador al término aminoácido de una secuencia complementaria (V_L) y (V_H). Los fragmentos de anticuerpo de cadena simple pueden ser generados por medio de clonación molecular, biblioteca de despliegue de fago del anticuerpo o técnicas similares bien conocidas por el técnico experimentado. Esas proteínas pueden ser producidas por ejemplo, en células eucarióticas o células procarióticas, incluyendo bacteria.

Los fragmentos de enlace de epítipo de la presente invención pueden generarse utilizando varios métodos de despliegue de fago conocidos en la técnica. En los métodos de despliegue de fago, los dominios de anticuerpo funcional son exhibidos en la superficie de las partículas de fago que portan las secuencias de polinucleótido que las codifican. En particular, dicho fago puede ser utilizado para exhibir los dominios de enlace de epítipo expresados a partir de una biblioteca de anticuerpo de combinación o repertorio (e. g., humano o murina). El fago que expresa un dominio de enlace de epítipo que enlaza el antígeno de interés se puede seleccionar o identificar con antígeno, por ejemplo, utilizando CD33 etiquetado o CD33 enlazado o capturado por una superficie o lecho sólido. El fago usado en esos

29
28

métodos es típicamente el fago filamentosos que incluye dominios de enlace fd y M13 expresados a partir del fago con dominios de anticuerpo Fab, Fv o FV estabilizados con disulfuro fusionados de manera recombinante al gen de fago III o proteína VIII de fago.

5 Ejemplos de métodos de despliegue de fago que se pueden utilizar para formar los fragmentos de enlace de epítipo de la presente invención incluyen aquellos descritos en Brinkman et al., 1995, J. Immunol. Methods 182: 41-50; Ames et al., 1995, J. Immunol. Methods 184: 177-186; Kettleborough et al., 1994, Eur. J. Immunol. 24: 952-958; Persic et al., 1997, Gene 187: 9-18; Burton et al., 1994, Advances in Immunology 57: 191-280; solicitud PCT No. PCT/GB91/01134; publicaciones PCT WO 90/02809; WO 91/10737; WO 92/01047; WO 92/18619; WO 93/11236; WO95/15982; WO 95/20401; y Patentes de los Estados Unidos de Norteamérica. Nos. 10 5,698, 426; 5,223, 409; 5,403, 484; 5,580, 717; 5,427, 908; 5,750, 753; 5,821, 047; 5,571, 698; 5,427, 908; 5,516, 637; 5,780, 225; 15 5,658, 727; 5,733, 743 y 5,969, 108; cada una de las cuales está incorporada en la presente mediante referencia en su totalidad.

Después de la selección de fago, las regiones de la 20 codificación de fago los fragmentos pueden ser aislados y utilizados para generar los fragmentos de enlace de epítipo a través de la expresión en un huésped seleccionado, incluyendo células de mamífero, células de insecto, células vegetales, levadura, y bacteria, utilizando tecnología ADN recombinante, por ejemplo, como se describe en detalle a continuación. Por ejemplo, las técnicas para 25 producir de manera recombinante los Fab, Fab' y F(ab')₂ también se

pueden emplear usando métodos conocidos en la técnica tales como aquellos descritos en la publicación PCT WO 92/22324; Mullinax et al., 1992, BioTechniques 12 (6): 864-869; Sawai et al., 1995, AJRI 34: 26-34; and Better et al., 1988, Science 240: 1041-1043; dichas referencias incorporadas mediante referencia en su totalidad. Los ejemplos de técnicas que se pueden utilizar para producir Fvs de cadena simple y anticuerpos incluyen aquellos descritos en las Patentes de los Estados Unidos de Norteamérica Nos. 4,946, 778 y 5,258, 498; Huston et al., 1991, Methods in Enzymology 203: 46-88; Shu et al., 1993, PNAS 90 : 7995-7999; Skerra et al., 1988, Science 240: 1038-1040.

Equivalentes Funcionales

Incluidos también dentro del alcance de la invención están los equivalentes funcionales del anticuerpo My9-6 y los anticuerpos My9-6 humanizados. El término "equivalentes funcionales" incluye anticuerpos con secuencias homólogas, anticuerpos quiméricos, anticuerpo modificado y anticuerpos artificiales, por ejemplo, en donde cada equivalente funcional está definido por su habilidad para enlazarse a CD33. El técnico experimentado comprenderá que hay un traslape en el grupo de moléculas de nominadas "fragmentos de anticuerpo" y el grupo denominado "equivalentes funcionales".

Los anticuerpos con secuencias homólogas son aquellos anticuerpos con secuencias de aminoácido que tienen identidad u homología de secuencia con secuencias de aminoácido de los

anticuerpos de murina My9-6 y My9-6 humanizados de la presente invención. Preferentemente la identidad está con la secuencia de aminoácido de las regiones variables de los anticuerpos de murina My9-6 y My9-6 humanizados de la presente invención. "Identidad de secuencia" y "homología de secuencia" como se aplican para una secuencia de aminoácido en la presente está definida como una secuencia con por lo menos aproximadamente 90%, 91%, 92%, 93%, o 94% de identidad de secuencia, y de manera más preferible por lo menos de aproximadamente 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% de identidad de secuencia para otra secuencia de aminoácido, como se determinó, por ejemplo, por medio del método de búsqueda FASTA de acuerdo con Pearson and Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 2444-2448 (1988).

Como se utiliza en la presente, un anticuerpo quimérico es aquel en el cual diferentes porciones de un anticuerpo se derivan de diferentes especies animales. Por ejemplo, un anticuerpo que tiene una variación de región derivada de un anticuerpo monoclonal de murina se aparea con una región constante de inmunoglobulina. Los métodos para producir anticuerpos quiméricos están identificados en la literatura existente. Ver, por ejemplo, Morrison, 1985, *Science* 229:1202; Oi et al., 1986, *BioTechniques* 4:214; Gillies et al., 1989, *J. Immunol. Methods* 125:191-202; U.S. Pat. Nos. 5,807,715; 4,816,567; y 4,816,397, que están incorporadas a la presente mediante referencia en su totalidad.

Los anticuerpos artificiales incluyen fragmentos de scFV, diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos y mru (ver revisiones hechas

por Winter, G. y Milstein, C., 1991, *Naturaleza* 349: 293-299; Hudson, P. J., 1999, *Current Opinion in Immunology* 11: 548-557), cada una de las cuales tienen una habilidad de enlace antígeno. En el fragmento Fv de cadena simple (scFv), los dominios VH y VL de un anticuerpo están unidos por un péptido flexible. Por lo regular, este péptido de unión tiene una longitud de 15 residuos de aminoácidos. Si la unión es más pequeña, por ejemplo de 5 aminoácidos, se forman diacuerpos, que son reductores bivalentes de scFV. Si la unión se reduce a menos de tres residuos aminoácidos, se forman las estructuras trimérica y tetramérica que entonces se llaman triacuerpos y tetracuerpos respectivamente. La unidad de enlace más pequeña de un anticuerpo es una CDR, por lo regular CDR2 de la cadena pesada, el cual tiene el suficiente reconocimiento específico y el enlace que pueden ser utilizados por separado. Dicho fragmento se llama unidad de reconocimiento molecular o mru. Varios de esos mrus pueden unirse con pequeños péptidos de unión, y así formar una proteína de enlace artificial con mayor fuerza que un mru sencillo.

Los equivalentes funcionales de la presente solicitud también incluyen los anticuerpos modificados, por ejemplo, los anticuerpos modificados por el anexo covalente de cualquier tipo de molécula al anticuerpo. Por ejemplo, los anticuerpos modificados incluyen anticuerpos que han sido modificados, es decir, por glicosilación, acetilación, pegilación, fosforilación, amidación, derivatización por grupos de protección/bloqueo conocidos, descomposición proteolítica, unión a un ligando celular u otra proteína, etc. La unión

covalente no previene al anticuerpo de regenerar una respuesta anti-idiotípica. Estas modificaciones pueden llevarse a cabo por medio de conocidas técnicas, incluyendo, más no siendo las únicas, la descomposición química específica, la acetilación, la formilación, la síntesis metabólica de la tunicamicina, etc. Además, los anticuerpos modificados pueden contener uno o más aminoácidos no clásicos.

Los equivalentes funcionales pueden ser producidos al intercambiar diferentes CDR's producidos por diferentes cadenas dentro de diferentes estructuras. Asimismo, por ejemplo, es posible que existan diferentes clases de anticuerpos para un determinado grupo de CDR's en sustitución de diferentes clases de cadenas pesadas, donde, por ejemplo, se pueden producir isotipos y tipos de anticuerpos IgG1 4, IgM, IgA1-2, IgD, IgE. De igual manera, los anticuerpos artificiales dentro del alcance de la invención se pueden producir incrustando un grupo dado de CDR's dentro de una estructura completamente sintética.

Los equivalentes funcionales están listos para producirse por mutación, eliminación y/o inserción dentro de las secuencias de región constante y/o variable que flanquean una serie particular de CDRs, utilizando una gran variedad de métodos conocidos en el medio.

Los fragmentos de anticuerpos y los equivalentes funcionales de la presente invención incluyen esas moléculas con grado detectable de enlace a CD33, cuando se compara con el anticuerpo My9-6 de murina. Un grado detectable de enlace incluye todos los valores en un rango de por lo menos 10-100%, de preferencia de por

lo menos de 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o 99%, de la habilidad de enlace del anticuerpo My9-6 de murina para CD33.

Anticuerpos Mejorados

5

Las CDRs tienen una importancia primaria para el reconocimiento del epítoto y el enlace del anticuerpo. Sin embargo, los cambios pueden hacerse a los residuos que incluyen los CDRs sin interferir con la habilidad del anticuerpo para reconocer y enlazar su epítoto cognado. Por ejemplo, se pueden hacer los cambios que no afectan el reconocimiento del epítoto, sino que aumentan la afinidad de protección del anticuerpo para el epítoto.

10

Por lo tanto, existen versiones mejoradas tanto de la murina como de los anticuerpos humanizados también incluidas en el alcance de la presente invención, las cuales también reconocen específicamente y protegen al CD33, preferentemente con una afinidad incrementada.

15

Numerosos estudios han investigado los efectos de introducir uno o más cambios de aminoácidos en varias posiciones en una secuencia de un anticuerpo, basándose en el conocimiento de la secuencia primaria de anticuerpos y su propiedades tal como su enlace y nivel de expresión (Yang, W. P. et al., 1995, J. Mol. Biol., 254,392-403; Rader, C. et al., 1998, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95,8910-8915; Vaughan, T. J. et al., 1998, Nature Biotechnology, 16,535-539).

20

25

En estos estudios, las equivalencias de los anticuerpos

primarios han sido generados al cambiar las secuencias de la cadena de genes ligera y pesada en las CDR1, CDR2, CDR3, o regiones delimitadas, utilizando métodos como la mutagénesis dirigida-mediada por sitio-de oligonucléotido, mutagénesis de caseta, PCR propenso a error, redistribución de ADN, o cepas mutantes de *E. coli* (Vaughan, T. J. et al., 1998, *Nature Biotechnology*, 16,535-539; Adey, N. B. et al., 1996, Capítulo 16, pp. 277-291, en "Phage Display of Peptides and Proteins", Eds. Kay, B. K. et al., Academic Press). Estos métodos utilizados para cambiar la secuencia del anticuerpo primario han dado como resultado afinidades mejoradas de los anticuerpos secundarios (Gram, H. et al., 1992, *Proc. Natl. Acad.Sci.USA*, 89,3576-3580; Boder, E. T. et al., 2000, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97,10701-10705; Davies, J. and Riechmann, L., 1996, *Immunotechnology*, 2,169-179; Thompson, J. et al., 1996, *J. Mol.Biol.*, 256,77-88; Short, M. K. et al., 2002, *J. Biol. Chem.*, 277,16365-16370 Furukawa, K. et al., 2001, *J Biol. Chem.*, 276,27622-27628).

Por medio de una estrategia dirigida similar al cambiar uno o más residuos de aminoácidos del anticuerpo, las secuencias del anticuerpo descritas aquí pueden utilizarse para desarrollar anticuerpos anti-CD33 con funciones mejoradas, incluyendo una afinidad mejorada para el CD33.

Los anticuerpos mejorados también incluyen a aquellos anticuerpos que han mejorado características que son preparadas por técnicas estándares de inmunización animal, formación de hibridoma y selección para anticuerpos con características

específicas.

Inmunosconjugados

5 La presente invención también está dirigida a los
inmunosconjugados, incluyendo los anticuerpos, fragmentos de
anticuerpo, equivalencias funcionales, anticuerpos mejorados y sus
análogos como se describen aquí, enlazados a un fármaco o
profármaco. Los fármacos o profármacos preferidos son los agentes
10 citotóxicos e incluyen, por ejemplo, los maitansinoides y
maitansinoides análogos, taxoides, CC-1065 y CC-1065 análogos,
dolastatina y análogos de dolastatina.

15 Los inmunosconjugados se pueden preparar con métodos *in vitro*. Para poder unir un fármaco o profármaco a un anticuerpo, se
utiliza un grupo de unión. Los grupos de enlace adecuados son bien
conocidos en la técnica e incluyen los grupos disulfuros, grupos
tioéter, grupos lábiles de ácido, grupos foto lábiles, grupos hábiles
de peptidasa y grupos esterasa lábiles. Los grupos de enlace
preferidos son los grupos disulfuros y los grupos tioéter. Por
20 ejemplo, los conjugados se pueden construir utilizando una reacción
de cambio de disulfuro o formando una unión entre el anticuerpo y el
fármaco o profármaco.

25 Los maitansinoides y los maitansinoides análogos se
encuentran entre los agentes citotóxicos recomendados. Algunos
ejemplos de maitansinoides recomendados incluyen el maitansinol y
el maitansinol análogo. Los maitansinoides recomendados se

encuentran descritos en las Patentes de los Estados Unidos de Norteamérica Nos. 4,424, 219; 4,256, 746; 4,294, 757; 4,307, 016; 4,313, 946; 4,315, 929; 4,331,598;4,361,650;4,362, 663; 4,364, 866; 4,450, 254; 4,322, 348; 4,371,533;6,333,410;5,475,092;5,585, 499; y 5,846, 545.

Con respecto a los maltansinoides, el grupo de enlace puede comprender un grupo químico reactivo. En la realización de la invención recomendada, el grupo del reactivo químico puede estar covalentemente unido al maltansinoide por medio de una mitad de enlace de disulfuro.

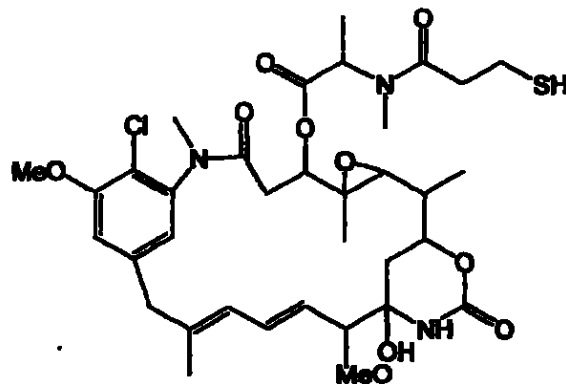
Los grupos químicos reactivos recomendados en particular son el éter de N-succinimidilo y el éter de N-sulfosuccinimidilo.

Los maltansinoides recomendados en particular que comprenden un grupo de enlace que contiene un grupo químico reactivo son los éteres C-3 de maltansinol y sus análogos donde la porción de enlace contiene un enlace de disulfuro y el grupo químico reactivo incluye un éter de N-succinimidilo o un éter de N-sulfosuccinimidilo.

Muchas posiciones en los maltansinoides pueden servir como la posición para llevar a cabo el enlace químicamente de una porción de enlace. Por ejemplo, se espera que tanto la posición C-3 que tiene un grupo hidroxilo, la posición C-14 modificada con hidroximetilo, la posición C-15 modificada con hidroxilo como la posición C-20 que tiene un grupo hidroxilo sean útiles. Sin embargo, se recomiendan especialmente tanto la posición C-3 como la posición C-3 del maltansinol.

Otros enlaces químicos incluyen los enlaces de ácidos lábiles, enlaces fotolábiles, enlaces péptidos lábiles y enlaces de esterasa lábiles. La descripción de la Patente de los Estados Unidos de Norteamérica No. 5,208, 020, anexa, muestra la producción de maitansinoides que tienen dichos enlaces.

Como se describe con detalle más adelante, el inmunoconjugado My9-6-DM1 utiliza maitansinoide que contiene tior (DM1). El DM1 está representado por la siguiente fórmula estructural (1):



(1)

Los taxanos son agentes citotóxicos recomendados. Los taxanos adecuados para utilizarse en la presente invención están divulgados en las patentes de los Estados Unidos de Norteamérica Nos. 6,372, 738 y 6,340, 701.

Los conjugados de los taxanos de la invención y un agente protector de célula se pueden formar utilizando cualquiera de las técnicas conocidas hasta ahora o desarrolladas más adelante. En USP 5,416, 064 y USP 5,475, 092 se enseñan numerosos métodos de conjugación.

El CC-1065 y sus análogos son fármacos citotóxicos recomendados para uso en la presente invención. CC-1065 y sus

análogos se encuentran descritos en las Patentes de los Estados Unidos de Norteamérica No. 6,372, 738; 6,340, 701; 5,846, 545; y 5,585, 499. CC-1065 es un potente antibiótico anti-tumoral aislado del caldo de cultivo del *Streptomyces zelensis*. CC-1065 es aproximadamente 1000-veces más potente *in vitro* que los fármacos anti-cancerígenos usados comúnmente, como la doxorubicina, metotrexato y vincristina (B.K. Bhuyan et al, Cancer Res., 2, 3532-3537(1982)).

También los fármacos como el metotrexato, daunorubicina, doxorubicina, vincristina, vinblastina, melfalan, mitomicina C, clorambucil, caliqueamicina, dolastatina y análogos de dolastatina son apropiados para la preparación de conjugados. Las moléculas de los fármacos también pueden unirse a las moléculas de los anticuerpos a través de una molécula de acarreo intermediaria como el suero de albúmina.

Inhibición del crecimiento de células que expresan CD-33

En la presente invención también se incluyen métodos para inhibir el crecimiento de las células que expresan CD33. Estos métodos utilizan los anticuerpos o Inmunoconjugados de la presente invención, así como los anticuerpos o inmunoconjugados de la presente invención en conjunto con uno o más agentes terapéuticos adicionales. Los agentes terapéuticos apropiados incluyen a aquellos que inhiben directa o indirectamente el crecimiento de la célula de expresión CD33.

Como se utilizan en la presente los términos "inhibir" e "inhibición" se deberá entender que incluyen cualquier efecto inhibidor en el crecimiento de la célula incluyendo la muerte de la célula. Los efectos inhibidores incluyen efectos secundarios, efectos sostenidos y efectos permanentes

Aplicaciones Terapéuticas

La presente invención también incluye las aplicaciones terapéuticas de los anticuerpos o inmunoconjugados de la presente invención donde los anticuerpos o inmunoconjugados pueden ser administrados a un sujeto, en una dosis farmacéuticamente aceptable. Pueden ser administradas vía intravenosa como un bolo o mediante una infusión continua por un período, vía intramuscular, subcutánea, intra-articular, intrasinovial, intratecal, oral, topical, o por rutas de inhalación. También pueden administrarse por ruta intratumoral, peritumoral, intralesional o perilesional, para ejercer efectos locales así como efectos terapéuticos sistémicos.

Una dosis farmacéuticamente aceptable generalmente incluiría un agente farmacéuticamente aceptable como un portador, un diluyente y un excipiente. Estos agentes son bien conocidos y el agente más apropiado lo determinarán aquellos expertos en la materia conforme la situación clínica lo garantice. Algunos ejemplos de portadores, diluentes y/o excipientes adecuados incluyen: (1) El PBS (solución salina regulada con fosfato de Dubelcco), pH - 7.4 aproximadamente, que contiene aproximadamente 1 mg/ml a 25

mg/ml suero de albúmina humana, (2) 0.9% solución salina (0.9% w/v NaCl), y (3) 5% (w/v) dextrosa.

En otras aplicaciones terapéuticas, los anticuerpos o inmunoconjugados de la invención son co-administrados con uno o más agentes terapéuticos adicionales. Los agentes terapéuticos son aquellos agentes que buscar matar o limitar el crecimiento de las células cancerígenas haciendo el mínimo daño posible al huésped. De este modo, dichos agentes pueden aprovecharse de cualquier diferencia en las propiedades de las células cancerígenas (por ejemplo, metabolismo, vascularización, presentación antígeno con superficie celular) en contraste con las células sanas del huésped. Las diferencias en la morfología del tumor son situaciones potenciales para una intervención. Por ejemplo, el agente terapéutico puede ser un anticuerpo como un anticuerpo anti-VEGF que es útil para retardar la vascularización del interior de un tumor sólido, por lo que disminuye su rango de crecimiento.

Los agentes terapéuticos adecuados incluyen, más no están limitados a otros, agentes citotóxicos o citoestáticos. El Taxol es un agente terapéutico preferido que también es un agente citotóxico. Otros agentes terapéuticos incluyen, más no están limitados a otros, adjuntos como el granisetron HCl, inhibidores andrógenos como el acetato de leuprolida, antibióticos como doxorubicina, antiestrógenos como el tamoxifen, antimetabolitos como el interferón alfa-2a, inhibidores de enzimas como el inhibidor de ras farnesil-transferasa, inmunomoduladores como aldesleuquina, y derivados de mostaza del nitrógeno como el melfalan HCl, y otros similares.

Cuando se presenta en una forma de dosis acuosa, en vez de liofilizada, el anticuerpo por lo regular se formula en una concentración de aproximadamente 0.1 mg/ml a 100 mg/ml, aunque se permite amplia variación fuera de los rangos. Para el tratamiento de la enfermedad, la dosis de anticuerpo o conjugado apropiada dependerá del tipo de enfermedad a ser tratada, como se definió anteriormente, la gravedad y curso de la enfermedad, ya sea que los anticuerpos sean administrados con fines preventivos o terapéuticos, el curso de la terapia previa, la historia clínica del paciente y su respuesta al anticuerpo, y la discreción del médico que atiende. El anticuerpo es susceptible de administrarse al paciente de una sola vez o en una serie de tratamientos.

Dependiendo del tipo y gravedad de la enfermedad, la dosis a administrar como inicial al paciente será de aproximadamente 0.015 a 15 mg. de anticuerpo/kg. del peso del paciente, ya sea, por ejemplo, en una o más administraciones por separado, o por infusión continua. Para administraciones repetidas durante varios días o prolongadas, dependiendo de la condición, el tratamiento se repite hasta que ocurra una supresión deseada de los síntomas de la enfermedad. Sin embargo, no se excluye poder utilizar otras dosis útiles para el tratamiento.

Las aplicaciones terapéuticas de la presente invención incluyen métodos para tratar un sujeto con una enfermedad. Las enfermedades que se tratan con los métodos de la presente invención son aquellas que se caracterizan por la expresión de CD33. Dichas enfermedades incluyen síndromes mielodisplásicos

(MDS) y cánceres como la leucemia mieloide aguda (AML), la leucemia mieloide crónica (CML), y la leucemia pro-mielocítica (PML). Los expertos entenderán que los métodos de la presente invención también pueden ser utilizados para tratar otras enfermedades que se describen más adelante caracterizadas por la expresión de CD33.

Las aplicaciones terapéuticas de la presente invención también pueden practicarse *in vitro* y *ex vivo*

Algunos ejemplos de los usos *in vitro* incluyen la purificación de poblaciones de células contaminadas con células CD33 positivas como lo son las de la línea mieloide. El método consiste en cultivar las poblaciones de células en presencia de un inmunocóncugado citotóxico My9-6 y después quitar las células CD33 positivas muertas. Las condiciones para utilizar un *in vitro* no clínico son bien conocidas (ver, e. g., Uckun et al, 1986, JExp. Med. 163,347-368; Uckun et al., 1985, J; Immunol. 134, 3504-3515; Ramakrishnan et al., 1985, J Immunol. 3616-3622).

Ejemplos del uso clínico *ex vivo* incluye el tratamiento de la médula ósea autóloga antes de aplicar la infusión en el mismo paciente para eliminar las células mieloides malignas o enfermas (Roy D. C. et al., 1995, J. Clin. Immunol. 15, 51-57).

Aplicaciones del Diagnóstico e Investigación

Además de los usos terapéuticos de los anticuerpos discutidos aquí, los anticuerpos de la presente invención se pueden emplear en

muchos diagnósticos conocidos y aplicaciones de investigación. Los anticuerpos de la presente invención pueden utilizarse, por ejemplo, en la purificación, detección, y señalamiento del CD33, incluido tanto en el método de diagnóstico *in vitro* como *in vivo*. Por ejemplo, los anticuerpos se pueden utilizar en inmuno ensayos para medir los niveles cuantitativos y cualitativos del CD33 expresado por las células en muestras biológicas. (Ver, por ejemplo., Harlow et al., Antibodies: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. 1988), incorporada aquí mediante referencia en su totalidad.

Los anticuerpos de la presente invención se pueden utilizar, por ejemplo, en ensayos de enlaces competitivos, ensayos de intercalación directos e indirectos, y ensayos de inmunoprecipitación (Zola, Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques, pp. 147-158 (CRC Press, Inc., 1987).

Los anticuerpos de la invención también son útiles para la formación de imagen *in vivo*, en donde un anticuerpo etiquetado con una mitad detectable como un agente radio-opaco o radio isótopo es administrado a un sujeto, de preferencia dentro del torrente sanguínea, y se ensaye la presencia y localización del anticuerpo etiquetado en el huésped. Esta técnica de formación de imagen es útil en las etapas y el tratamiento de las enfermedades. El anticuerpo puede etiquetarse con una porción que es detectable en el huésped, ya sea por medio de resonancia magnética nuclear, radiología, u otros medios de detección conocidos en el medio.

La etiqueta puede ser cualquier porción detectable que sea

capaz de producir, tanto directa como indirectamente, una señal detectable. Por ejemplo, la etiqueta puede ser una etiqueta de biotina, una clasificación de enzimas (e. g., luciferasa, fosfatasa alcalina, beta-galactosidasa y peroxidasa de rábano), una radio-clasificación (e. g., ^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S , y ^{125}I), un fluoroforo como el del compuesto fluorescente o quimioluminiscente (e. g., fluorescino isotiocianato, rodamina), un agente de formación de imagen (e. g., Tc-m99 y indio (1 t ln)) y un ion metálico (e. g., galio and europio).

Se puede utilizar cualquier método conocido en la técnica para conjugar el anticuerpo para la etiqueta, incluyendo aquellos métodos descritos por Hunter, et al., 1962, *Nature* 144: 945; David et al., 1974, *Biochemistry* 13: 1014; Pain et al., 1981, *J. Immunol. Meth.* 40:219; Nygren, J., 1982, *Histochem. and Cytochem.* 30:407.

Los anticuerpos de la invención también son útiles como agentes de purificación de afinidad. En este proceso, los anticuerpos son inmovilizados en un soporte adecuado, como una resina Sephadex o papel filtro, utilizando métodos bien conocidos en el medio. Por lo tanto, el CD33 puede aislarse y purificarse a partir de una muestra biológica.

Polinucleótidos, Vectores, Células Huésped y Métodos para crear Anticuerpos

La presente invención proporciona además polinucleótidos que comprenden una secuencia de nucleótido que codifica un anticuerpo de la invención o fragmentos de enlace de epítipo.

La presente invención también abarca polinucleótidos que codifican polipéptidos que pueden enlazar CD33 y que hibridicen bajo condiciones de hibridización rigurosa a los polinucleótidos que codifican un anticuerpo de la presente invención, en donde las mencionadas condiciones de hibridización rigurosa incluyen: pre-hibridización por 2 horas a 60°C en 6x SSC, 0.5% SDS, 5x solución de Denhardt, y 100 mg/ml de ADN del esperma de salmón desnaturalizado por calor; hibridización por 18 horas a 60°C, lavado dos veces en 4x SSC, 0.5% SDS, 0.1% de pirofosfato de sodio, por 30 min. A 60°C y dos veces en 2x SSC, 0.1% SDS por 30 min. a 60°C.

Los polinucleótidos se pueden obtener, y determinar la secuencia de nucleótidos de los polinucleótidos, con cualquier método conocido en el medio. Por ejemplo, si se conoce la secuencia de nucleótidos del anticuerpo, un polinucleótido que codifica el anticuerpo se puede ensamblar desde oligonucleótidos químicamente sintetizados (es decir, como se describe en Kutmeier et al., 1994, *BioTechniques* 17: 242) lo cual, brevemente, involucra la síntesis de oligonucleótidos traslapantes que contienen porciones de la secuencia que codifica al anticuerpo, recocido y ligación de esos oligonucleótidos, y la amplificación de los oligonucleótidos ligados por PCR.

Los métodos para la construcción de vectores recombinantes que contienen secuencias que codifican anticuerpos y señales de control transcripcional y translacional apropiadas son bien conocidos en el medio. Estos métodos incluyen, por ejemplo, técnicas de ADN

recombinante *in vitro*, técnicas sintéticas y recombinación genética *in vivo*. Por lo tanto la invención, proporciona vectores reproducibles que incluyen una secuencia de nucleótido que codifica una molécula de anticuerpo de la presente invención, o un dominio variable de una cadena ligera o pesada, o un fragmento de enlace de epítipo de cualquiera de estas, operablemente enlazada a un promotor.

El vector recombinante se transfiere a una célula huésped con técnicas convencionales y las células transfectadas se cultivan entonces con técnicas convencionales para producir un anticuerpo de la invención. Por lo tanto, la invención incluye células huésped que contienen un polinucleótido que codifica un anticuerpo de la invención, o un fragmento de enlace de epítipo, operablemente enlazado a un promotor heterólogo. En modalidades preferidas, los vectores que codifican tanto las cadenas pesadas como ligeras pueden ser co-expresados en la célula huésped por la expresión de una molécula de inmunoglobulina entera.

Se pueden utilizar una variedad de vectores de expresión del huésped para expresar las moléculas del anticuerpo de la invención. Dichos sistemas de expresión de huésped representan vehículos por los que se pueden producir secuencias de codificación de interés y subsecuentemente purificadas, pero también representa células que pueden, cuando se transforman o transfectan con las secuencias de codificación de nucleótido apropiadas, expresar una molécula anticuerpo de la invención *in situ*. Esto incluye, más no se limita, a los microorganismos como las bacterias (e.g. *E. coli*, *B. subtilis*) transformadas con un bacteriófago recombinante ADN, vectores de

expresión de ADN plásmido o ADN cósmido que contienen
secuencias de codificación de anticuerpo; levadura (e. g.,
Saccharomyces, Pichia) transformada con vectores de expresión de
levadura recombinante que contiene secuencias de codificación de
anticuerpo; sistemas de células de insectos infectadas con vectores
de expresión de virus recombinante (e. g., baculovirus) que contiene
secuencias de codificación de anticuerpo; sistemas de células
vegetales infectadas con vectores de expresión de virus
recombinantes (e. g., virus de mosaico de coliflor, CaMV; virus de
mosaico de tabaco, TMV) o transformados con vectores de expresión
plasmida recombinante (e. g., T1 plasmida) que contienen secuencias
de codificación de anticuerpo; o sistemas de células de mamífero
(e.g., células COS, CHO, BHK, 293,3T3) albergando construcciones
de expresión recombinante que contiene promotores derivados del
genoma de las células de mamífero (e. g., promotor de
metalotioneína) o a partir de virus de mamífero (e. g., el promotor
tardío de adenovirus; el promotor 7.5K del virus vaccinia).

Preferentemente, las células bacteriales como la *Escherichia coli*, y preferentemente mejor, las células eucarióticas, en especial
de la expresión de toda la molécula del anticuerpo recombinante, se
utilizan para la expresión de una molécula del anticuerpo
recombinante. Por ejemplo, las células de mamífero como las células
de los ovarios del cobayo chino (CHO), junto con un vector como el
principal elemento promotor del gen temprano intermediario del
citomegalovirus humano es un sistema de expresión efectivo para los
anticuerpos (Foecking et al., 1986, Gene 45:101; Cockett et al.,

1990, Bio/Technology 8: 2).

Para la producción de alto rendimiento a largo plazo de proteínas recombinantes, se prefiere una expresión estable. Por ejemplo, Se pueden diseñar líneas de células que expresen establemente la molécula de anticuerpo. En vez de utilizar vectores de expresión que contengan orígenes virales de reproducción, las células huésped se pueden transformar con ADN controlado por elementos de control de expresión adecuados (e.g. promotor, mejorador, secuencias, terminales de transcripción, sitios de poladenilación, etc.) y un marcador seleccionable. Siguiendo con la introducción del ADN extraño, se puede permitir que las células diseñadas crezcan durante 1 a 2 días en un medio enriquecido, y después sean cambiadas a un medio selectivo. El marcador seleccionable en el plásmido recombinante confiere resistencia a la selección y permite que las células se integren de manera estable al plásmido dentro de sus cromosomas y crezcan para formar focos que a su vez pueden ser clonados y expandidos en las líneas de células. Este método puede ser utilizado de manera ventajosa para diseñar líneas de células que expresen la molécula del anticuerpo. Dichas líneas de células diseñadas pueden ser particularmente útiles en el tamizado y evaluación de los compuestos que interactúan directa o indirectamente con la molécula del anticuerpo.

Una vez que la molécula del anticuerpo ha sido expresada recombinantemente, puede ser purificada por un método conocido en la técnica de purificación de una molécula de hemoglobina, por ejemplo, por cromatografía (e.g. intercambio de iones, afinidad,

particularmente por afinidad con el antígeno específico después de la Proteína A y cromatografía de columna de dimensionamiento) centrifugación, solubilidad diferencial, o por cualquier técnica estándar para la purificación de proteínas.

5

EJEMPLOS

La invención se describe ahora mediante referencia a los siguientes ejemplos, que son únicamente ilustrativos, y no pretenden limitar la presente invención.

10

Ejemplo 1. Anticuerpo de murina My9-6

En este primer ejemplo, se muestra la estructura completa de aminoácido primaria y la secuencia cADN del anticuerpo My9-6 de murina, junto con sus propiedades de enlace y medios de expresión en forma recombinante. Por consiguiente, se proporciona una descripción completa de un anticuerpo de la invención y su preparación, tal como un experto en las técnicas inmunológicas podría preparar dicho anticuerpo sin experimentación indebida.

15

20

1.1. Generación, Producción y Caracterización del Anticuerpo My9-6

Se utilizó una línea de célula de fibroblasto de murina A 3T3 transfectada con el antígeno CD33 para la inmunización

25

Los ratones hembra BALB/c, de 5 meses de edad, fueron inmunizados intraperitonealmente en el día 0 con la línea de células de fibroblasto de murina 3T3 transfectada (2.5×10^5 células, suspendidas en 0.2 mL PBS). Los animales fueron estimulados con 0.2 mL de suspensión de células como sigue: día 13, 5×10^5 células; día 21, 5×10^5 células. En el día 24, un ratón fue sacrificado y se le extirpo el bazo.

El bazo se colocó entre dos placas de vidrio congeladas para obtener una suspensión celular simple, que fue lavada con penicilina conteniendo medio RPMI libre de suero y estreptomicina. La pella de célula de bazo fue suspendida nuevamente en 10 mL de 0.83% (p/v) solución de cloruro de amonio en agua por 10 minutos sobre hielo para lisar las células de glóbulos rojos, y después fue lavada con un medio libre de suero (SFM). Las células del bazo (1.6×10^6) fueron depositadas con células de mieloma (5.4×10^7) a partir de la línea de células de mieloma del ratón no secretor P3X63Ag8.653 (ATCC, Rockville, MD; cat. no. CRL1580) en un tubo, y lavadas con el medio sin suero RPMI-1640 (SFM). El sobrenadante se removió y la pella de célula se diluyó a 2×10^7 células/mL. Las células fueron puestas en placas de 2×10^7 células/placa sobre placas de cultivo de tejido que están cubiertas con 15 mg/mL de concanavalina A. Las placas fueron incubadas durante una hora a 37°C. El sobrenadante fue removido cuidadosamente desde las placas. Se le agregó por goteo lentamente un ml. de solución de polietilen glicol (40% PEG p/v). Las placas fueron giradas e incubadas por 30 segundos. Se removió el PEG y se desechó. Las placas se lavaron dos veces agregando

5 lentamente 5 ml de SFM y después se desecha la solución. Después
del lavado final, se agregaron 5 ml de SFM complementado con 5%
de Suero Fetal Bovino (FBS) Las placas se dejaron incubando por la
noche a 37°C. Después de la incubación, las células fueron raspadas
desde las placas con un raspador de células y depositadas. Las
placas fueron enjuagadas y depositadas con las células. Las células
fueron formadas en pella por centrifugación y suspendidas
nuevamente en un medio de crecimiento RPMI-1640 adicionado con
FBS al 5%, penicilina-estreptomicina e
10 hipóxantina/aminopterina/timidina (HAT). Las células fueron
acomodadas en placas en 2×10^5 células/pozo en placas de cultivo de
tejido de fondo plano de 96 pozos conteniendo una capa
alimentadora de macrófago. Las condiciones generales utilizadas
para la inmunización y producción de hibridoma son como las
15 describen J. Langone and H. Vunakis (Eds., Methods in Enzymology,
Vol. 121, "Immunochemical Techniques, Part I"; 1986; Academic
Press, Florida) y E. Harlow y D. Lane ("Antibodies: A Laboratory
Manual"; 1988; Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York).
Otras técnicas de inmunización y producción de hibridoma también
20 pueden utilizarse como lo saben aquellos con experiencia en la
técnica.

Los cultivos sobrenadantes de clones de hibridoma fueron
tamizados mediante enlace con células transfectadas con el antígeno
CD33 y la línea de células linfoma histiocítico humano, U-937 (ATCC
25 CRL-1953.2) y por falta de enlace a una línea de célula de
fibroblasto de ratón. Estos clones fueron expandidos y subclonados.

52

Los cultivos de sobrenadantes de los subclones fueron tamizados adicionalmente por medio de los ensayos de enlace antes mencionados. Por este procedimiento, el subclon 3E7-H2-3D8 (My9-6) fue seleccionado, y la cadena pesada y ligera de genes fue clonada y secuenciada como se describe más adelante.

El tamizado de los sobrenadantes de hibridoma para enlaces específicos para el antígeno CD33 se lleva a cabo utilizando ELISA en las líneas de células que expresan este antígeno y en una línea de células negativa para este antígeno. Las células se cultivan por separado a partir de los matraces de cultivo de tejido, suspendidas en un medio de crecimiento que contiene 10% de FBS, formadas en pella por centrifugación, y lavados con PBS. Las células lavadas (100 uL de aproximadamente $1-3 \times 10^6$ células/mL) se agregan a los pozos de una placa Immulon-2HB cubierta con fitohemaglutinina (100 uL de 20 ug/mL PHA), centrifugada y permitiendo que se adhiera a los pozos recubiertos con PHA durante 10 min. La placa con células fue sacudida para remover el PBS y después secada durante la noche a 37°C. Los pozos fueron bloqueados con una solución BSA de 5mg/ml en PBS por 1 hora a 37°C y después lavada cuidadosamente con PBS. Aliquotas de los sobrenadantes a partir de los clones de hibridoma (100 uL; diluido en regulador de bloqueo) se agregaron después a los pozos que contenían células que expresan el antígeno CD33 y a células que no expresan CD33, y fueron incubadas a temperatura ambiente por 1 hora. Los pozos fueron lavados con PBS, incubados con un conjugado de cabra-anti-ratón-IgG-anticuerpo-peroxidasa de rábano (100 uL; en regulador de bloqueo) por 1 hora,

seguido por lavados y después se detectaron enlaces usando un sustrato de ABTS/H2O2. Un sobrenadante común de un subclon de hibridoma 3E7 a la incubación con células de antígeno CD33 produjo una señal de 0.50 unidades de absorbancia, en contraste con un valor de 0.10 unidades de absorbancia obtenida a la incubación con células negativas para el antígeno CD33.

El hibridoma fue cultivado en ascitos en ratones BALB/c. Se diluyó un frasco de células hibridomas congeladas y las células se expandieron en matraces de cultivo de tejido para obtener el número necesario de células por producción de ascitos. Los ratones BALB/c preparados (los ratones habían sido inyectados i.p. con 0.5 mL de pristano 10-14 días antes) fueron inyectados con 1×10^6 células en 0.5 mL solución salina regulada con fosfato (PBS). Doce a 18 días después de la inyección de las células, el fluido de ascitos fue retirado de la cavidad peritoneal de los ratones con una jeringa. El fluido de ascitos depositados fue centrifugado a 1000 rpm durante 5 min, entonces el sobrenadante fue sujeto a la centrifugación a 12,000 rpm durante 30 minutos. El anticuerpo fue purificado desde el sobrenadante claro como sigue: Paso 1: precipitación de sulfato de amonio. El sobrenadante sobre hielo fue diluido con dos volúmenes de PBS frío, agitado y después tratado lentamente con un volumen de solución de sulfato amonio saturado (100%) fría. Se dejó reposar la solución sobre hielo durante 5 horas aproximadamente, cuando el precipitado fue recolectado por centrifugación. La pella se disolvió en una pequeña cantidad de PBS y la solución resultante se dializó dentro del regulador de pH para la etapa de purificación de afinidad

con proteína A. Etapa 2: Purificación de afinidad en la Proteína-Sefarosa A. El isotipo de My9-6 de murina es IgG1 con una cadena ligera kappa. Por lo tanto, la columna de afinidad estaba equilibrada en regulador de pH 0.1 M tris.HCl que contiene 3M de NaCl, pH 8.0.

5 La solución de anticuerpo en el mismo regulador pH fue pasada a través de la columna, la columna se lavó bien con el regulador de equilibrio y después eluida con 0.1 M de ácido acético que contiene 0.15 M de NaCl. Se ensayaron las fracciones midiendo la absorción de UV a 280 nm. Se combinaron y neutralizaron las fracciones que

10 contenían el anticuerpo con 1 M tris y después dializadas en PBS para su uso y almacenamiento.

El anticuerpo purificado se caracterizó inicialmente por enlazarse a las células de expresión CD33, como la línea de célula de fibroblasto 3T3 de murina transfectada y la línea de célula humana U-937 y la ausencia de enlace a las líneas de célula de

15 antígeno-negativo como se describió anteriormente para el tamizado de los sobrenadantes de hibridoma.

Para asegurarse de su especificidad de enlace al antígeno CD33, se lleva a cabo un experimento de enlace de competencia entre muMy9-6 etiquetado y el anticuerpo My9 anti-CD33

20 comercialmente disponible. El experimento de enlace se llevó a cabo utilizando el método descrito por Goldmacher et al. (1989, *J.Cell.Physiol.* 141, 222-234). El anticuerpo My9-6 de murina fue radioetiquetado utilizando la técnica de Iodo-gen (Fraker, P. J. and Speck, J. C., 1978, *Biochem.Biophys. Res. Commun.* 80, 849-857).

25 Una cantidad constante (3×10^{-9} M) de muMy9-6 ^{125} I-etiquetado fue

55

mezclada con concentraciones crecientes de anticuerpos no-radioactivos, tanto el muMy9 no etiquetado como el My9 no etiquetado, y las mezclas fueron incubadas con células (1×10^6 células por muestra) a 4°C durante 30 min. Estas incubaciones fueron hechas en 60 ul de un regulador de pH que se compone de un Medio Esencial Mínimo Modificado para Cultivos de Suspensión (SMEM) adicionado con suero humano al 2.5%. Después las células fueron separadas del medio que contiene material no enlazado por centrifugación a través de una mezcla de aceite de silicona (Aldrich) y aceite de parafina (Baker) con una densidad de 1.009 g/ml. La pella celular fue removida por corte de los tubos de centrifugado en la interfaz de aceite y fue utilizada para medir la radioactividad asociada a la célula en un contador-gamma (modelo RIA gamma 1274 de LKB). La radioactividad asociada a la célula medida es teñida contra las concentraciones de anticuerpos competentes no etiquetados. Los resultados se muestran en la Figura 1: ambos anticuerpos, My9 and My9-6, dan curvas de enlace de competencia muy similares. Esto demuestra que My9 and My9-6 enlazados al mismo antígeno y más aun que ambos anticuerpos tienen requerimientos de enlace muy similares. Ya que el My9 es un estándar anti-CD33 publicado y aceptado se concluye que My9-6 es un anticuerpo anti-CD33. El anticuerpo My9 está disponible comercialmente en BioGenex (San Ramon, Ca 94583; no. de cat. AM267-5M).

1.2. Clonación de cadenas pesadas y ligeras de Genes de

-st
56

Anticuerpos My9-6

La totalidad del ARN se purificó de un matraz confluyente T175 de My9-6 células de hibridoma como se describe en *Protocolos Moleculares* (NB1455-p173). La integridad del ARN fue verificada en un gel al 1% MOPS y las concentraciones fueron determinadas por espectrometría de rayos ultravioletas. Las reacciones RT se realizaron con un rango de 4-5 µg en total de ARN utilizando el paquete Gibco Superscript II así como iniciadores oligo dT o de hexámero aleatorio.

Las reacciones PCR fueron efectuadas ambas utilizando el método RACE descrito en Co et al. (1992, *J. Immunol.* 148 (4): 1149-54) y utilizando iniciadores degenerado descritos en Wang et al. (2000, *J. Immunol. Methods.* 233: 167-177). El RACE PCR requiere un paso intermedio para añadir una cola multi dG en los extremos 3' de la primera cepa cADNs. Las reacciones RT fueron purificadas con columnas de Qianeasy (Qiagen) y eluidas con 50 µl 1 x NEB regulador 4. La reacción terminal de dG se efectuó con 0.25 mM CoCl₂, 1 mM dGTP, y 5 unidades de transferasa terminal (NEB), en 1 x NEB regulador 4. La mezcla fue incubada a 37C por 30 minutos y después 1/5 de la mezcla de reacción (10 µl) se agregó de manera directa a una mezcla de reacción para que funcionara como el ADN modelo.

Las reacciones RACE y de PCR degenerado fueron idénticas excepto por diferencias en iniciadores y modelo. Como se mencionó antes, la mezcla de reacción de transferasa terminal fue utilizada

directamente para el modelo RACE PCR, mientras que la mezcla de reacción RT fue utilizada directamente para degenerar las reacciones PRC. En ambos casos se establece el mismo iniciador de cadena ligera 3', HingKL:

5 TATAGAGCTCAAGCTTGGATGGTGGGAAGATGGATACAGTTGGTGC
(NO. ID. SEC.: 11)

y la cadena primaria pesada 3', Bgl2lgGl:

⊗ GGAAGATCTATAGACAGATGGGGGTGTCGTTTTGGC (NO. ID. SEC. NO:12)

10 fueron utilizadas.

En RACE PCR, un Iniciador poli dC 5' fue utilizado tanto para cadenas pesadas como para las ligeras, EcoPolidC: TATATCTAGAATTCCCCCCCCCCCCCCCCC (NO. ID. SEC. NO : 13), mientras que los iniciadores PCR de extremo 5' PCR degenerados fueron SacIMK:

⊗ GGGAGCTCGAYATTGTGMTSACMCARWCTMCA (NO. ID. SEC.: 14)
para la cadena ligera y una mezcla igual de EcoRIMH1:

CTTCCGGAATTCSARGTNMAGCTGSAGSAGTC (NO. ID. SEC.: 15) y
EcoRIMH2: CTTCCGGAATTCSARGTNMAGCTGSAGSAGTCWGG (NO. ID. SEC.: 16) para las cadenas pesadas (bases mezcladas: H = A+T+C, S = G+C, Y = C+T, K = G+T, M = A+C, R = A+G, W = A+T, V = A+C+G, N = A+T+G+C).

25 Las reacciones PCR se llevaron a cabo en un termociclador de investigación MJ usando un programa adaptado de Wang et al. (2000, J. Immunol. Methods. 233: 167-177): 1) 94 C, 3 min; 2) 94°C, 15 seg ; 3) 45°C, 1 min; 4) 72°C, 2 min; 5) el ciclo regresa al paso

#2 29 veces; 6) termina con una etapa de extensión final a 72°C durante 10 min. Los productos PCR fueron clonados en de pBluescript II SK+ (Estratagen) usando enzimas de restricción creadas por los iniciadores PCR. Las cadenas ligeras y pesadas de clones fueron secuenciadas por los servicios de secuenciamiento Lark Technologies o Seqwright.

La RACE PCR nunca tuvo éxito por la cadena ligera My9-6. Por lo tanto para poder confirmar las secuencias de cADN de extremo 5, se efectuaron clonaciones y PCR degenerados adicionales. La secuencia de cadena ligera cADN My9-6, determinada a partir de los clones PCR degenerados, fue introducida en el sitio web de búsqueda NCBI's Blast (ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/) y se guardaron las cinco secuencias de anticuerpos de murina principales con secuencia de señal presentada. Los iniciadores PCR degenerados fueron diseñados a partir de estos péptidos de señal usando el software de web Codehop (blocks.fhcrc.org/codehop.html). Se agregaron los sitios de restricción EcoRI a tres de los iniciadores degenerados (Figura 2) y estos fueron utilizados en reacciones RT-PCR como se describió anteriormente.

1.3. Preparación y Muestras de Secuencia de Cadenas Ligeras y Pesadas

Las cadenas ligeras y pesadas del anticuerpo muMy9-6 fueron separadas por SDS-PAGE bajo condiciones reducidas. El anticuerpo reducido y desnaturalizado fue sometido a electroforesis en un 12%

59

de gel Tri-glicina (Novex, San Diego, CA). Después de la electroforesis, los geles fueron teñidos en una membrana ImmobilonPSq usando regulador CAPS/MeOH. Después de transferirlas, las membranas estaban teñidas con Ponceau S. Las bandas correspondientes a las cadenas ligera y pesada fueron activadas para el secuenciamiento de proteína.

La cadena ligera del anticuerpo fue secuenciada directamente a partir de la membrana por química de degradación Edman automatizada en un secuenciador ABI 494 Procise.

El N-término de la cadena pesada fue bloqueado, por lo que la proteína fue digerida, *in situ*, con tripsina de acuerdo a Gharahdaghi, *et al.* (1996). Entonces la mezcla digestiva fue analizada por espectrometría de masa MALDI-TOF en un instrumento Kratos Kompact SEQ. Los péptidos seleccionados fueron sujetos a MS/MS para determinar sus secuencias.

Ejemplo 2. Humanización de la Región Variable del Anticuerpo por Recubrimiento

El recubrimiento del anticuerpo My9-6 para proporcionar versiones humanizadas adecuadas como agentes terapéuticos o de diagnóstico generalmente proceden de acuerdo a los principios y métodos publicados en las patentes de los Estados Unidos de Norteamérica No. 5,639, 641, y como sigue.

2.1. Predicción de la superficie

La accesibilidad del solvente de los residuos de la región variable para un conjunto de anticuerpos con estructuras resueltas se usan para pronosticar los residuos de la superficie para la región variable del anticuerpo My9-6 de murina. La accesibilidad del solvente de aminoácido para un conjunto de archivos de estructura de anticuerpo único 127. (Figura 3) fue calculada con el paquete de software MC (Pedersen *et al.*, 1994, *J. Mol. Biol.* 235 (3): 959-973). Las diez secuencias de aminoácido de cadena ligera y cadena pesada más similares fueron determinadas utilizando el software de alineación de secuencias en el sitio web NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). El promedio de accesibilidad del solvente para cada residuo de la región variable de estas diez regiones variables de anticuerpos fue calculado con una hoja de cálculo de Excel y las posiciones con un promedio de accesibilidad mayor al 30% fueron considerados residuos de superficie. Las posiciones con promedio de accesibilidad de entre 25% y 35% fueron así consideradas al calcular la accesibilidad de residuo individual sólo para aquellas estructuras con dos residuos idénticos que flanquean de cada lado.

2.2. Modelado Molecular

Se generó un modelo molecular de la región variable My9-6 de murina utilizando el paquete de software AbM de Oxford Molecular. La estructura del anticuerpo fue construida con los archivos de estructuras de los anticuerpos con las secuencias de aminoácidos más similares (1sbs para la cadena ligera y 1bbj para la cadena pesada).

67

pesada) y los CDRs no canónicos se construyeron al buscar una estructura de base de datos C-a que contiene estructuras resueltas no-redundantes. Los modelos fueron observados con el GlaxoSmithKline Swiss-Pdb Viewer y se determinaron los residuos que quedan dentro de 5' de un CDR.

2.3. Selección de Anticuerpos Humanos.

Las posiciones de superficie de la región variable de My9-6 de murina fueron comparadas con las posiciones correspondientes en las secuencias de anticuerpos humanos en la base de datos Kabat (Johnson and Wu, 2001, Nucleic Acids Res. 29 (1): 205-6). El software de administración de base de datos de anticuerpos SR (Searle, 1998) fue utilizado para extraer y alinear los residuos de superficie de los pares de anticuerpos humanos naturales de cadena ligera y cadena pesada. La superficie de la región variable de anticuerpo humano que contiene los residuos de superficie, más parecidos con especial consideración dada a las posiciones que quedan dentro de 5' de un CDR, fue seleccionada para reemplazar a los residuos de superficie de la región variable del anticuerpo My9-6 de murina.

2.4. Construcción del Gen de Anticuerpo Humanizado por mutagénesis PCR.

Se ejecuto la mutagénesis PCR mutagénesis en los clones

cADN de región variable del My9-6 de murina para cambiar primero las secuencias de extreme 5' para igualar la secuencia de péptido, y después construir el gen My9-6 humano recubierto. Los conjuntos de iniciador fueron diseñados para crear los residuos de murina originalmente no secuenciados en los clones PGR degenerados iniciales (posiciones de cadena ligera N1, M3, L4, y S7, y posiciones de cadena pesada Q3 y P7).

Los conjuntos de iniciador de humanización fueron diseñados para hacer los 6 cambios de amino ácido requeridos para todas las versiones de huMy9-6 e iniciadores adicionales para cambiar de manera alternativa los cuatro residuos 5' (Figura 4). Las reacciones PCR fueron ejecutadas en un termociclador MJ Research con el siguiente programa: 1) 94 C, 1 min; 2) 94 C, 15 seg; 3) 55 C, 1 min; 4) 72 C, 1 min; 5) el ciclo regresa a la etapa #2 29 veces; 6) terminar con una etapa de extensión final a 72°C durante 4 min. Los productos PCR fueron diseñados con sus enzimas de restricción correspondientes y clonados en los vectores de clonación pBluescript. Los clones fueron secuenciados para confirmar los cambios de amino ácido.

2. 5. Vector de Expresión para Anticuerpos Humanizados

Las secuencias apareadas de cadena ligera y pesada fueron clonadas en un solo vector de expresión de mamífero. Los iniciadores PCR para las secuencias variables humanas crearon sitios de restricción que permitieron que la secuencia de señal

humana fuera agregada en el vector de clonación pBluescriptII. Las secuencias variables pudieron entonces ser clonadas en el plásmido de expresión de mamífero con EcoRI y BsiWI o HindIII y ApaI para la cadena ligera o pesada respectivamente (Figura 5). Las secuencias variables de cadena ligera fueron clonadas en-estructura sobre la región constante IgKappa humana y las secuencias variables de cadena pesada fueron clonadas en la secuencia de región constante IgGammal humana. En los plásmidos de expresión finales, los promotores CMV humanos promueven la expresión de secuencias cADN de cadena ligera y pesada.

2.6. Expresión Transitoria de Anticuerpos Humanizados

Se cultivaron células 293T en Medio Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM, BioWhittaker, 12-614F), suero fetal bovino inactivado por calor al 10% (Hyclone, SH30071. 03), 4 mM L-glutamina (BioWhittaker, 17-604E), y mezcla de penicilina/estreptomicina al 1% (BioWhittaker, 17-603E) en 6% CO₂ en un incubador a 37°C. Las células fueron separadas tres veces por semana en una dilución 1:10 manteniendo una población sub-confluente. 24 horas antes de la transfección, las células fueron tripsinizadas (BioWhittaker, 17-161E); las células vivas fueron contadas por medio del método de exclusión de azul tripano y colocadas en placas sobre placas tratadas de cultivo de tejido de 10 cm, (Corning, 430167) a una densidad de 2×10^6 células por placa. Inmediatamente antes de la transfección, las células fueron

lavadas cuidadosamente con solución salina regulada con fosfato (PBS, diluida a partir de BioWhittaker 10 x PBS, 17-517Q) y las células fueron sobrepuestas con 7 mL de Híbridoma SFM (InvitroGen, 12045-076) que incluye 1% Ultra Low IgG Serum (Gibco BRL, 16250-078).

Los métodos de transfección transitoria fueron adaptados a partir del protocolo estándar Qiagen Polyfect. Para que una placa de 10 cm sea transfectada, 8 u.g de CsCl grado ADN se combinaron con 300 uL Híbridoma SFM y reactivo de transfección 80 uL Polyfect (Qiagen, 301107). La mezcla de transfección fue sometida a turbulencia durante aproximadamente 5 segundos a baja velocidad e incubada durante 5 minutos a temperatura ambiente. Después de la incubación, 1 mL of Híbridoma SFM, 1% Ultra Low IgG Serum se agregaron a la mezcla de transfección y se combinaron por medio de pipeteo ascendente y descendente aproximadamente cinco veces. La mezcla de transfección fue agregada después a los 7 mL de Híbridoma SFM que cubren las células y las placas fueron agitadas suavemente para asegurar la distribución uniforme. Las reacciones de transfección fueron incubadas durante la noche, por lo general durante 16 horas, en un incubador de cultivo de tejido. Los medios de transfección fueron retirados cuidadosamente desde las células y reemplazados con 20 mL de Híbridoma SFM, 1% Ultra Low IgG. Las células transfectadas fueron devueltas después al incubador durante 72 horas, después de las cuales los sobrenadantes fueron recolectados y la producción de anticuerpo cuantificada por medio de ELISA. El sobrenadante recolectado fue almacenado a 4°C hasta la

purificación.

2.7. Purificación de Anticuerpos Humanizados

5 El sobrenadante fue preparado para cromatografía de afinidad de Proteína A por medio de la adición de 1/10 volumen de regulador 1 M Tris/HCl, pH 8.0. El sobrenadante ajustado en pH fue filtrado a través de una membrana de filtro de 0.22 μ m y cargado sobre una columna de Sefarosa de Proteína A (HiTrap Protein A HP, 1 mL, Amersham Biosciences) equilibrada con regulador de enlace (PBS, 10 pH 7.3). Una pre-columna de Sefarosa-Q (10 mL) fue conectada corriente arriba de la columna de Proteína A durante la carga de muestra para reducir la contaminación a partir del material celular como el ADN. Después de la carga de muestra, la pre-columna fue retirada y se invirtió la orientación de la columna de Proteína A para lavado y elución. La columna fue lavada con regulador de enlace hasta que se obtuvo una línea de base estable sin absorbancia a 280 nm. El anticuerpo fue eluido con 0.1 M regulador de ácido acético que contiene 0.15 M NaCl, pH 2.8, utilizando una velocidad de flujo de 0.5 mL/min. Fracciones de aproximadamente 0.25 mL fueron recolectadas y neutralizadas mediante la adición de 1/10 volumen de 1 M Tris/HCl, pH 8.0. La(s) fracción(es) pico fue(ron) diallsada(s) durante la noche contra PBS, pH 7.3. La cantidad de anticuerpo se cuantifico al medir la absorbancia a 280 nm y se calculó la 20 concentración de anticuerpo asumiendo que $E_{280}^{0.1\%} = 1.4$. El análisis de espectros de absorbancia y SDS-PAGE se ejecutaron 25

sobre fracciones de anticuerpo para verificar su pureza.

Ejemplo 3. Prueba de Anticuerpos Humanizados

5 3.1. Crecimiento de Células para Análisis de Enlace

Se obtuvieron células HL-60 a partir de la American Type Culture Collection (ATCC# CCL-240). Fueron mantenidas en una atmósfera de CO₂ al 5%, 37°C incubador con camisa de agua (Napco Scientific Co., Tualitan, Oregon). Las células crecieron en medio RPMI complementado con L-glutamina (BioWhittaker, Walkersville, MD) que contiene suero fetal bovino al 10% (Hyclone, Logan, Utah), más 50 ug/mL de sulfato de gentamicina (Life Technologies, Grand Island, NY).

15

3.2. Ensayo de Enlace Directo en Células HL-60

Se recolectaron células HL-60 a partir de matraces T75 (NUNCLONTM, cat. no. 153732), y centrifugadas a aproximadamente 300 x g durante cinco minutos en un centrifugador de mesa Omnifuge RT (Haereus Separations, Germany), a 4°C. Las células fueron suspendidas nuevamente a una densidad de 3×10^6 células por mL en regulador FACS, que comprendió 2% v/v suero de cabra (Sigma Chemical Co., St Louis, MO) en Medio MEM Alpha, complementado con L-glutamina (Life Technologies, Grand Island, NY). Utilizando un soporte de la pipeta multicanal, se añadieron células 3×10^5 a las

25

placas de fondo redondeado de 96-pozos (cat. no. 3077) y posteriormente colocándolas en hielo. Al utilizar una placa de análisis Falcon de 96-pozos (cat. no. 353911), se prepararon once vez diluciones seriales por duplicado en cada prueba o artículo de control por duplicado en el regulador intermediario FACS, desde una concentración inicial de $2 \times 10^{-6}M$. Posteriormente, 100µl. de cada prueba o artículo de control se mezcló con las células. Los pozos de control recibieron únicamente al regulador FACS. La placa se incubó en hielo por una hora y después se centrifugó por cinco minutos a 300 x g, en un centrifugador refrigerado. Se extrajeron los reactivos de la placa de los pozos por medio de una inversión rápida sobre un cubo de desechos que contiene 10% de lejía. Se resuspendieron las células por medio de sometimiento a turbulencia suave, se colaron una vez con el regulador FACS, se centrifugaron y después se resuspendieron con un sometimiento a turbulencia suave. Se diluyó el IgG cabra-anti-humano etiquetado FITC (Jackson Immuno Research Laboratories, West Grove, PA, cat. no. 109-096-003) y el IgG cabra-anti-ratón etiquetado FIAC (Jackson Immuno Research Laboratories, West Grove, PA, cat. no. 109-095-088) 1:100 en un regulador FACS, y se añadieron 100µl a los pozos apropiados en la placa de análisis. La placa se incubó posteriormente, en hielo durante una hora, resguardada del la luz. El anticuerpo secundario no enlazado fue lavado desde de los pozos de la misma manera en que se describió anteriormente. Se resuspendieron las células a través de turbulencia suave y después se fijaron al añadir 120 µl/pozo de 1% de formaldehído en solución salina regulada con

fosfato (PBS, 10 mM fosfato de potasio, 150 mM cloruro de sodio, pH 7.2). Se analizó la placa de análisis en el citómetro de flujo FACScan en interfaz con un dispositivo de muestreo automatizado de 96-pozos (Becton Dickinson, Mountain View, CA).

5

3.3. Preparación de las Membranas de Plasma

Las membranas de plasma se prepararon de acuerdo con el procedimiento descrito en Vater et al. (1995). En resumen, las células HL-60 crecieron en una densidad de 1×10^6 células/mL en RPMI, complementado con glutamina L, conteniendo 10% de suero fetal vacuno y 50 $\mu\text{g/mL}$ de sulfato de gentamicina. Cuando se obtiene un total de 1×10^9 células, se cultivan células, se giran a aproximadamente 300 x g en un centrifugador Omnifuge RT, se cuellan con una solución salina balanceada de Hanks (Life Technologies, cat. no. 14175-095), y se combinan en un tubo cónico centrifugador de 50 mL. La pella fue congelada después -80°C por lo menos 24 horas para facilitar la lisis celular y la homogenización. Para preparar membranas de plasma, la pella se derritió rápidamente a 37°C y después se almacenó en hielo; todos los pasos subsiguientes se llevaron a cabo a una temperatura de 4°C . Se resuspendió la pella de la célula HL-60 en 8mL del regulador de Tris 10 mM HCl, pH de 7.0, conteniendo 1 mM EDTA, 0.25 M sacarosa y 1 mM fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF). La pella de la célula se trasladó a 15 mL de amoladoras del tejido fino Dounce (Wheaton, Millville, NJ) para una disrupción celular (20 golpes con un mortero

10

15

20

25

de cristal de borosilicato). El homogenato fue centrifugado en un centrifugadora refrigerada de supervelocidad SorvalRC-5B, utilizando un rotor SS-34 (Wilmington, DE) a 8000 rpm por diez minutos y se extrajo cuidadosamente el sobrenadante de la pella. Se coló la pella por un tiempo extra con 8mL del regulador y se procesó como se describe anteriormente. Los sobrenadantes combinados se dispusieron en capas sobre 1mL de un regulador de amortiguador de sacarosa a 37% en 0 mMTris-HCl, 1 mM PMSF, 1 mM EDTA, pH 7.0, y procesado posteriormente en una ultracentrifugadora preenfriada Beckman L8-M con un rotor SW55ti (Beckman Instruments, Palo Alto, CA), a 33,000 rpm por 70 minutos. Se extrajo la capa de la membrana opalescente de cada tubo, situada justo encima del amortiguador de sacarosa y se diluyó con cuatro volúmenes de 10mMTris-HCl, 1mM EDTA, 1mM PMSF, pH 7.0. Esta solución se centrifugó a continuación por 30 minutos más a 18,000 rpm en la ultracentrifugadora. Se extrajo cuidadosamente el sobrenadante, y las pellas resultantes se resuspendieron en 10 mMTris-HCl, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, pH 7.0. La preparación de la membrana HL-60 se colocó en porción alícuota en tubos Eppendorf estériles con tapa de rosca de 1.5 mL, se congelaron en nitrógeno líquido y después se almacenaron a -80°C para su uso. La concentración de proteína total fue determinada al utilizar el Análisis Pierce TM BCA (Pierce Chemical Company, Rockford, IL, cat. no. 23235).

3.4. Análisis de Enlace Directo en Membranas HL-60

Las membranas HL-60, preparadas como se ya se describió se pusieron a secar a una concentración inicial de 10 µg/mL en agua desionizada en una superficie de poliestireno en placas de análisis 96-pozos de Immulon 2 (Dynex Laboratories, Chantilly, VA), al utilizar un desecador del vacío Labconco (Labconco, Corp, Kansas City, MO), durante la noche a temperatura ambiente. La placa ELISA se bloqueo con una fracción V de 1% de albúmina del suero vacuno (Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, MO, cat. no. A-3294), 0.05% Tween-20 (Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, MO, cat. no. P-2287) solución en el regulador de Tris salino (50 mM Tris-HCl, 150 mM de cloruro de sodio, pH 7.5, TBS), 300 L por pozo, a una temperatura de 37°C por un lapso de una hora. Después de esta etapa de bloqueo, se vació el regulador de bloqueo y se puso a secar en toallas de papel. Se prepararon diluciones seriales de prueba o reactivos de control en el regulador de bloqueo, por cuádruplicado, comenzando con 3.13×10^{-9} M titulada abajo hasta 5.29×10^{-14} M en una placa de análisis flexible de 96-pozos. Los pozos de control negativo contenían únicamente regulador de bloqueo. Se transfirieron 50 uL de cada dilución para designar pozos en las placas de análisis de membrana cubierta que después fueron incubadas durante la noche a una temperatura de 4°C. El contenido del pozo fue aspirado posteriormente y colocado en un frasco inútil que contenía 10% (v/v) de lejía y la placa fue colada a 3x con TBS que contenía 0.1% (v/v) Tween-20 (regulador de colada) y puesto a secar en toallas de papel. Se detectó la cantidad de anticuerpo anti-My9-6 que delimita ya sea con cabra-anti-ratón IgG-HRP o burro-anti-humano IgG-HRP diluido a

1:1000 con regulador de bloqueo en los pozos apropiados. Estos anticuerpos secundarios se incubaron en una placa de análisis por una hora a temperatura ambiente, resguardados de la luz. La placa se coló y se secó como antes. La placa se reveló utilizando TMB (BioFX Laboratories, Randallstown, MD, cat. no.TMBW-0100-01), después se inmovilizó con una solución Stop (BioFX Laboratories, Randallstown, MD, cat. no.STPR-0100-01). La placa de análisis se leyó en A450nm utilizando un Titertek (lector de placas D Multiskan Plus MK II Huntsville, AL).

3.5. Análisis de Enlace Competitivo en Membranas HL-60

Las membranas HL-60, preparadas como ya se describió, se pusieron a secar desde un punto de concentración de 10 µg/mL en agua desionizada en la superficie de poliestireno de las placas de análisis de 96-pozos Immulon 2 (Dynex Laboratories, Chantilly, VA), utilizando un desecador del vacío Labconco desecador del vacío (Labconco, Corp, Kansas City, MO), por la noche a temperatura ambiente. La placa ELISA fue bloqueada con 1% fracción V de albúmina del suero vacuno (Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, MO, cat. no. A-3294), 0.05% Tween-20 (Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, MO, cat. no. P-2287) solución en regulador de Tris salino (50 mM tris, 150 mM cloruro de sodio, pH 7.5, TBS), 300 µl por pozo, a 37°C por una hora. Después de este paso de bloque, la placa se vació del regulador de bloqueo se puso a secar en toallas de papel. Se prepararon las diluciones de prueba o reactivos de control dobles y

triples en el regulador de bloqueo, por cuádruplicado, comenzando a 1.25×10^{-8} M tituló abajo a 2.44×10^{-11} M (2x la concentración final necesitada) en una placa de análisis flexible de 96-pozos. Estos reactivos competentes sin nombre se mezclaron después con un volumen igual 2.5×10^{-1} M anti-My9-6 murina blotinilada (ImmunoGen, Inc., Cambridge, MA); El control positivo no contenía reactivo competente, mientras que el control negativo contenía únicamente regulador de bloqueo.

Se transfirió 50 μ L de estas mezclas a los pozos designados en la placa de análisis de membrana cubierta que posteriormente fueron incubados durante la noche a temperatura de 4°C. El contenido del pozo fue aspirado y transferido a un frasco inútil que contenga 10% (v/v) de lejía y la placa colada 3 x con TBS que contenga 0.1 % (v/v) Tween-20 (regulador de colada). Se secó la placa en toallas de papel y la cantidad de murina anti-My9-6 blotinilada que delimita fue detectada con 100 μ L por pozo de fosfatasa alcalina estreptavidina (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA, cat. no. 016-050-084) diluido a 1:5, 000 en el regulador de bloqueo. Después de una hora de incubación a temperatura ambiente y resguardado de la luz, el reactivo de anticuerpo secundario no enlazado no enlazado se cuele de los pozos y la placa se revela utilizando TMB (BioFX Laboratories, Randallstown, MD, cat. no. TMBW-0100-01) deteniéndolo con una solución Stop (BioFX Laboratories, Randallstown, MD, cat. no. STPR-0100-01). La placa de análisis se leyó a 450nm utilizando un lector de placas Titertek[®] Multiskan Plus MK II (Huntsville, AL).

3.6. Clonación de Regiones Variables de Anticuerpo My9-6 de Murina

5 Las regiones variables del anticuerpo My9-6 de anticuerpo de murina fueron clonadas a través de los métodos RT-PCR ya descritos. A varios de los clones individuales de cadena ligera y pesada se les siguió la secuencia para así identificar y evitar posibles errores de secuencia generados de polimerasa. Únicamente se obtuvo una secuencia para la cadena ligera, pero se extrajeron dos secuencias por separado de la cadena pesada de clones RT-PCR.

15 Para confirmar la secuencia real de la región variable de cadena ligera de My9-6 de murina, se analizaron secuencias del péptido por medio de la degradación Edman, ionización por medio de Desabsorción Láser asistida por la Matriz (MALDI) y Espectrometría de Masa Tándem (MS-MS). Se secuenciaron los 22 residuos en la terminal amino de la cadena ligera de My9-6 por medio de la degradación Edman y están señalados en la Figura 6A. La secuencia inicial de cADN complementario derivada de clones degenerados RT-PCR corresponde a todos menos cuatro residuos que fueron generados posiblemente por los iniciadores degenerados. La secuencia de péptido determinada por la degradación de Edman fue confirmada más tarde por los clones RT-PCR generados por los iniciadores degenerados de la secuencia de péptido de señal de extremo 5'. El análisis MS-MS de los fragmentos de la digestión de la

tripsina también confirman la secuencia de la cadena ligera CDRs 1 y 2 (Figura 6B). En conjunto estos análisis del péptido confirman la secuencia de aminoácido de cadena ligera de My9-6 de murina derivada a partir de los clones de ADN generados por RT-PCR.

5 Como es común con secuencias de cadena pesada, la terminal amino de cadena pesada muMy9-6 fue bloqueada por un residuo de piroglutimina y por lo tanto no se puede seguir la secuencia por la degradación Edman N-terminal. En vez de eso se genera la información de la secuencia por medio de la digestión de la tripsina y el análisis por medio de la Ionización de Desabsorción Láser asistida por la Matriz (MALDI) y la Espectrometría de Masa Tándem (MS-MS). Se identificó un fragmento Dalton 1788 con una secuencia pronosticada idéntica a una porción del ADN complementario del clon 2 (Figura 7). Esta secuencia incluye cinco residuos de CDR3 para el ADN complementario del clon 2 y de este modo existe un péptido ideal para poder realizar una identificación positiva para la cadena pesada muMy9-6. También confirmaron esta secuencia del péptido clones múltiples RACE PCR que producen solamente la secuencia que se obtiene originalmente del clon 2 degenerado RT-PCR.

20 Los resultados acumulativos de varios clones cADN y el análisis de secuencia del péptido proporcionaron las secuencias de cadena ligera y pesada de My9-6 de murina finales que se muestran en la Figura 8. Al utilizar las definiciones de Kabat y AbM, se identificaron tres cadenas ligeras y una pesada CDRs (Figuras 8 y 25 9). La búsqueda de la base de datos de NCBI IgRáfaga indica que la región variable de cadena ligera de anticuerpo muMy9-6 deriva

probablemente del gen de ratón IgV Germline 8-27, mientras que la región variable de cadena pesada se deriva principalmente del gen Germline IgVh V102 (Figura 10).

5 3.7 Determinación de los Residuos de Superficie de Región Variable del Anticuerpo My9-6

Las técnicas de recubrimiento descritas por Pedersen et al. (1994, J Mol. Biol. 235: 959-973) y Roguska et al. (1996, Protein Eng. 9: 895-904) comienzan por pronosticar los residuos de superficie en las secuencias variables del anticuerpo murina. Un residuo de superficie se define como un aminoácido que tiene por lo menos el 30% de su superficie total accesible a una molécula de agua. Cuando no existe una estructura solucionada para encontrar los residuos de superficie de muMy9-6, se alinearon los diez anticuerpos con las secuencias más homólogas con el conjunto de 127 archivos de estructura de anticuerpos (Figura 11A y B). La accesibilidad solvente para cada posición de Kabat fue calculada para estas secuencias alineadas y la distribución de esta accesibilidad relativa para cada residuo se muestra en la Figura 12.

Varias posiciones de superficie tienen un promedio de accesibilidad de entre 25% y 35%. Éstas se observaron con mayor detenimiento al promediar únicamente los anticuerpos con dos residuos idénticos que flaquean cada lado (Figuras 13A y B). Los 25 residuos de superficie pronosticados para el muMy9-6 de cadena pesada permanecieron igual después del análisis adicional, pero las

posiciones de Kabat 5 y 70 de la cadena ligera requirieron de más consideraciones. La alanina en la posición 15 de cadena ligera tuvo un promedio de accesibilidad de 34.4% en sus diez estructuras, pero una sola estructura, 1mcp, tuvo residuos que flaquean idénticos a aquellos en muMy9-6. En esta estructura, Ala15 tuvo accesibilidad relativa con sólo 18.2%, debido a que en esta estructura sencilla Ala15 fue menos accesible que el residuo promedio para la posición 15. Las tres estructuras con una sola diferencia en el residuo que flaquea, (lap2, lfrg, y1 hil) se promediaron en conjunto. La accesibilidad promedio para estas tres estructuras fue otra vez de 33.3%, haciendo Ala15 un residuo de superficie predictivo. Finalmente, el recubrimiento de anti-B4, C242 y la patente de recubrimiento predican que la posición 15 de la cadena ligera es un residuo de superficie. Tomando estos dos, el enfoque conservador es asumir que la posición 15 de la cadena ligera muMy9-6 es un residuo de superficie.

La posición 70 de la cadena ligera My9-6 también requiere de consideraciones especiales que resulten finalmente en una predicción conservadora y determine ser un residuo de superficie. La predicción de superficie inicial funciona para la cadena ligera que fue hecha con la información MC las cinco estructuras de cadena ligeras más homólogas y en este Asp70 fue un residuo de superficie de predicción. Posteriormente, con las cinco estructuras más homólogas, se encontró que la posición 70 tenía un promedio de accesibilidad de 29.1% como se muestra en la Figure 13A. Además, nueve de las diez estructuras tenían residuos de flaqueo idénticos y

el promedio de este conjunto fue de 29.2% de accesibilidad. Debido a que este residuo aparece muy cerca del 30% del corte y la patente de recubrimiento señala la posición 70 de la posición de la superficie, la información de accesibilidad tuvo que ser nuevamente examinada. La posición 70 para la estructura 11ve tiene una accesibilidad relativa del 22.5%, la cual tiene cinco por ciento puntos menos que la siguiente más baja con accesibilidad relativa de 27.2%. Ya que 11ve es la octava estructura más homóloga y tiene un bajo valor atípico, se tomo un promedio para ocho estructuras con residuos de flanqueo idénticos además de 11ve y este conjunto tuvo un promedio de accesibilidad de 30.1%.

Esto, junto con el hecho de que el análisis inicial de la cadena ligera muMy9-6 y la patente de recubrimiento señala la posición 70 de cadena ligera que nos lleva a la predicción conservadora que la cadena ligera muMy9-6 Asp70 es un residuo de superficie.

3.8. Modelado Molecular para Determinar que Residuo queda Dentro del 5 Å de CDR

El modelo molecular, generado con un paquete de software AbM fue analizado para determinar que residuo de superficie muMy9-6 viene dentro de 5Å de CDR. Para recubrir el anticuerpo, todos los residuos de superficie fuera del CDR deberán ser cambiados a su homólogo humano, pero los residuos que vengan dentro de 5A de CDR también contribuyen a la unión y especificidad del antígeno. Por lo tanto, estos residuos 5 A deben ser identificados y considerados a

lo largo del proceso de humanización. Las definiciones CDR que se utilizan para recubrimiento combinan la definición AbM para cadena pesada CDR2 y las definiciones de Kabat para los cinco CDRs restantes (Figura 9). Se analizó el modelo murina con el programa *Swiss Viewer* y la Figura 14 muestra los residuos que se encuentran dentro de 5A de cualquier residuo CDR ya sea en una cadena ligera o pesada.

3.9. Selección de la Superficie Humana Más Homóloga

Las superficies de anticuerpos humanos candidatos para recubrir muMy9-6 se extrajeron de la base de datos de secuencias de anticuerpo de Kabat utilizando el programa SR. Este programa proporciona una interfaz para buscar una posición específicamente contra la base de datos de anticuerpos. Para conservar los pares naturales, se compararon los residuos de superficies de ambas cadenas, ligeras y pesadas. Las superficies humanas más homólogas de la base de datos de Kabat fueron alineadas de acuerdo con el rango de secuencia de identidad. Las cinco mejores superficies fueron alineadas con el programa SR de la base de datos de Kabat y se muestran en la Figura 15. Las superficies se compararon entonces para identificar cuáles superficies humanas podrían requerir el menor número de cambios posibles dentro de 5 A de CDR. El anticuerpo del virus de la anti-hepatitis C, LC3bPB (Ivanovski M. et al., 1998, Blood 91 (7): 2433-42), requiere del menor número de cambios en los residuos de superficie (10 en total) y sólo cuatro de estos residuos

vienen dentro de 5 Å del CDR. La secuencia completa de región variable para muMy9-6 también se alineó contra la base de datos de anticuerpo humano de Kabat con SR y LC3bPB se identificó como la 14va secuencia humana de región variable más parecida (no se muestra la información). Ya que el anticuerpo LC3bPB proporciona la superficie más homóloga y requiere de un número mínimo de cambios de residuos 5 Å, es el mejor candidato para recubrir muMy9-6.

3.10. Construcción de los Genes My9-6 para Humanizar los anticuerpos My9-6

Los diez cambios de residuos de superficie para huMy9-6 se hicieron utilizando técnicas de mutagénesis PCR como ya se ha descrito. Ya que seis de los residuos de superficies para LC3bPB fueron más de 5 Å de CDR, estos residuos fueron cambiados de murina a humano en todas las versiones para humanizar el My9-6 (Figuras 16A y B). El cuarto residuo de superficie que cayó dentro de 5 Å de CDR, posiciones de Kabat de cadena ligera 1,3 y 45 y de cadena pesada posición 84, fueron cambiados a humano o se retenidos como murina para hacer las 16 versiones humanizadas de My9-6. De estos, la versión más humana es 1.0 ya que contiene los diez residuos de superficie humanos. La versión 1.1 es la más conservadora en lo que se refiere a asegurar una afinidad de enlace máximo, la cual retiene los cuatro residuos de superficie de murina que se encuentran en 5A de CDR. Cada uno de los genes anticuerpo humanizados My9-6 fueron clonados en el plásmido de expresión de

anticuerpo (Figura 5) para transfecciones pasajeras y estables.

3.11. Información de Enlace

5 La fortaleza clave para la humanización es que al retener los
residuos de estructura de murina sin superficie, la My9-6 humanizada
debe continuar para enlazar el CD33 sin cambiar la afinidad. Sin
embargo, los cuatro residuos de superficie que vienen en 5 Å de CDR
pueden contribuir al enlace del antígeno y por lo tanto, al cambiar
10 estos residuos puede haber un efecto negativo en el enlace. Para
tratar esta preocupación, las 16 versiones del My9-6 humanizado
incluyen todas las combinaciones de residuos humanos o de murina
en cada una de las cuatro posiciones de residuo 5 Å. Esta gama que
va desde la versión más óptima o humana 1.0 con residuos humanos
15 en cada posición de superficie no CDR hasta la versión más
conservadora 1.1 la cual retiene los residuos de murina en cada uno
de las cuatro posiciones de superficie 5Å y, por lo tanto, deberá
retener un enlace de tipo silvestre. Al comparar la afinidad de enlace
de la versión My9-6 humanizada con la versión de murina My9-6, la
20 versión más humana que retiene el enlace de tipo silvestre puede ser
seleccionado como My9-6 humanizado recubierto.

Se llevaron a cabo experimentos de enlace directos y
competitivos con las versiones humanizadas de murina My9-6 y con
muMy9-6 en el CD33 exponiendo una línea de células de leucemia
25 human HL-60. Se probaron las tres versiones más humanas (V1. 0,
V1. 3, V1. 6) así como la versión más conservadora (V 1. 1) en las

82
81

membranas HL-60 o en células enteras. La figura 17 da los valores KD para cada condición y la figura 18 muestra ejemplos de curvas de enlace para huMy9-6, V1.0, *versus* muMy9-6. Los valores KD calculados para la versión humanizada My9-6 incluyendo la más humana, 1.0, caen dentro del error experimental del valor de KD de la murina My9-6. Los resultados de enlaces competitivos también demuestran que los anticuerpos huMy9-6 pueden competir de igual manera por el enlace CD33 como el muMy9-6. Con esta información demostrando las afinidades de enlace cercanas al tipo silvestre para el My9-6 completamente humanizado, V1.0, en las membranas y células enteras HL-60, no hay necesidad de probar versiones adicionales ya que la versión 1.0 es el anticuerpo humanizado óptimo My9-6.

El anticuerpo My9-6 de murina fue humanizado por completo sin perder su actividad de enlace. Ninguno de los residuos de superficie cambio de ratón a humano tuvo como resultado la pérdida de la afinidad de enlace, aunque cuatro de estos residuos de superficie fueron dentro de 5 Å del CDR. Los residuos de 5 Å de CDR fueron pensado para hacer contactos críticos potenciales de van der Waal que puedan afectar la estructura de estos CDRs.

Los resultados de la humanización My9-6 sugieren que mientras los números de anticuerpos recubiertos crecen, el análisis a fondo de posición de los residuos basado en la información real de enlace, puede ser un modo más efectivo de reconocimiento de residuos cuestionable que solamente observar cualquier residuos de 5 Å de CDR.

\$3
82

El My9-6 VI.0 humanizado (huMy9-6) es el cuarto anticuerpo que fue humanizado utilizando el procedimiento aquí descrito. La humanización al recubrir la región variable del marco del anticuerpo de murina fue desarrollado como una mejora de los métodos estándares de humanización, incluyendo Injertos CDR, que requieren un extenso desarrollo y reingeniería para mantener la actividad de enlace. Esto se ve contrastado por el anticuerpo huMy9-6 recubierto, el cual implica cambiar solamente diez residuos de superficie para poder crear un anticuerpo a completamente activo con una superficie completamente humana.

Ejemplo 4. Inmunoconjugado My9-6-DM1

Se llevaron a cabo estudios de eficacia preclínicos con tejido para injerto de tumor humano en ratones utilizando el anticuerpo My9-6 conjugado con el fármaco maltansinoide DM1.

Como se tratara a continuación, el My9-6-DM1 mantuvo la especificidad y la afinidad de enlace de un anticuerpo CD33 sin modificación y mostró citotoxicidad específica antígeno potente hacia las células positivas del tumor CD33 *in vitro*. El tratamiento de ratones SCID que tienen xenoinjertos de tumor HL-60 subcutáneos establecidos con My9-6-DM1 da como resultado una completa erradicación de los tumores con dosis (20mg anticuerpo conjugado/kg/día i. v. x 5 días) que no muestran toxicidad y se encontraban por debajo de la dosis máxima tolerada. En contraste, el tratamiento con solo el anticuerpo My9-6 no surtió efecto en el

crecimiento del tumor HL-60 comparado con el control del vehículo. Se observó eficacia curativa similar empleando My9-6-DM1 sobre el tratamiento de ratones que tienen xenoinjertos THP-1 subcutáneos.

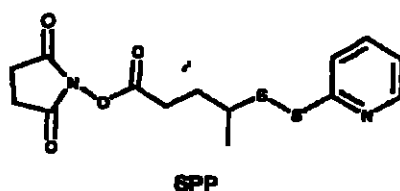
5

4.1. Reactivos

El anticuerpo fue anticuerpo monoclonal My9-6 de murina dirigido contra el CD33 humano descrito anteriormente.

10

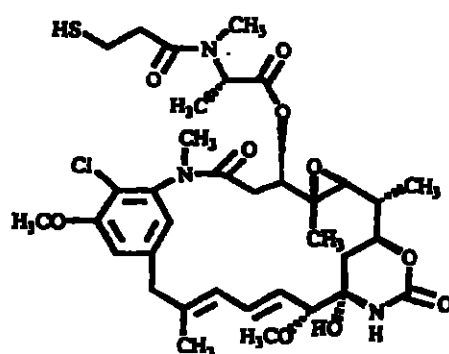
El agente modificador de anticuerpo fue N-succinimidil-4-(2-pirínidil) pentanoato (SPP):



15

El fármaco citotóxico fue maitansina análoga, DM1, la cual se sintetiza a partir del producto de la fermentación microbiana, Ansamitocina P3. El DM1 es un inhibidor potente de la polimerización tubulina.

20



4.2. Preparació

El My9-6-I

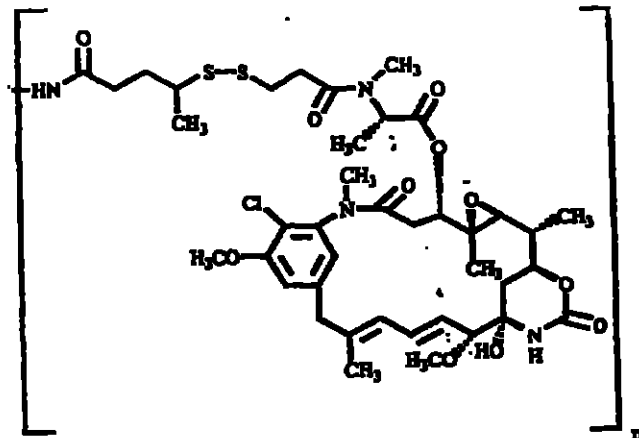
DM1

anticuerpo My9-6 con

25

SPP para introducir 3-5 grupos de piridilditio por molécula del anticuerpo. El intercambio de disulfuro entre sustituto de tior en el

DM1 y la funcionalidad disulfuro activa en el anticuerpo dio el DM1 que contiene anticuerpo conjugado.



(n puede ser cualquier entero)

4.3. Análisis del anticuerpo y conjugado de anticuerpo que enlaza por citometría de flujo

Las células HL-60 se incubaron con varias concentraciones del anticuerpo My9-6 o del My9-6-DM1. Las células fueron coladas e incubadas con el anticuerpo secundario FITC nombrado anti-murina IgG. Después del colado adicional, las células se fijaron con 2% de formaldehído y la fluorescencia asociada a la célula fue cuantificada utilizando un citómetro de flujo BD FACScan. El My9-6-DM1 mantiene enlace específico CD33 comparable al anticuerpo sin modificación (Figura 19).

4.4. Ensayo de citotoxicidad *in vitro*

La citotoxicidad de My9-6-DM1 fue medida utilizando CD33 reflejando la célula THP-1 y la línea celular negativa CD33 Namalwa. Las células fueron colocadas en placas de 96-pozos en un medio que contenía el conjugado y el incubado a 37°C hasta que se formaron colonias (2-3 semanas). Se obtuvieron las colonias y las fracciones sobrevivientes se determinaron utilizando distribución de Poisson en los cálculos.

4.5. Estudios de xenoinjerto de tumor de ratón *in vivo*

El modelo de tumor subcutáneo HL-60 células de leucemia promielocítica humana (5×10^5 células en 0.1 mL) fueron inoculadas subcutáneamente en el flanco derecho de los ratones hembras SCID. A los ratones se les trató por medio de una inyección en una vena lateral de la cola comenzando cuando los tumores alcanzaban de tamaño 100mm^3 (400mm^3 en modelos de tumores grandes). El tamaño del tumor y el peso del cuerpo del ratón fueron medidos dos veces por semana. El modelo sobreviviente de células HL-60 (5×10^6 células en 0.1mL) fue inyectado intravenosamente en la vena lateral de la cola de los ratones hembras SCID. Once días después de la inyección de células del tumor empezó el tratamiento. Los ratones se revisaban todos los días para ver la condición para masa tumoral moribunda., o muerta. El peso corporal era medido dos veces por semana.

4.6. Especificidad y eficacia del My9-6-DM1 *in vitro*

Se probó la citotoxicidad del My9-6-DM1 hacia las células que expresan CD33 (THP-1) comparado con la línea de célula CD33-negativa (Namalwa) utilizando un análisis clonogénico, donde la actividad de matar células era determinada por la cuantificación del número de colonias que podía crecer al seguir el tratamiento. El My9-6-DM1 muestra una actividad potente para matar células hacia células tumorales humanas CD33-positivo *in vitro* (Figura 20). No se observó toxicidad importante en las células CD33-negativo, indicando que la citotoxicidad CD33-dependiente fue gracias a un reconocimiento específico del anticuerpo anti-CD33, My9-6.

4.7. Eficacia del My9-6-DM1 contra xenoinjertos de tumor humano en ratones

La eficacia del My9-6-DM1 *in vivo* fue determinada al utilizar ratones SCID que tienen xenoinjertos de célula tumoral HL-60. Las células HL-60 fueron inyectadas subcutáneamente y los tumores crecieron hasta un promedio de 100mm³. El My9-6-DM1 conjugado se aplicaba i.v. una vez al día por 5 días con las dosis indicadas en la figura 21. La dosis se expresa como mg anticuerpo en el conjugado, el cual corresponde a una dosis DM1 de aproximadamente 15µg DM1 por mg del anticuerpo. El volumen del tumor se midió como indicación del tratamiento de eficacia y el peso del ratón fue monitoreado para indicar la toxicidad a consecuencia del tratamiento. El My9-6-DM1 induce curaciones a largo plazo en ratones que toleran

las células del tejido de injerto humano HL-60 con dosis que causan muy poca toxicidad (Figura 21). En las dos dosis más altas probadas (19 y 28 mg/kg), se observó una regresión completa de los tumores con una pérdida de peso máximo de menos del 10% (Figuras 21A y B). Inclusive en la dosis más baja probada (13 mg/kg), 2 de cada 5 ratones mostraron curaciones completas, mientras que los otros tres mostraron regresión del tumor con un retraso en el crecimiento del tumor de aproximadamente 20 días. Se observaron resultados similares al utilizar la línea de célula THP-1 donde el My9-8-DM1 ocasionó curaciones a largo plazo en ratones que toleran las células del tejido de injerto humano HL-60 (no se muestra la información).

Estos resultados ocasionan un contraste agudo en comparación con aquellos obtenidos con el tratamiento de solamente el anticuerpo My9-8. El anticuerpo por sí sólo no tuvo efecto en el crecimiento de las células tumorales inclusive en dosis de 50 mg/kg (Figura 21C). Se comparó la actividad del My9-8-DM1 con el anti-CD33 anticuerpo-caliqueamicina aprobado conjugando Ozogamicina de Gemtuzumab. La ozogamicina de Gemtuzumab fue administrada cada 4 días con tres dosis. Un experimento preliminar demostró que la ozogamicina de Gemtuzumab en el MTD publicado para ratones (0.3 mg/kg) era muy tóxico para los ratones SCID (no se muestra la información). También se observó toxicidad importante en las dosis 100 y 200 µg/kg en este experimento (Figura 21F). La ozogamicina de Gemtuzumab mostró una regresión modesta del tumor y un retraso en el crecimiento en este modelo (25 días) en la dosis máxima tolerada (100 µg/kg) (Figura 21E).

En un experimento separado, se comparó la actividad anti-tumoral del My9-6-DM1 conjugado con la actividad del fármaco predecesor sin conjugar maitansina. Los ratones que tienen xenoinjertos de tumor HL-60 fueron tratados diariamente por 5 días con conjugado de 23 mg anticuerpo/kg o 350µg DM1/kg; fármaco sin conjugar a 350µg/kg; o el anticuerpo sin conjugar a 23 mg/kg. Tres de los seis ratones tratados con maitansina únicamente, murieron dos días después del tratamiento indicando que este nivel del fármaco es muy tóxico. No obstante, el fármaco mostró un impacto importante en el crecimiento del tumor en los tres ratones restantes, con un retraso en el crecimiento del aproximadamente de 10 días (Figura 22).

El anticuerpo My9-6 sólo, no tiene efecto en el crecimiento del tumor, mientras que el My9-6-DM1 conjugado causa una regresión completa de los tumores. El efecto del tratamiento conjugado en el peso del ratón (disminución del 12%) fue un poco mayor que en el experimento anterior y puede reflejar variaciones de un lote a otro en la síntesis conjugada. Se observó que los tumores volvieron a crecer en dos de los seis ratones tratados conjugados, comenzando el 70. Estos animales fueron sujetos a un segundo tratamiento de My9-6-DM1 idéntico al primero. El segundo tratamiento tuvo como resultado una regresión completa de los tumores "recurrentes" sin observarse ninguna toxicidad adversa; por lo que se sugiere que la reaparición del tumor no se debió al crecimiento de células resistentes-conjugadas.

La potente eficacia del My9-6-DM1 en este modelo de tejido de

injerto sugiere que el conjugado puede ser efectivo inclusive contra tumores HL-60 grandes. Se les permitió a los tumores crecer hasta un volumen $>400 \text{ mm}^3$ antes de iniciar el tratamiento. Además se hizo una comparación de la actividad del My9-6-DM1 con los fármacos estándares de quimioterapia. El My9-6-DM1 causó una regresión completa de los tumores grandes en ratones SCID (Figuras 23A y B). Otra vez, los tumores recurrentes (2 de cada 6 ratones) son sensibles a un segundo tratamiento con My9-6-DM1. El tratamiento con agentes quimioterapéuticos estándares (Ara-C e idarubicina) tienen muy poco efecto en el crecimiento del tumor. Las dosis altas del fármaco fueron muy tóxicas para los ratones (no mostrado).

4.8. Eficacia del My9-6-DM1 en células HL-60 del modelo de supervivencia en ratón

Mientras que la eficacia del My9-6-DM1 en el modelo de xenoinjerto de tumor es impactante, también es interesante observar la actividad del conjugado en un modelo de supervivencia de ratón, donde se inyectan directamente las células HL-60 en la vena de la cola del ratón. En este modelo, los ratones controlados morían entre 30 y 50 días posteriores a la inyección de la célula. Los ratones tratados con My9-6-DM1 comenzando 11 días después de la inyección de célula mostraron un aumento dramático de supervivencia, con 7 de cada 8 ratones vivos a los 70 días (Figura 24A). Aplicando maitansina únicamente también mostró un impacto importante en este modelo, aunque 2 de los 8 ratones murieron poco

después de haber comenzado el tratamiento indicando la toxicidad del fármaco. La relativa eficacia de la maitansina en este modelo comparado con el modelo de xenoinjerto subcutáneo sugiere que los tumores HL-60 pudieran ser más sensibles a la acción del fármaco en estas condiciones. Si añadimos un retraso al comenzar el tratamiento se pudiera demostrar una diferencia aguda entre el fármaco dirigido y el no dirigido. Sin embargo, inclusive en este modelo, la quimioterapia estándar no proporcionó ninguna mejora significativa (Figura 24B). La combinación más alta de dosis mostró una toxicidad aparente importante del fármaco. Ambos, el anticuerpo My9-6 y la ozogamicina de Gemtuzumab mostraron un aumento moderado en la supervivencia.

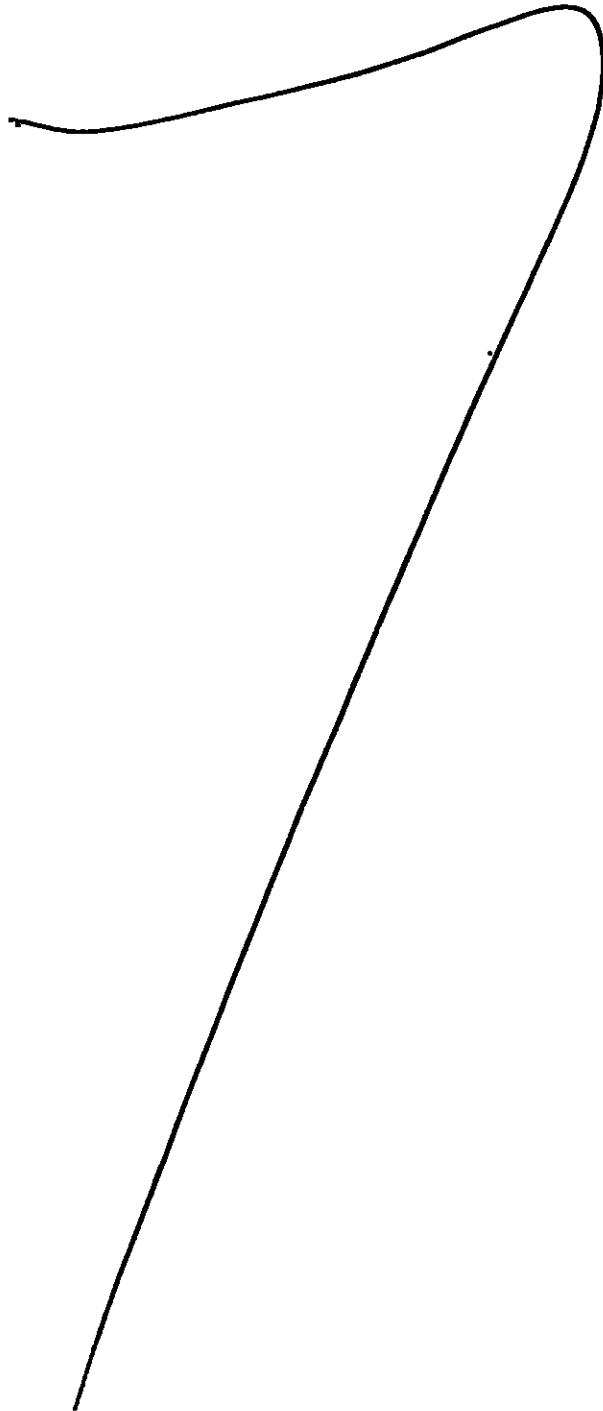
Estado del Depósito

El hibridoma que hace que los anticuerpos My9-6 de murina fueran depositados con la Colección de Cultivo Tipo Estadounidense, PO Box 1549, Manassas, VA 20108, el 7 de noviembre de 2002, bajo los Términos del Tratado de Budapest y fue asignado como el depósito número PTA-4786.

Se ha hecho referencia a ciertas patentes y publicaciones en la presente descripción, las enseñanzas de cada una de las cuales están incorporadas aquí en su totalidad mediante referencia.

En tanto que se ha descrito la invención a detalle y con referencias a modalidades específicas de la misma, sería evidente

para alguien con experiencia en la técnica que se pueden hacer varios cambios y modificaciones a la presente sin apartarse del espíritu y alcance de la misma.



REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo aislado o un fragmento de enlace de epítoto del mismo, que comprende por lo menos una región de determinación complementaria, que tiene una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consiste en NOs. ID. SEC.:1-6:

SYIYH (NO. ID. SEC.:1),
 VIYPGNDDISYNQKFXG (NO. ID. SEC.:2), en donde X es K o Q,
 EVRLRYFDV (NO. ID. SEC.:3),
 KSSQSVFFSSSQKNYLA (NO. ID. SEC.:4),
 WASTRES (NO. ID. SEC.:5),
 .HQYLSSRT (NO. ID. SEC.:6),
 y que tiene la habilidad para enlazar D33.

2. Un anticuerpo o fragmento de enlace de epítoto del mismo, que comprende por lo menos una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera, en el que dicha región variable de cadena pesada incluye tres regiones de determinación complementarias que tienen secuencias de aminoácidos representadas NO. ID. SECs. :1-3, respectivamente,

SYIYH (NO. ID. SEC.:1),
 VIYPGNDDISYNQKFXG (NO. ID. SEC.: 2), en donde X es K o Q,
 EVRLRYFDV (NO. ID. SEC.: 3),

y en el que dicha región variable de cadena ligera incluye tres regiones de determinación complementarias que tienen secuencias

de aminoácidos representadas por NO. ID. SEC.s: 4-6, respectivamente,

KSSQSVFFSSSQKNYLA (NO. ID. SEC.: 4),

WASTRES (NO. ID. SEC.: 5),

5 HQYLSSRT (NO. ID. SEC.: 6).

3. Un anticuerpo o un fragmento de enlace de epítipo del mismo de conformidad con la reivindicación 2, caracterizado porque dicha región variable de cadena pesada tiene por lo menos 90% de identidad de secuencia a una secuencia de aminoácidos representada por NO. ID. SEC.: 7:

QVQLQQPGA EWKPGASVKMSCKASGYTFTSYIHWIKQTPGQGLEWVG
VIYPGND SYNQKFKGKATLTADKSSTTAYMQLSSLTSEDSAVYYCAREVR
LRYFDVWGAGT TVTVSS.

4. Un anticuerpo o un fragmento de enlace de epítipo del mismo de conformidad con la reivindicación 2, caracterizado porque dicha región variable de cadena pesada tiene por lo menos 95% de identidad de secuencia a dicha secuencia de aminoácidos representada por NO. ID. SEC.: 7:

QVQLQQPGA EWKPGASVKMSCKASGYTFTSYIHWIKQTPGQGLEWVG
VIYPGND ISYNQKFKGKATLTADKSSTTAYMQLSSLTSEDSAVYYCAREV
RLRYFDVWGAGT TVTVSS.

5. Un anticuerpo o fragmento de enlace de epítipo del mismo de conformidad con la reivindicación 2, caracterizado porque dicha región variable de cadena pesada tiene una secuencia de aminoácido representada por NO. ID. SEC.: 7:

QVQLQQPGA EVVKPGASVKMSCKASGYTFTSYIHWIKQTPGQGLEWV

95
94

GVIYPGNDISYNQKFKGKATLTADKSSTTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARE
VRLRYFDVWGAGT TVTVSS.

6. Un anticuerpo o fragmento de enlace de epítoto del mismo
de conformidad con la reivindicación 2, caracterizado porque dicha
región variable de cadena ligera tiene por lo menos 90% de identidad
de secuencia a dicha secuencia de aminoácidos representada por
NO.ID.SEC.: 8:

NIMLTQSPSSLAVSAGEKVTMSCKSSQSVFFSSSQKNYLAWYQQIPGQS
PKLLIYWASRESGVDPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQSEDLAIYYCHQYLSS
RTFGGGGTKLEIKR.

7. Un anticuerpo o fragmento de enlace de epítoto del mismo
de conformidad con la reivindicación 2, caracterizado porque dicha
región variable de cadena ligera tiene por lo menos 95% de identidad
de secuencia a dicha secuencia de aminoácidos representada por
NO. ID. SEC.: 8:

NIMLTQSPSSLAVSAGEKVTMSCKSSQSVFFSSSQKNYLAWYQQIPGQS
PKLLIYWASRESGVDPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQSEDLAIYYCHQYLSS
RTFGGGGTKLEIKR.

8. Un anticuerpo o fragmento de enlace de epítoto del mismo
de conformidad con la reivindicación 2, caracterizado porque dicha
región variable de cadena ligera tiene una secuencia de aminoácidos
representada por NO. ID. SEC.: 8:

NIMLTQSPSSLAVSAGEKVTMSCKSSQSVFFSSSQKNYLAWYQQIPGQS
PKLLIYWASRESGVDPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQSEDLAIYYCHQYLSS
RTFGGGGTKLEIKR.

9. Un anticuerpo o fragmento de enlace de epítoto del mismo

de conformidad con la reivindicación 2, caracterizado porque dicha región variable de cadena pesada tiene por lo menos 90% de identidad de secuencia a dicha secuencia de aminoácidos representada por NO. ID. SEC.: 9:

5 QVQLQQPGAIEWKPGASVKMSCKASGYTFTSYIHWIKQTPGQGLEWVG
VIYPGNDISYNQKFQGKATLTADKSSTTAYMQLSSLTSEDSAVYYCAREV
RLRYFDVWGQGT TTVVSS.

②

10 10. Un anticuerpo o fragmento de enlace de epítopo del mismo de conformidad con la reivindicación 2, caracterizado porque dicha región variable de cadena pesada tiene por lo menos 95% de identidad de secuencia a dicha secuencia de aminoácidos representada por NO. ID. SEC.: 9:

15 QVQLQQPGAIEWKPGASVKMSCKASGYTFTSYIHWIKQTPGQGLEWVG
VIYPGNDISYNQKFQGKATLTADKSSTTAYMQLSSLTSEDSAVYYCAREV
RLRYFDVWGQGT TTVVSS.

③

20 11. Un anticuerpo o fragmento de enlace de epítopo del mismo de conformidad con la reivindicación 2, caracterizado porque dicha región variable de cadena pesada tiene una secuencia de aminoácidos representada por NO. ID. SEC.: 9:

20 QVQLQQPGAIEVVKPGASVKMSCKASGYTFTSYIHWIKQTPGQGLEWV
GVIYPGNDISYNQKFQGKATLTADKSSTTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARE
VRLRYFDVWGQGT TTVVSS.

25 12. Un anticuerpo o fragmento de enlace de epítopo del mismo, de conformidad con la reivindicación 2, caracterizado porque dicha región variable de cadena ligera tiene por lo menos 90% de identidad de secuencia a dicha secuencia de aminoácidos representada por

NO- ID. SEC.: 10:

EIVLTQSPGSLAVSPGERVTMSCKSSQSVFFSSSQKNYLAWYQQIPGQS
PRLLIYWASRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISVQPEDLAIYYCHQYLSS
RTFGQGGTKLEIKR.

5 13. Un anticuerpo o fragmento de enlace de epítoto del mismo,
de conformidad con la reivindicación 2, caracterizado porque dicha
región variable de cadena ligera tiene por lo menos 95% de identidad
de secuencia a dicha secuencia de aminoácidos representada por
NO. ID. SEC.: 10:

10 EIVLTQSPGSLAVSPGERVTMSCKSSQSVFFSSSQKNYLAWYQQIPGQS
PRLLIYWASRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISVQPEDLAIYYCHQYLSS
RTFGQGGTKLEIKR.

15 14. Un anticuerpo o fragmento de enlace de epítoto del mismo,
de conformidad con la reivindicación 2, caracterizado porque dicha
región variable de cadena ligera tiene una secuencia de aminoácidos
representada por NO. ID. SEC.: 10:

EIVLTQSPGSLAVSPGERVTMSCKSSQSVFFSSSQKNYLAWYQQIPGQS
PRLLIYWASESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISVQPEDLAIYYCHQYLSSR
TFGQGGTKLEIKR.

20 15. Un anticuerpo purificado o fragmento de enlace de epítoto
del mismo que se enlaza específicamente a CD33, caracterizado
porque la porción de región variable de cadena pesada de dicho
anticuerpo o fragmento de enlace de epítoto tiene una secuencia de
aminoácido representada por NO. ID. SEC.: 7:

25 QVQLQQPGAIEVVKPGASVKMSCKASGYTFTSYIHWIKQTPGQGLEWV
GVIYPGNDISYNQKFKGKATLTADKSSTTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARE

98
97

VRLRYFDVWGAGT TVTVSS, y en el que la porción de la región variable de cadena ligera de dicho anticuerpo o fragmento de enlace de epítoto tiene una secuencia de aminoácidos representada por NO. ID. SEC.: 8:

5 NIMLTQSPSSLAVSAGEKVTMSCĀSSQSVFFSSSQKNYLAWYQQIPGQS
PKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISVQSEDLAIYYCHQYLS
SRTFGGGTKLEIKR.

16. Un anticuerpo humanizado o recubierto o un fragmento de enlace de epítoto del mismo, que se enlaza específicamente CD33, caracterizado porque la porción de la región de cadena pesada de dicho anticuerpo o fragmento de enlace de epítoto tiene una secuencia de aminoácidos representada por NO. ID. SEC.: 9:

10 QVQLQQPGAIEWKPGASVKMSCKASGYTFTSYIHWIKQTPGQGLEWVG
VIYPGNDDISYNQKFQGKATLTADKSSTTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARE
15 VRLRYFDVWGQGT TVTVSS, y en el que la porción de la región variable de cadena ligera de dicho anticuerpo o fragmento de enlace de epítoto tiene una secuencia de aminoácidos representada por NO. ID. SEC.: 10:

20 EIVLTQSPGSLAVSPGERVTMSCSSQSVFFSSSQKNYLAWYQQIPGQS
PRLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISVQPEDLAIYYCHQYLS
SRTFGQGTKLEIKR.

17. Un inmunoconjugado que comprende el anticuerpo o fragmento de enlace de epítoto del mismo, de conformidad con la reivindicación 1, enlazado a un fármaco o profármaco.

25 18. Un inmunoconjugado que comprende el anticuerpo o fragmento de enlace de epítoto del mismo, de conformidad con la

reivindicación 2, relacionado a un fármaco o profármaco.

19. El inmunoconjugado de conformidad con la reivindicación 17, caracterizado porque dicho fármaco o profármaco es seleccionado del grupo que consiste de un maitansinoide, un taxoide, CC-1065, un CC-1065 análogo, dolastatina, dolastatina análoga, metotrexato, daunorubicina, doxorubicina, vincristina, vinblastina, melfalan, mitomicina C, clorambucil, caliqueamicina y derivados del mismo.

20. El inmunoconjugado de conformidad con la reivindicación 18, caracterizado porque dicho fármaco o profármaco es seleccionado del grupo que consiste de un maitansinoide, un taxoide, CC-1065, un CC-1065 análogo, dolastatina, dolastatina análoga, metotrexato, daunorubicina, doxorubicina, vincristina, vinblastina, melfalan, mitomicina C, clorambucil, caliqueamicina y derivados del mismo.

21. Una composición que consta del anticuerpo o fragmento de enlace de epítopo del mismo de conformidad con la reivindicación 1 y un fármaco o profármaco.

22. Una composición que consta del anticuerpo o fragmento de enlace de epítopo del mismo de conformidad con la reivindicación 2 y un fármaco o profármaco.

23. Una composición farmacéutica que consta del anticuerpo o fragmento de enlace de epítopo del mismo de conformidad con la reivindicación 1 y un agente farmacéuticamente aceptable.

24. Una composición farmacéutica que consta del anticuerpo o fragmento de enlace de epítopo del mismo de conformidad con la

reivindicación 2 y un agente farmaceuticamente aceptable.

25. Una composición farmacéutica que consta del inmunoconjugado de conformidad con la reivindicación 17 y un agente farmaceuticamente aceptable.

5 26. Una composición farmacéutica que consta del inmunoconjugado de conformidad con la reivindicación 18 y un agente farmaceuticamente aceptable.



27. Una composición farmacéutica que consta de la composición de conformidad con la reivindicación 21 y un agente farmaceuticamente aceptable.

10

28. Una composición farmacéutica que consta de la composición de conformidad con la reivindicación 22 y un agente farmaceuticamente aceptable.

29. Un reactivo de diagnóstico que consta del anticuerpo de conformidad con la reivindicación 1, en el que dicho anticuerpo o fragmento de anticuerpo está etiquetado.

15



30. Un reactivo de diagnóstico que consta del anticuerpo de conformidad con la reivindicación 1, en el que dicho anticuerpo o fragmento de anticuerpo está etiquetado.

20

31. El reactivo diagnóstico de conformidad con la reivindicación 29, caracterizado porque dicha etiqueta fue seleccionada del grupo que consta de una etiqueta de biotina, una etiqueta de enzima, una radio etiqueta, fluoroforo, cromóforo, un agente de imagen y un ion metálico.

25

32. El reactivo diagnóstico de conformidad con la reivindicación 30, caracterizado porque dicha etiqueta fue seleccionada del grupo

que consta de una etiqueta biotina, una etiqueta de enzima, una radio etiqueta, fluoroforo, cromóforo, un agente de imagen y un ion metálico.

5 33. Un método para inhibir el crecimiento de la célula que expresa CD33 que consta en poner en contacto dicha célula con el anticuerpo o fragmento de enlace de epítipo del mismo de conformidad con la reivindicación 1 o 2.

10 34. Un método para inhibir el crecimiento de la célula expresada por CD33 que consta en poner en contacto dicha célula con el inmunoconjugado de conformidad con la reivindicación 17 o 18.

35. Un método para inhibir el crecimiento de la célula expresada por CD33 que consta en poner en contacto dicha célula con la composición de conformidad con la reivindicación 21 o 22.

15 36. Un método para inhibir el crecimiento de la célula expresada por CD33 que consta en poner en contacto dicha célula con la composición farmacéutica seleccionada de las reivindicaciones 23-28.

20 37. Un método para tratar a un sujeto con una enfermedad en el que se expresa CD33, que consta de administrar a dicho sujeto una cantidad efectiva del anticuerpo o fragmento de enlace de epítipo del mismo de la reivindicación 1 o 2.

25 38. Un método para tratar a un sujeto con una enfermedad en el que se expresa CD33, que consta de administrar a dicho sujeto una cantidad efectiva del inmunoconjugado de la reivindicación 17 o 18.

101

39. Un método para tratar a un sujeto con una enfermedad en el que se expresa CD33, que consta de administrar a dicho sujeto una cantidad efectiva de la composición de la reivindicación 21 o 22.

5 40. Un método para tratar a un sujeto con una enfermedad en el que se expresa CD33, que consta de administrar a dicho sujeto una cantidad efectiva de la composición farmacéutica de la reivindicación 23 o 24.

10 41. Un método para tratar a un sujeto con una enfermedad en el que se expresa CD33, que consta de administrar a dicho sujeto una cantidad efectiva de la composición farmacéutica de la reivindicación 25 o 26.

15 42. Un método para tratar a un sujeto con una enfermedad en el que se expresa CD33, que consta de administrar a dicho sujeto una cantidad efectiva de la composición farmacéutica de la reivindicación 27 o 28.

20 43. Un método para tratar a un sujeto con una enfermedad en el que se expresa CD33, que consta en poner en contacto una o más células de dicho sujeto *ex vivo* con una cantidad efectiva de anticuerpo o fragmento de enlace de epítipo del mismo de la reivindicación 1 o 2.

44. Un método para tratar a un sujeto con una enfermedad en el que se expresa CD33, que consta en poner en contacto una o más células de dicho sujeto *ex vivo* con una cantidad efectiva de inmunoconjugado de la reivindicación 17 o 18.

25 45. Un método para tratar a un sujeto con una enfermedad en el que se expresa CD33, que consta en poner en contacto una o más

células de dicho sujeto *ex vivo* con una cantidad efectiva de la composición de la reivindicación 21 o 22.

5 46. Un método para tratar a un sujeto con una enfermedad en el que se expresa CD33, que consta en poner en contacto una o más células de dicho sujeto *ex vivo* con una cantidad efectiva de la composición farmacéutica seleccionada a partir de las reivindicaciones 23-28.

10 47. Un método de tratamiento de conformidad con la reivindicación 37, caracterizado porque dicha enfermedad es una enfermedad seleccionada del grupo que consta del síndrome de mielodisplasia (MDS), leucemia mieloide aguda (AML), leucemia mieloide crónica (CML) y leucemia promielocítica (PML).

15 48. Un método de tratamiento de conformidad con la reivindicación 38, caracterizado porque dicha enfermedad es una enfermedad seleccionada del grupo que consta del síndrome de mielodisplasia (SMD), leucemia mieloide aguda (LMA), leucemia mieloide crónica (LMC) y leucemia promielocítica (LMP).

20 49. Un método de tratamiento de conformidad con la reivindicación 39, caracterizado porque dicha enfermedad es una enfermedad seleccionada del grupo que consta del síndrome de mielodisplasia (SMD), leucemia mieloide aguda (LMA), leucemia mieloide crónica (LMC) y leucemia promielocítica (LMP).

25 50. Un método de tratamiento de conformidad con la reivindicación 40, caracterizado porque dicha enfermedad es una enfermedad seleccionada del grupo que consta del síndrome de mielodisplasia (SMD), leucemia mieloide aguda (LMA), leucemia

mieloide crónica (LMC) y leucemia promielocítica (LMP).

51. Un método de tratamiento de conformidad con la reivindicación 41, caracterizado porque dicha enfermedad es una enfermedad seleccionada del grupo que consta del síndrome de mielodisplasia (SMD), leucemia mieloide aguda (LMA), leucemia mieloide crónica (LMC) y leucemia promielocítica (LMP).

52. Un método de tratamiento de conformidad con la reivindicación 42, caracterizado porque dicha enfermedad es una enfermedad seleccionada del grupo que consta del síndrome de mielodisplasia (SMD), leucemia mieloide aguda (LMA), leucemia mieloide crónica (LMC) y leucemia promielocítica (LMP).

53. Un método de tratamiento de conformidad con la reivindicación 43, caracterizado porque dicha enfermedad es una enfermedad seleccionada del grupo que consta del síndrome de mielodisplasia (SMD), leucemia mieloide aguda (LMA), leucemia mieloide crónica (LMC) y leucemia promielocítica (LMP).

54. Un método de tratamiento de conformidad con la reivindicación 44, caracterizado porque dicha enfermedad es una enfermedad seleccionada del grupo que consta del síndrome de mielodisplasia (SMD), leucemia mieloide aguda (LMA), leucemia mieloide crónica (LMC) y leucemia promielocítica (LMP).

55. Un método de tratamiento de conformidad con la reivindicación 45, caracterizado porque dicha enfermedad es una enfermedad seleccionada del grupo que consta del síndrome de mielodisplasia (SMD), leucemia mieloide aguda (LMA), leucemia mieloide crónica (LMC) y leucemia promielocítica (LMP).

104

58. Un método de tratamiento de conformidad con la reivindicación 46, caracterizado porque dicha enfermedad es una enfermedad seleccionada del grupo que consta del síndrome de mielodisplasia (SMD), leucemia mieloide aguda (LMA), leucemia mieloide crónica (LMC) y leucemia promielocítica (LMP).

57. Un método para determinar si una muestra biológica contiene una célula cancerígena mieloginosa que comprende:

(a) poner en contacto dicha muestra con el reactivo de diagnóstico de la reivindicación 29 o 30 y

(b) detectar la distribución de dicho reactivo contenido en la muestra.

58. El método de diagnóstico de conformidad con la reivindicación 57, caracterizado porque dicho cáncer es un cáncer seleccionado del grupo que consta de leucemia mieloide aguda (LMA), leucemia mieloide crónica (LMC) y leucemia promielocítica (LMP).

59. Un anticuerpo o fragmento de enlace de epítipo del mismo mejorado que se enlaza específicamente a CD33, dicho anticuerpo o fragmento del anticuerpo mejorado preparado por:

(a) proporcionar ADN que codifique el anticuerpo o fragmento de enlace de epítipo del mismo que consta de por lo menos uno de la NO. ID. SEC.: 7 y NO. ID. SEC.: 8

(b) introducir por lo menos una mutación, supresión, inserción o adición de nucleótido a dicho ADN de tal forma que se cambie la secuencia del aminoácido de dicho o anticuerpo o fragmento de enlace de epítipo que codifica dicho ADN;

106
105

(c) expresar dicho anticuerpo o fragmento de enlace de epítope;

(d) dicha revisión que expresa el anticuerpo o fragmento de enlace de epítope para dicha mejoría, de ese modo preparando un anticuerpo o fragmento de enlace de epítope del mismo mejorado.

60. Un anticuerpo o fragmento de enlace de epítope del mismo mejorado que se enlaza específicamente con CD33, dicho anticuerpo o fragmento de enlace de epítope mejorado preparado por:

(a) proporcionar ADN que codifique el anticuerpo o fragmento de enlace de epítope del mismo que consta de por lo menos uno del NO. ID. SEC.: 9 y NO. ID. SEC.: 10.

(b) introducir por lo menos una mutación, supresión, inserción o adición de nucleótido a dicho ADN de tal forma que se cambie la secuencia del aminoácido de dicho o anticuerpo o fragmento de enlace de epítope codificador dicho ADN;

(c) expresar dicho anticuerpo o fragmento de enlace de epítope;

(d) tamizar el anticuerpo expresado o fragmento de enlace de epítope para dicha mejoría, preparando de ese modo un anticuerpo o fragmento de enlace de epítope del mismo mejorado.

61. El anticuerpo o fragmento epítope mejorado de conformidad la reivindicación 59 o 60, caracterizado porque dicha mejoría es un aumento en la afinidad del CD33.

62. El anticuerpo o fragmento epítope mejorado de conformidad con la reivindicación 59 o 60, caracterizado porque por lo menos se realiza una mutación, supresión, inserción o adición del nucleótido

por medio de un método seleccionado del grupo que consiste de mutagénesis dirigida de sitio mediada por oligonucleótido, mutagénesis de casete, PCR propenso al error, redistribución de ADN y uso de las cepas de mutación de *E. coli*.

5 63. Un polinucleótido aislado que codifica el anticuerpo o fragmento de enlace de epítipo del mismo de conformidad con la reivindicación 1 o 2.

10 64. Un polinucleótido aislado que codifica una cadena ligera o pesada del anticuerpo o fragmento de enlace de epítipo del mismo de conformidad con la reivindicación 1 o 2.

 65. Un vector recombinante que comprende el polinucleótido de conformidad con la reivindicación 63.

 66. Un vector recombinante que comprende el polinucleótido de conformidad con la reivindicación 64.

15 67. Una célula huésped transformada con el vector recombinante de conformidad con la reivindicación 65.

 68. Una célula huésped transformada con el vector recombinante de conformidad con la reivindicación 66.

20 69. Un método para producir un anticuerpo o fragmento de enlace de epítipo del mismo con la habilidad de enlazarse a CD33, dicho método consta de (a) cultivar una célula huésped de conformidad con la reivindicación 67 bajo ciertas condiciones tales que dicha célula huésped exprese el anticuerpo o un fragmento de enlace de epítipo, y (b) tomar el anticuerpo o un fragmento de
25 enlace de epítipo ahí expresado.

 70. Un método para producir un anticuerpo o un fragmento de

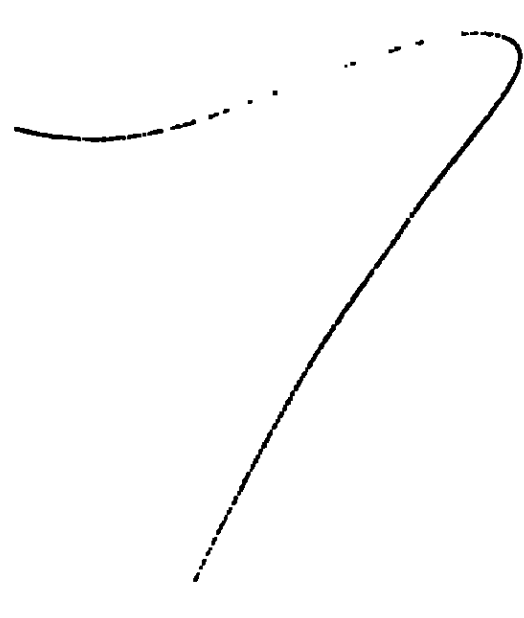
108
107

enlace de epítoto del mismo con la habilidad de enlazarse a CD33, dicho método consta de (a) cultivar una célula huésped de conformidad con la reivindicación 88 bajo condiciones tales que dicha célula huésped exprese el anticuerpo o un fragmento de enlace de epítoto, y (b) recolectar el anticuerpo o un fragmento de enlace de epítoto así expresado.

71. Un método para obtener CD33 a partir del material biológico, dicho método consta de: (a) poner en contacto el material biológico con el anticuerpo o fragmento de enlace de epítoto del mismo de conformidad con la reivindicación 1 o 2,

(b) permitir que el anticuerpo o fragmento de enlace de epítoto de la reivindicación 1 o 2 se enlace con CD33 en dicho material biológico, y

(c) aislar el anticuerpo o fragmento de enlace de epítoto que delimita el CD33 del material biológico, de ese modo se obtiene CD33 de un material biológico.



109
108**RESUMEN**

La presente invención se refiere a anticuerpos que enlazan CD33. De manera más particular, la invención se refiere a anticuerpos anti-CD33, fragmentos y homólogos de dichos anticuerpos, versiones humanizadas y recubiertas de dichos anticuerpos, equivalentes funcionales y versiones mejoradas de dichos anticuerpos, inmunoconjugados y composiciones que comprenden dichos anticuerpos y el uso de los mismos en el diagnóstico, investigación y aplicaciones terapéuticas. La invención se refiere también a un polinucleótido que codifica los anticuerpos, vectores que comprenden los polinucleótidos, células huésped transformadas con polinucleótidos y métodos para producir los anticuerpos.

Fotos 1204 111
targetas
as

109

NYO 2004043344

PCT/US2003/032737

Figura 1

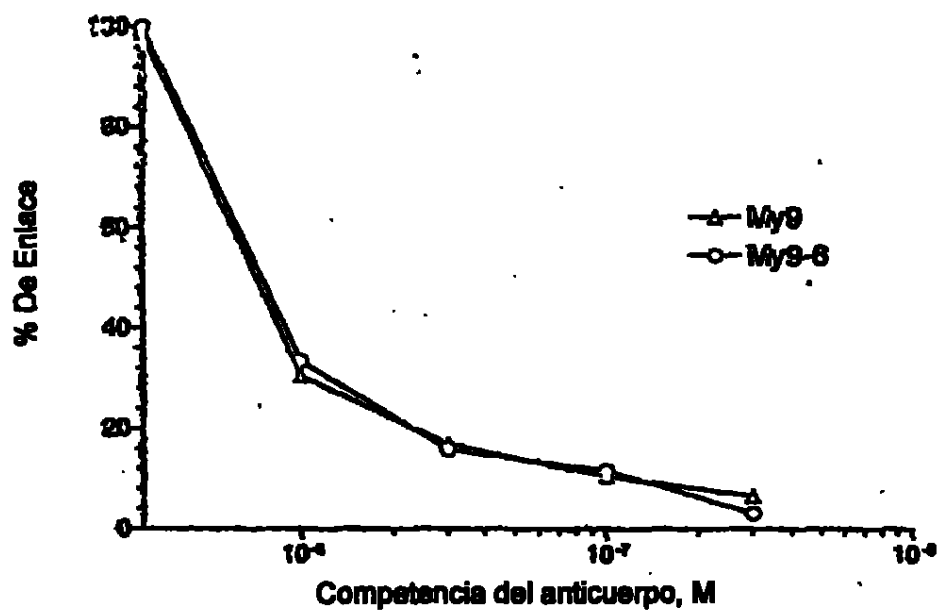


Figura 2

Cartilla degenerada My9-6 para la secuencia de señal de cadena

Nombre	Secuencia	SEC ID NO.
Leadseq1	TTTGAATCTGTTCTGGCTGTCXGNACTGCG	17
Leadseq2	TTTGAATCTGTTCTGGCTGTCXGNACTGCG	18
Leadseq3	TTTGAATCTGTTCTGGCTGTCXGNACTGCG	19

Nota: S = G-C, Y = C+T, W = A+T, N = A+T+C+G

Figura 3

Estructuras utilizados para pronosticar la Superficie a partir de la base de datos brookhaven 127

127 Brookhaven Structure Files Used for Surface Predictions									
2rcs	3hll	3hlm	1uf	1a3r	1bbj	43t4	1iab	efab	7lab
2qla	2hlp	2nd	1a6t	1axt	1bug	2hrp	2cl	2mcp	2pcp
1yuh	2biv	2cgr	3fab	1aob	1bvl	2dlb	2f19	2fb4	2fbj
1sm3	1tat	1vfn	q'bz	1z4j	1c1y	1vq2	1ycr	1yed	1yer
1nsn	1uvg	1usp	1-17	1ayl	1clx	1plg	1gsk	1nrf	1sbs
1ncd	1nfd	1ngp	1ary	1afv	1clw	1nid	1ama	1nmb	1nqb
1mcp	1mfb	1mim	1sc3	1z5f	1axs	1mlb	1mpa	1nbv	1ncb
1jls	1kb5	1frl	1ap2	1b2w	1adq	1kjp	1ktr	1lve	1mam
1iqw	1hgm	1gt	1ed0	1bal	1rfv	1wry	1kbf	1jel	1jhl
1gpo	1hll	1hyx	1a0q	1bjm	1clo	1ai	1lbq	1qcr	1uq
1fpz	1frg	1fvc	1aqq	1bin	1d5b	1gal	1gg1	1ghf	1qlg
1tor	1fti	1fdl	1a09	1bbd	1i56	1fgy	1fip	1fir	1ior
1d6l	1d6u	1a3l	1bto	1cap	1dsf	1dvl			

Figura 4

Iniciador	Secuencia	SEQ ID NO:
My96LCBmG1	TACAGGTGTACACTCCGATATTTGTGATCACCAGACTCC	20
My96LCOL1	ACTGGAAATCAAACGAACTGTGGCTGCACCATCTG	21
My96LCOL2	GCCACAGTTCTGTTTGATTTCCAGTTTGGTGCTCC	22
My96LCBmG1	TACAGGTGTACACTCCGAGTTAAGCTGCAGCAGTCTGG	23
My96HCOL1	CCACGGTCACCGTCTCTCTCAGCCTCCACC	24
My96HCOL2	GAGGCTGAGGAGACGGTGACCGTGGTCCC	25
My9-6LCNMLS	CAGGTGTACACTCCAAATATTATGCTCACCCAGATCCATCATC	26
My9-6HCOF	CAGGTGTACACTCCAGGTTTCACTGCACGACGCTGGGGCTG	27
My96HCO64-1	AGAACTTCCAAAGCCAGGCCAC	28
My96HCO64-2	CTTGCCTTGGAACTTCTGATTTG	29
My96HCO103	CGATGGGCCCTTGGTGGAGGCTGAGGAGACGGTGACCGTGGTCCCTTGGCCCCAGACATC	30
My96LCBVGFR	AGGTGTACACTCCGAGATTGTGCTCACCCAGAGTCCAGGATCTCTGGCTGTGTCTCCAGGAGAAAGGGTCACTATGAGC	31
My96LCR45	GCCTGGTACCAACAGATACCCAGGGCAGTCTCTAGACTTCTGATCTAC	32
My96LCF80-1	AGCAGTGTTCAACTGAAGACCTGGC	33
My96LCF80-2	GTCTTCAGTTGAACACTGCTGATGG	34
My96LCQ100	TTTTAAGCTTCGTTTGATTTCCAGTTTGGTGCTTGACCGAACGTCCG	35
My96LCNM	CAGGTGTACACTCCAATATTATGCTCACCCAGAG	36
My96LCR45	GCCTGGTACCAACAGATACCCAGGGCAGTCTCTTAAGTTCTGATCTAC	37
My96HCAm1	CGATGGGCCCTTGGTGGAGGCTGAGGAGACGGTGACCG	38
huMy96LCOL1	ACTGGAAATCAAACGTACGGTGGCTGCACCATCTG	39
huMy96LCOL2	GCCACCGTACGTTTGATTTCCAGTTTGGTGCTTTG	40
My96LCRM	CAGGTGTACACTCCGAGATTATGCTCACCCAGAG	41
My96LCNV	CAGGTGTACACTCCAATATTGTGCTCACCCAGAG	42
chMy96LCBelW1	TTTTCGTACGTTTGATTTCCAGTTTGGTGCC	43

CS0 2694334

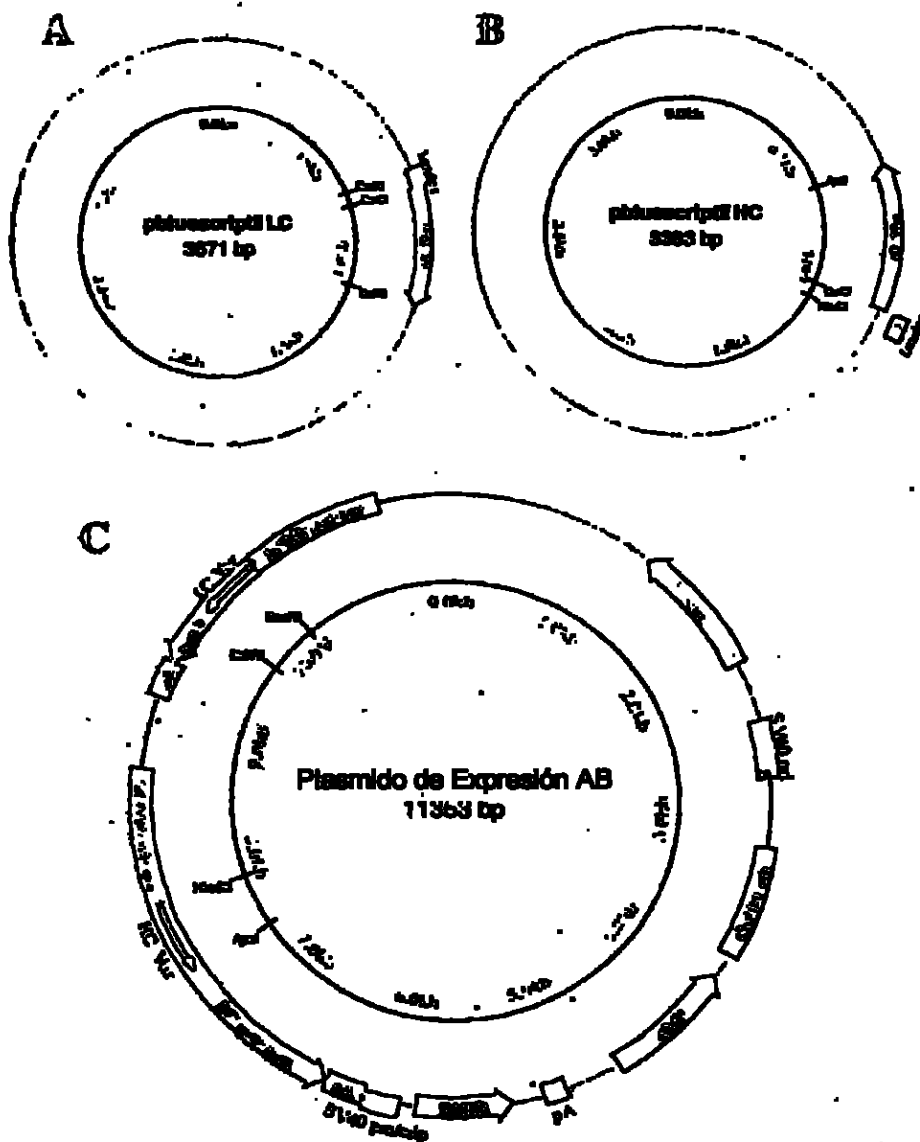
PC1715361377

327

111

AS
112

Figura 5



Secuencia terminal amino para cadena ligera del péptido muMy9-6

010 20941013344

Análisis de secuencia MS-MS de los fragmentos de cadena ligera del péptido de los CDR muMy-9-6

Figura 6B

PC77US2003/032757

Figura 7 Cadena pesada muMy9-6 de la secuencia interno/CDR3 péptido

muMy9-6 Heavy Chain Internal/CDR3 Peptide Sequence		SEQ ID NO:
1788 Da Sequence	(R) Y P D V W G A G T T V T V S S A K (T)	52
cDNA clone 2 (match)	E V R L R Y F D V W G A G T T V T V S S CDR3	53
cDNA clone 1 (no match)	M G E D A - M P Y W G Q G T S V T V S S CDR3	54

CVO 20040414

PC/USM001737

15

115

W/O 2824/01334

PCT/US2003/012737

Figura 8A

Cadena ligera (Secuencial numerador) (SEQ ID NO:55):

1 cacattatgctgacacagtcgccatcatctctggctgtgtctgca
1 M I M L T Q S P S S L A V S A

46 ggagaaaaggctcactatgagctgtaagtcagtoaaagtgttttt
16 G E K V T M S C K S S Q S V F
CDR1

91 ttcagttcaagtcagaagaactacttggcctggtaccaacagata
51 P S S S Q K E Y L A W Y Q Q I
CDR1

136 ccagggcagtcctcctaaacttctgatctactgggcattccactagg
46 P G Q S P K L L I Y W A S T R
CDR2

181 gaatctggtgtccctgatcgcttcacaggcagtggtatctgggaca
61 E S G V P D R F T G S G S G T

326 gattttactcttaccatcagcagtggtacaatctgaagacctggca
76 D F T L T I S S V Q S E D L A

271 atttattactgtcatcaatacctctcctcgcgagcgttcgggtgga
91 I Y Y C H Q Y L S S R T P G G
CDR3

316 ggcaccaaactggaaatcaaacga
106 G T K L E I K R

Figure 8B

Heavy Chain (sequential numbering) (SEQ ID NO 56):

1 caggtgcaactgcagcagcctggggctgaggtggtgaagcctggg
 1 Q V Q L Q Q P G A E V V K P G

36 gcctcagtgaagatgtcctgcaaggcttctggtacacatttacc
 16 A S V K M S C K A S G Y T F T

91 agttactatatacactggataaagcagacacctggacagggcctg
 31 S Y X I H N I K Q T P G Q G - L
 CDR1

136 gaatgggttggagttattttatccaggaaatgatgatatttcctac
 46 B W V G Y I Y P G N D D I S Y
 CDR2

181 aatcsgaagttcaaggccaaggccacattgactgcagacaaatcc
 51 N Q K F K G K A T L T A D K S
 CDR2

226 tccaccacagcctacatgcaactcagcagcctgacatctgaggac
 76 S T T A Y M Q L S S L T S E D

271 tctgcggtctattactgtgcaagagaggttcgtctacggtacttc
 91 S A V Y Y C A R E V R L R Y F
 CDR3

316 gatgtctggggcgagggaccacggtcaccgtctctctca
 106 D Y W G A G T T V T V S S

120
117

Figura 9

Murina My9-6 CDRs

Cadena ligera

SEQ ID NO:

CDR1: K S S Q S V F F S S S Q K N Y L A

4

CDR2: W A S T R E S

5

CDR3: H Q Y L S S R T

6

Cadena pesada

CDR1: S Y Y I H

1

CDR2: V I Y P G N D D I S Y N Q K F K G

57

CDR3: E V R L R Y F D V

3

Cadena pesada AbM

CDR1: G Y T F T S Y Y I H

58

CDR2: V I Y P G N D D I S

59

CDR3: E V R L R Y F D V

3

127
118

Figura 10

Comparaciones de secuencia GerMLine

Cadena Liviana

		50
3-27	NIDMTQSPSSLAIVSAGEKVTMSCKSSQSVLYESNQINYLAWYQQKPGQSP	
mmMy9-6	...L.....PF..S.....I.....	
		99
3-27	KLLIYHASTRESGVPRFTGSGSQTDFLTITSSVQAEDLAVYYCHQYLS	
mmMy9-6	S.....I.....	

Cadena Pesada

		50
V102	-VQLQQPGAELVKPGASVKVBCSKASGYTFTSYMMHETVKQRPGQGLEWIGR	
mmMy9-6	Q.....V.....M.....YI..I..T.....V.V	
		98
V102	IHPSDSDTNYNQKFEGRATLTVDKSSSTAYNQLSSLTSEDSAVYYCA-	
mmMy9-6	.Y.GND.IS.....A...T.....R	

2 SEQ ID NO:60
3 SEQ ID NO:61

Sequential residue numbering

Figura 11A

Diez secuencias de cadena ligera con estructuras más homologas

	1				50
My96	NIMLTQSPSS	LAVSAGEKVT	MSCKSSQSVP	FSSBQKNYLA	WYQQIPGQSP
1abc	DIVMSQSPSS	LAVSVGEKVT	MTCKSSQSLL	YSSBQKNYLA	WYQQKPGQSP
1hil	DIVMTQSPSS	LVTAGEKVT	MSCTSSQSLP	MSGKQKNYLT	WYQQIPGQPP
1a5f	DIVMTQSPSS	LVTVTGEKVT	MTCKSSQSLL	MSGAKKNYLT	WYQQKPGQSP
1a3r	DIVMTQSPSS	LVTVTGEKVT	MTCKSSQSLL	MSRTQKNYLT	WYQQKPGQSP
1frg	DIVMTQSPSS	LVTAGEKVT	MSCKSSQSLP	MSGKRNKPLT	WYHQKPGQPP
1mcp	DIVMTQSPSS	LSVAGEKVT	MSCKSSQSLL	MSGKQKNYLA	WYQQKPGQPP
03c9	DVMTQTPSS	LAMSVGQKVT	MSCKSSQSLL	WISBQKNYLA	WYQQKPGQSP
1lve	DIVMTQSPSS	LAVSLGERAT	MSCKSSQSVL	YSSNSKNYLA	WYQQKPGQPP
1ap2	DIVMTQSPSS	LVTAGEKVT	MSCKSSQSLL	MSGKQKNYLT	WYQQKPGQPP
1nch	DIVMTQSPKF	MSTSVGDRVT	ITCKABQDVS	T.....AVV	WYQQKPGQSP
					100
My96	KLLIYWASTR	ESGVPRDFTG	SGSGTDFTLT	ISSVQSEDLA	IYYCQYLSS
1abc	KLLIYWASTR	ESGVPRDFTG	SGSGTDFTLT	ISSVEAEDLA	VYYCQYHSY
1hil	KVLIYWASTR	ESGVPRDFTG	SGSGTDFTLT	ISSVQAEOLA	VYYCQNDYSN
1a5f	KLLIYWASTR	ESGVPRDFTG	SGSGTDFTLS	ISGVQAEOLA	VYYCQKNYNY
1a3r	KLLIYWASTR	ESGVPRDFTG	SGSGTDFTLS	ISGVQAEOLA	VYYCQNDYNY
1frg	KLLIYWASTR	ESGVPRDFBG	SGSGTDFTLT	ITSVQAEOLA	IYYCQNDYSH
1mcp	KLLIYQASTR	ESGVPRDFTG	SGSGTDFTLT	ISSVQAEOLA	VYYCQNDHSY
03c9	KLLIYFASR	ESGVPRDFIG	SGSGTDFTLT	ISSVQAEQDA	DYPCQQHRYA
1lve	KLLIYWASTR	ESGVPRDFSG	SGSGTDFTLT	ISSLQAEOLA	VYYCQYYST
1ap2	KLLIYWASTR	ESGVPRDFTG	SGSGTDFTLT	ISSVQAEOLA	VYYCQNDYSY
1nch	KLLIYWASTR	HIGVPRDFAG	SGSGTDYTLT	ISSVQAEOLA	LYYCQQHYSY
					115
My96	PLTFGGGTEL	ELKRA	(SEQ ID NO: 62)		
1abc	PFTFGSGTEL	ELKRA	(SEQ ID NO: 63)		
1hil	PLTFGGGTEL	ELKRA	(SEQ ID NO: 64)		
1a5f	PLTFGAGTEL	ELKRA	(SEQ ID NO: 65)		
1a3r	PLTFGAGTEL	ELKRA	(SEQ ID NO: 66)		
1frg	PLTFGAGTEL	ELKRA	(SEQ ID NO: 67)		
1mcp	PLTFGAGTEL	ELKRA	(SEQ ID NO: 68)		
03c9	PRTFGGGTEL	ELK	(SEQ ID NO: 69)		
1lve	PYSFGQGTTEL	ELKR	(SEQ ID NO: 70)		
1ap2	PLTFGAGTEL	EPG	(SEQ ID NO: 71)		
1nch	PWTFGGGTEL	ELKRA	(SEQ ID NO: 72)		

La enumeración del residuo es secuencial

123
170

Figura 11B

Diez secuencias de cadena pasada con estructuras más homologas

	1				50
cy96	QVQLQQPGAE	VVKPGASVKH	SCIASGYTFT	SYTIRMNQY	PGQLEHWGV
lp1g	QIQLOQSGPS	LVRPGASVKI	SCIASGYTFT	DYKIMVWQR	PGEGLHWGN
lao6	QIQLOQSGPS	LVRPGASVKI	SCIASGYTFT	DYKIMWQQR	PGQLEHWGN
lfor	QQQLQQSGAE	LVRPGASVKI	SCIASGYTFS	SPWVWVWQR	PGQLEHWIQ
liqy	.VILQESGAE	LARPGASVKH	SCIASGYTFT	TYTIRMWQR	PGQLEHWIGY
lbbj	XVQLQQSDAE	LVRPGASVKI	SCIASGYTFT	DEALIMWQR	PGQLEHWIGY
lnqb	.VQLQSGAE	LVRPGASVKL	SCIASGYTFT	SYNIMWVQR	PGEGLHWIGR
lnim	.QLQSGTV	LARPGASVKH	SCIASGYTFT	KYNIMWQQR	PGQLEHWIGA
la6t	EVQLQQSGPD	LVRPGASVKI	SCIASGYTFS	TYNIMWVQS	HGKLEHWIGR
ld5b	QVQLQQSGAE	LAKPGASVKI	SCIASGYTFS	SPWIMWVQR	PGEGLHWIGR
lfa1	QVQLQQSGAE	LVRAGSSVKH	SCIASGYTFT	SYGVWVWQR	PGQLEHWIGY
					100
cy96	IYPGDDISY	NQKFGKATL	TADKSSSTAY	NQLSSLTSED	SAVYYCAREV
lp1g	IYPGSGNTKY	NEKFGKATL	TVDTSSSTAY	NQLSSLTSED	SAVYFCARGG
lao6	IDPGSGNTKY	NEKFGKATL	TVDTSSSTAY	NQLSSLTSED	TAVYFCAREK
lfor	IYPGDDGMY	NQKFGKATL	TADKSSSTAY	NQLSSLTSED	SAVYFCAREG
liqy	INPSSVYTN	NQKFGKATL	TVDRSSSTAY	NQLSSLTSED	SAVYVCVREG
lbbj	ISPDDIDKY	NEKFGKATL	TADKSSSTAY	NQLSSLTSED	SAVYFCIRSY
lnqb	IDPSSGGTKY	NEKFGKATL	TVDRSSSTAY	NQLSSLTSED	SAVYFCARYD
lnim	IYPGSDTHY	NQKFGKAKL	TAVTSASTAY	NQLSSLTSED	SAVYTCRDY
la6t	VDPSSGGTSF	NQKFGKAIL	TVDRSSSTAY	NQLSSLTSED	SAVYFCARD
ld5b	ILPSSGGTHY	NEKFGKATL	TADKSSSTAY	NQLSSLTSED	SAVYFCARGH
lfa1	INPSSGYLEY	NEKFGKATL	TVDRSSSTAY	NQLSSLTSED	SAVYFCARSP
					124
cy96	RLAY.....	FDVWGAGTTV	TVSS	(SEQ ID NO:73)	
lp1g	R.....FA	MDYWGQGTSTV	TVSS	(SEQ ID NO:74)	
lao6	TTY.....YA	MDYWGQGTSTV	TVSS	(SEQ ID NO:75)	
lfor	WTFY.....A	MDYWGQGTSTV	TVSS	(SEQ ID NO:76)	
liqy	E	VPYWGQGTSTV	TVSS	(SEQ ID NO:77)	
lbbj	YGEN.....	...QGTTTL	TVSS	(SEQ ID NO:78)	
lnqb	YVGS.....SY	FDYWGQGTSTV	TVSS	(SEQ ID NO:79)	
lnim	GYTF.....	.DFWGQGTTL	TVSS	(SEQ ID NO:80)	
la6t	DY.....Y	FDYWGQGTSTL	TVSS	(SEQ ID NO:81)	
ld5b	SYTFY....D	GDYWGQGTSTV	TVSS	(SEQ ID NO:82)	
lfa1	YGGEDLAVYY	FDYWGQGTTL	TVSS	(SEQ ID NO:83)	

La enumeración del residuo es secuencial

Figura 12A

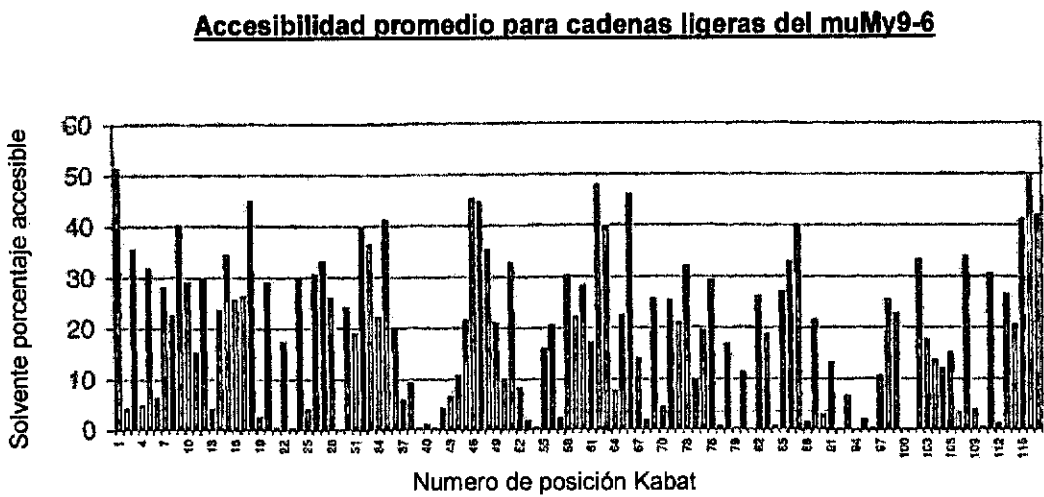


Figura 12B

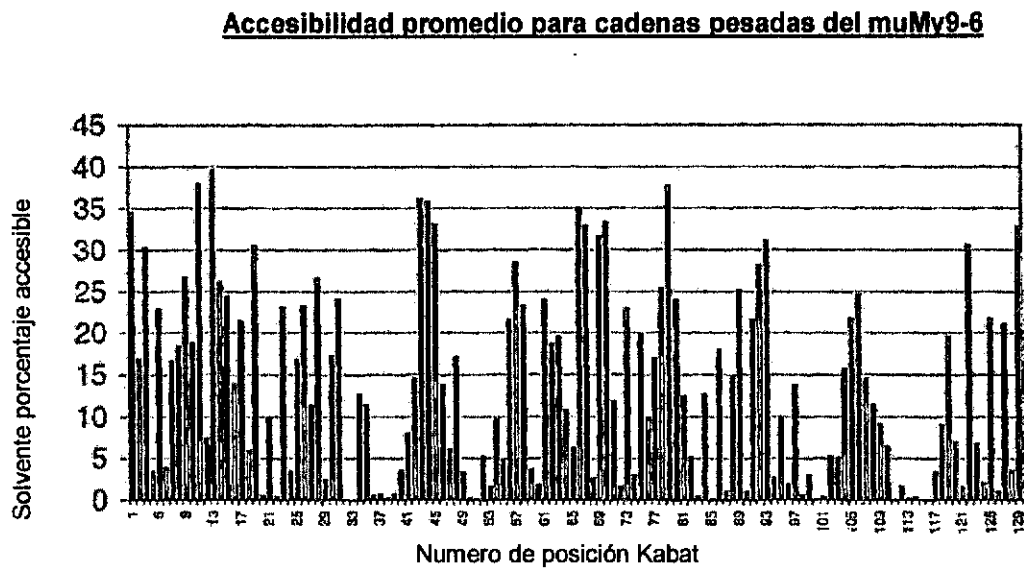


Figura 13A

Cadena liviana muMy9-6 Residuos de Superficie

muMy9-6 Light Chain Surface Residues						
Kabat Position #	Average accessibility	> 30% Ave acc	25%-35% Ave acc	Identical flank		muMy9-6 surface
1	51.46	1				N1
3	35.42	3				M3
5	31.82	5	5	NA		T5
7	28.04		7	26.17		
9	40.08	9				S9
10	29.04		10	27.76		
12	29.63		12	22.32	other A's	
15	34.39	15	15	18.20	33.36	A15
16	25.61		16	NA		
17	26.21		17	25.11		
18	44.83	18				K18
20	28.91		20	29.11		
40	45.25	40				P40
41	44.52	41				G41
42	35.34	42				Q42
45	32.68	45	45	32.58		K45
57	39.81	57				G57
60	46.07	60				D60
63	25.60		63	26.87		
65	25.28		65	24.07		
67	32.05	67	67		11ve left out	S67
70	29.16		70	29.28	30.13	D70
76	26.02		76	24.29		
79	26.83		79	NA		
80	32.78	80	80	NA		S80
81	39.95	81				E81
100	33.79	100	100	34.05		G100
103	30.30	103	103	30.30		K103
105	26.42		105	26.96		
107	41.06	107				K107
108	49.29	108				R108
109	41.85	109				A109

Figura 13B

Cadena Pesada muMy9-8 Residuos de Superficie

muMy9-6 Heavy Chain Surface Residues					
Kabat Position #	Average accessibility	> 30% Ave accessibility	25%-35% Ave acc	Identical flank	muMy9-6 surface
1	40.08	1			Q1
3	38.62	3			Q3
5	28.06		5	NA	
9	35.94	9			A9
11	48.07	11			V11
13	49.75	13			K13
14	32.39	14	14	32.20	P14
15	30.69	15	15	31.84	Q15
17	26.01		17	26.67	
19	37.64	19			K19
23	29.92		23	30.11	K23
26	29.48		26	31.43	G26
28	33.67	28	28	35.59	T28
41	44.46	41			P41
42	46.28	42			Q42
43	42.00	43			Q43
52B	25.21		52B	25.21	
53	28.84		53	28.84	
56	29.08		56	29.08	
61	43.12	61			Q61
62	44.46	62			K62
64	38.56	64			K64
65	41.85	65			G65
68	28.38		68	28.30	
70	25.14		70	28.21	
73	32.97	73	73	35.71	K73
74	47.68	74			S74
75	26.67		75	27.22	
82B	32.62	82B	82B	30.58	S82B
83	26.03		83	26.52	
84	35.34	84			S84
85	37.78	85			E85
105	36.29	105			A105
108	25.74		108	28.73	
110	26.94		110	23.38	
112	41.61	112			S112

Figura 14

**Residuos de superficie mUmY8-8
dentro de 5A de un residuo CDR**

Light chain	Heavy chain
N1	Q1
M3	T28
T5	K64
K45	K73
G57	
D60	
S67	
D70	

Figura 15

Las cinco superficies humanas mas homologas del anticuerpo

Antibody	Light Chain	SEQ ID NO:	Heavy Chain	SEQ ID NO:
mmkMy9-6	<u>WNTSAKPGQKQGDSD</u> SEQKXRA	84	QQA VKPGKGTFGQQKKGSSSEAS	90
21H9	DQTSVRPGEKQSSDPEGKKRT	85	QQA VKPGKGTFGQQKQGTPESEKS	91
HL-14	DVTSVRPGEKQSSDPEGKKR-	86	QQA AKPGKGTFGQQKQGSSEESQS	92
CLL-412	DQTSVRPGKKGSSDPEQKKRT	87	QQA VKPGKGTFGQQKQGTSEESQS	93
LC3bPE	EVTGPRPGQQRGSDPEQKKR-	88	-QAVKPGKGTFGQQKQGRSSSEQS	94
CLL1.69	DVTLFPQGQRGDADAQKKR-	89	QQA VKPGKGTFGQQKQGRSSSEQS	95

228-
125

WFO 2004/043344

PCT/US2003/032737

Figura 16A

Versiones de cadenas ligeras humanizadas My9-6

Códot 4	10	20	27h	34	44
hMy9-6	<u>SHLTQSPFS</u>	<u>LAVHGGGVY</u>	<u>CSCKSSQSVY</u>	<u>FSSSQGNLYA</u>	<u>HTQQTQQSP</u>
hMy9-6 V1.0	<u>SHLTQSPFS</u>	<u>LAVHGGGVY</u>	<u>CSCKSSQSVY</u>	<u>FSSSQGNLYA</u>	<u>HTQQTQQSP</u>
hMy9-6 V1.1	H.M.....				
hMy9-6 V1.2	H.M.....				
hMy9-6 V1.3	H.V.....				
hMy9-6 V1.4	H.M.....				
hMy9-6 V1.5	H.M.....				
hMy9-6 V1.6	H.V.....				
hMy9-6 V1.7	H.V.....				
hMy9-6 V1.8	H.M.....				
hMy9-6 V1.9	H.H.....				
hMy9-6 V1.10	H.H.....				
hMy9-6 V1.11	H.H.....				
hMy9-6 V1.12	H.V.....				
hMy9-6 V1.13	H.V.....				
hMy9-6 V1.14	H.V.....				
hMy9-6 V1.15	H.V.....				

Códot 5	54	64	74	84	94
hMy9-6	<u>ALLTHASTR</u>	<u>ESGVDRFTG</u>	<u>SGSGTDFLT</u>	<u>ISSVQGNLA</u>	<u>IYTCQQLSS</u>
hMy9-6 V1.0	<u>ALLTHASTR</u>	<u>ESGVDRFTG</u>	<u>SGSGTDFLT</u>	<u>ISSVQGNLA</u>	<u>IYTCQQLSS</u>
hMy9-6 V1.1	K.....				
hMy9-6 V1.2	K.....				
hMy9-6 V1.3	R.....				
hMy9-6 V1.4	R.....				
hMy9-6 V1.5	R.....				
hMy9-6 V1.6	K.....				
hMy9-6 V1.7	K.....				
hMy9-6 V1.8	R.....				
hMy9-6 V1.9	R.....				
hMy9-6 V1.10	K.....				
hMy9-6 V1.11	K.....				
hMy9-6 V1.12	R.....				
hMy9-6 V1.13	R.....				
hMy9-6 V1.14	K.....				
hMy9-6 V1.15	K.....				

Códot 9	109	
hMy9-6	<u>RTFGQNTLE</u>	IKR (SEQ ID NO:6)
hMy9-6 V1.0	<u>RTFGQNTLE</u>	IKR (SEQ ID NO:10)
hMy9-6 V1.1		
hMy9-6 V1.2		
hMy9-6 V1.3		
hMy9-6 V1.4		
hMy9-6 V1.5		
hMy9-6 V1.6		
hMy9-6 V1.7		
hMy9-6 V1.8		
hMy9-6 V1.9		
hMy9-6 V1.10		
hMy9-6 V1.11		
hMy9-6 V1.12		
hMy9-6 V1.13		
hMy9-6 V1.14		
hMy9-6 V1.15		

Figura 16B

Versiones de cadenas pesadas humanizadas My9-6

Labat 0	10	20	30	40	50
My9-6	QVQLQQPGAE	VVKFGASVEN	SCASQYTF	SYLDSINQT	PGQLNNGV
My9-6 V1.0	QVQLQQPGAE	VVKFGASVEN	SCASQYTF	SYLDSINQT	PGQLNNGV
My9-6 V1.1					
My9-6 V1.2					
My9-6 V1.3					
My9-6 V1.4					
My9-6 V1.5					
My9-6 V1.6					
My9-6 V1.7					
My9-6 V1.8					
My9-6 V1.9					
My9-6 V1.10					
My9-6 V1.11					
My9-6 V1.12					
My9-6 V1.13					
My9-6 V1.14					
My9-6 V1.15					

Labat 0	59	69	79	86	96
My9-6	IVFGEDISY	NKPKGKATL	TAKSSTAY	LQLSLTSD	SAVYTCAREV
My9-6 V1.0	IVFGEDISY	NKPKGKATL	TAKSSTAY	LQLSLTSD	SAVYTCAREV
My9-6 V1.1		K.....			
My9-6 V1.2		Q.....			
My9-6 V1.3		K.....			
My9-6 V1.4		Q.....			
My9-6 V1.5		K.....			
My9-6 V1.6		Q.....			
My9-6 V1.7		K.....			
My9-6 V1.8		Q.....			
My9-6 V1.9		K.....			
My9-6 V1.10		Q.....			
My9-6 V1.11		K.....			
My9-6 V1.12		Q.....			
My9-6 V1.13		K.....			
My9-6 V1.14		Q.....			
My9-6 V1.15		K.....			

Labat 8	105	112	
My9-6	RLKIPDWGA	OTTIVVS	(SEQ ID NO:7)
My9-6 V1.0	RLKIPDWGA	OTTIVVS	(SEQ ID NO:9)
My9-6 V1.1			
My9-6 V1.2			
My9-6 V1.3			
My9-6 V1.4			
My9-6 V1.5			
My9-6 V1.6			
My9-6 V1.7			
My9-6 V1.8			
My9-6 V1.9			
My9-6 V1.10			
My9-6 V1.11			
My9-6 V1.12			
My9-6 V1.13			
My9-6 V1.14			
My9-6 V1.15			

130

127

WO 2004/043344

PCT/US2003/032737

Figura 17

Valores Mv9-6 Kp			
	Direct on Membranes	Competitive on Membranes	Direct on Cells
	pM	pM	nM
murine	51.34+/-8.74	173.64+/-39.29	1.10+/-0.13
V1.0	66.53+/-17.83	209.00+/-52.37	1.02+/-0.04
V1.1	83.57+/-13.82	279.50+/-152.03*	1.07+/-0.11*
V1.3	63.95+/-0.64*	203.05+/-153.83*	1.16+/-0.39*
V1.6	56.10+/-15.13*	216.50+/-70.00*	0.97+/-0.08*

Figura 18

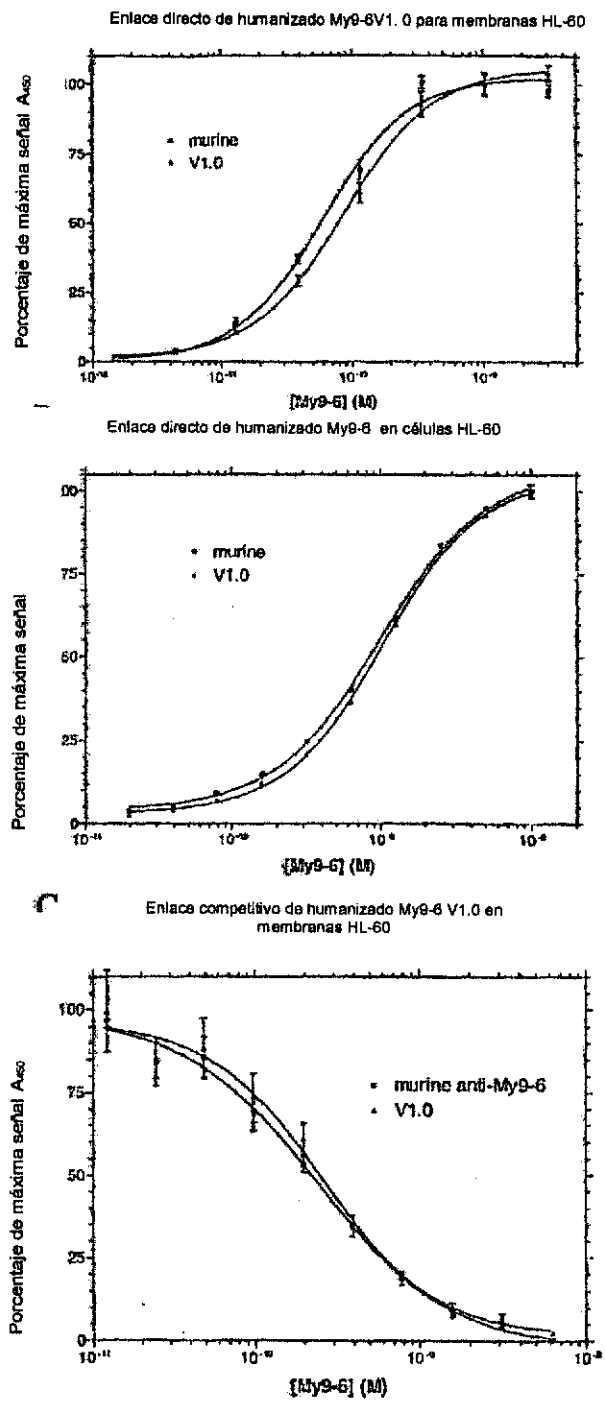


Figura 19

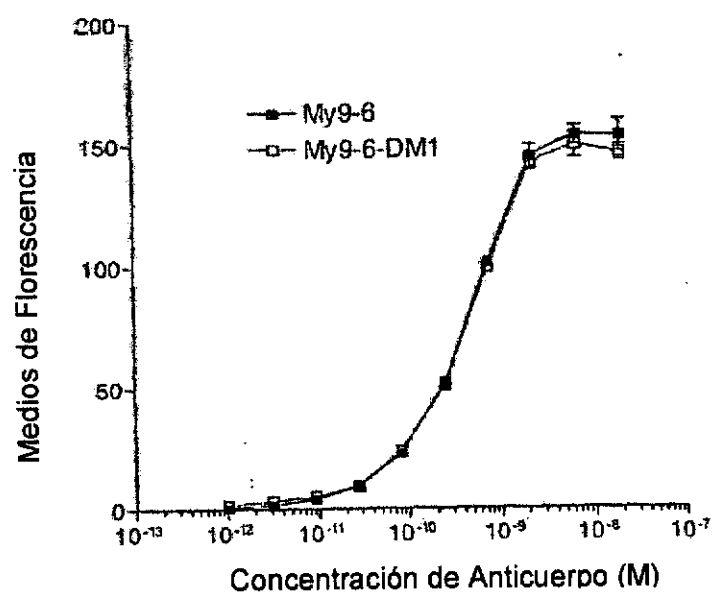


Figura 20

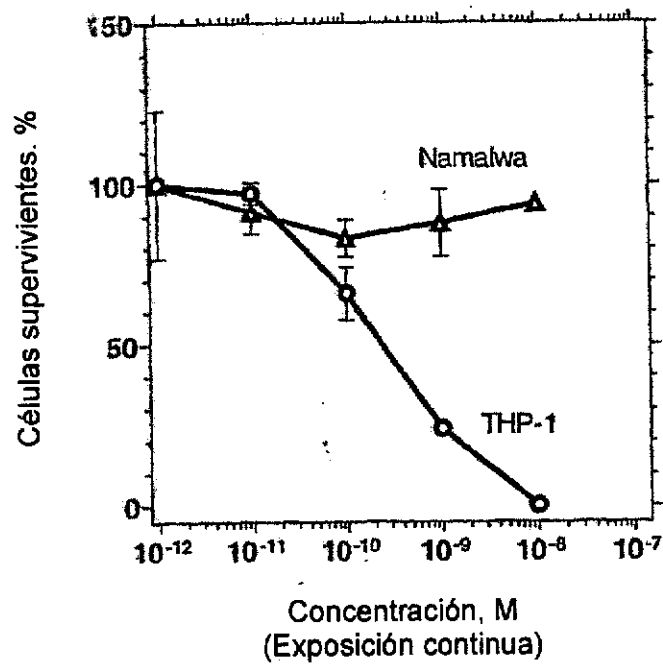
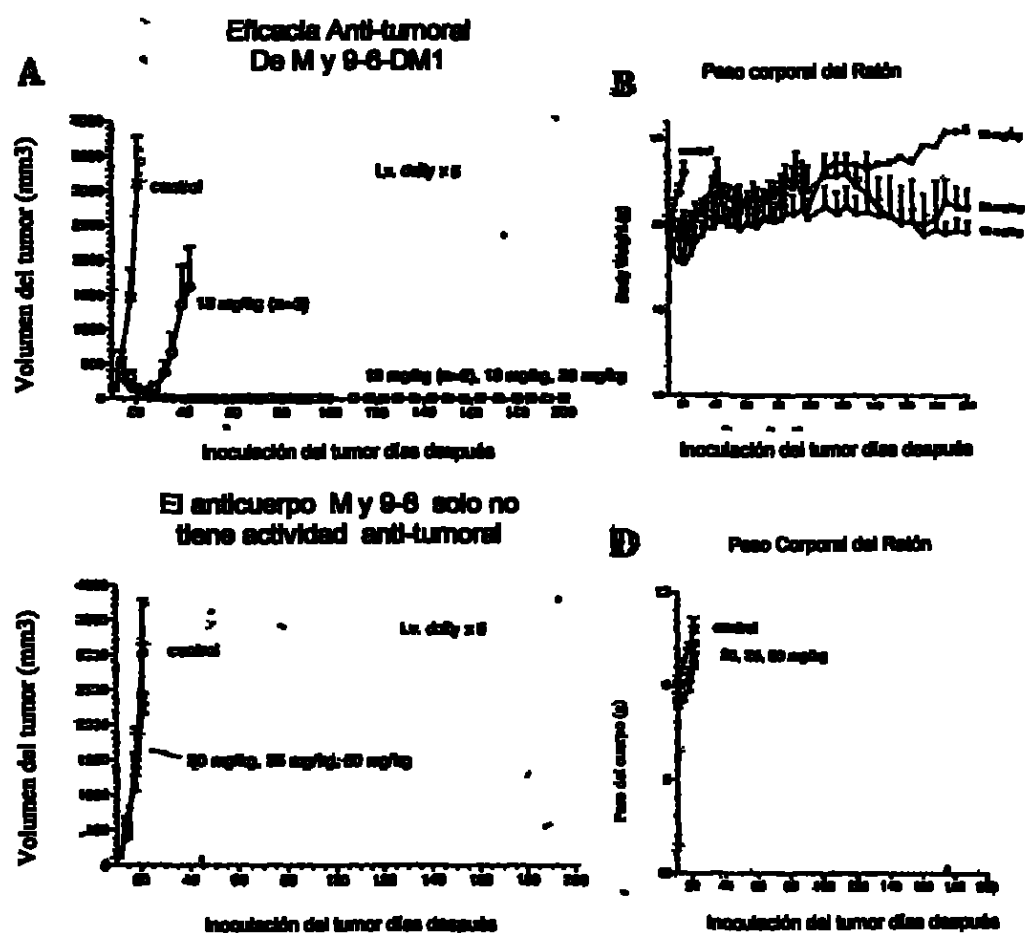


Figura 21

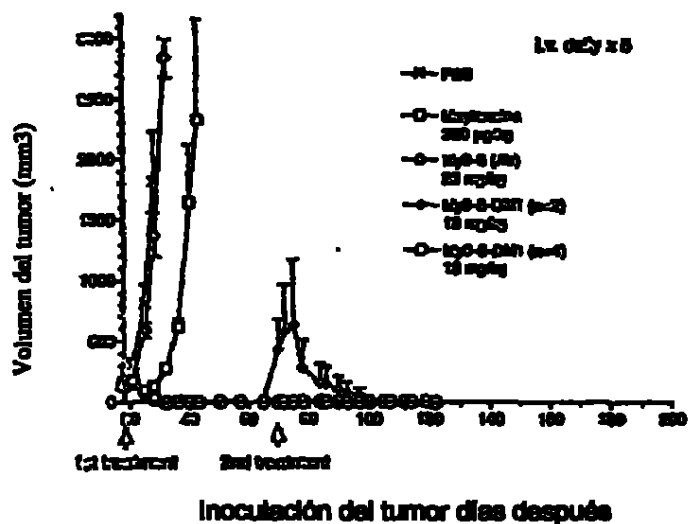


-134

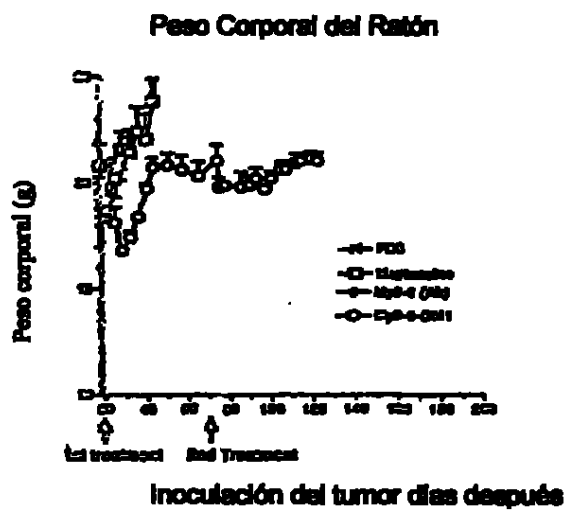
131

Figura 22

A



B



155
132

Figura 23A

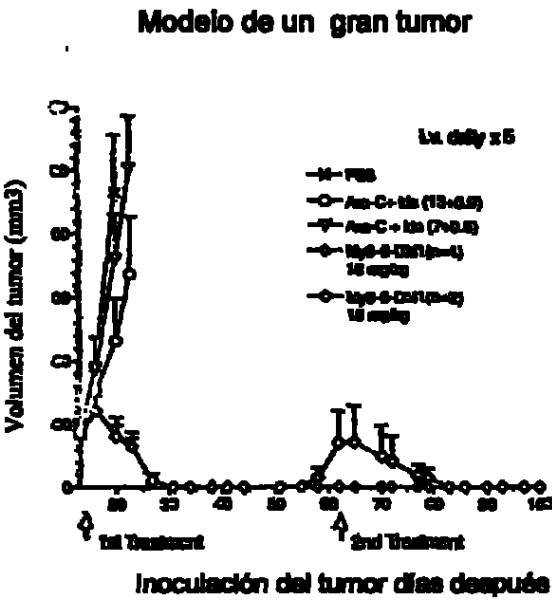
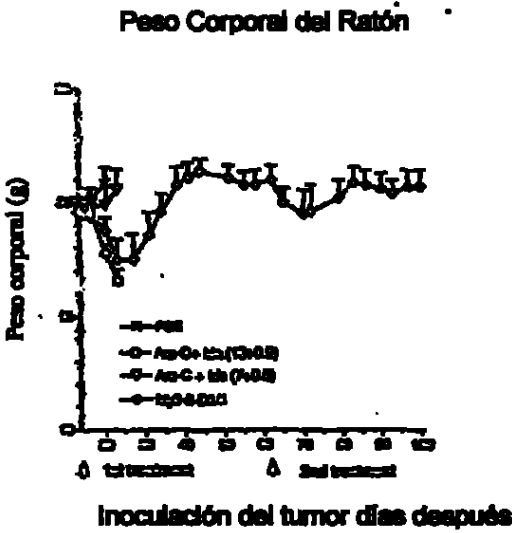


Figura 23B

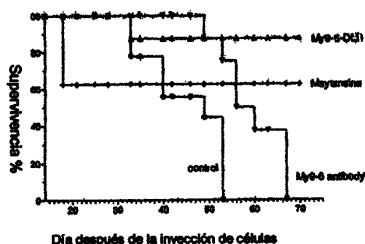


WFO 260403344

PCT/US2003/01737

Figura 24A

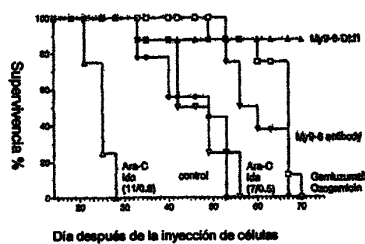
Eficacia de M y 9-6-DM1 en modelo de Supervivencia



25/25

Figura 24B

Comparación de M y 9-6-DM1 para Ozogamizín Gemtuzumab y quimioterapia



136

Machine 100-1000

Machine	Machine
COR: KASQSVFFSSSQENYLA	4
COR: WASTRES	5
COR: HQYLSST	6
Machine	
COR: SYVIN	1
COR: VIYPGNDDISYNQKFKG	57
COR: EVLELYFDV	3
Machine	
COR: GYFTSYVIN	58
COR: VIYPGNDDIS	59
COR: EVLELYFDV	3

Machine 100-1000

Machine	Machine
COR: KASQSVFFSSSQENYLA	4
COR: WASTRES	5
COR: HQYLSST	6
Machine	
COR: SYVIN	1
COR: VIYPGNDDISYNQKFKG	57
COR: EVLELYFDV	3
Machine	
COR: GYFTSYVIN	58
COR: VIYPGNDDIS	59
COR: EVLELYFDV	3

138
139

APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. Country: United States of America

This public document

2. has been signed by L. Edelen

3. acting in the capacity of Certifying Officer

4. bears the seal/stamp of Patent and Trademark Office

Certified

5. at Washington, D.C.

6. the first of April, 2005

7. by Assistant Authentication Officer, United States Department of State

8. No. 05015291-1

9. Seal/Stamp:

10. Signature:

Sonya N. Johnson



1.19 MAY 2005
Circulo de la Oficina de Patentes y Marcas Registradas
CIRCULO DE LA OFICINA DE PATENTES Y MARCAS REGISTRADAS
TESTIFICA: Que la presente copia corresponde exactamente con el original que se le presenta.
Escritorio de Dto. 1.19 MAY 2005
Dpto. de Estado

139

136

A 761233



UNITED STATES OF AMERICA

TO ALL TO WHOM THESE PRESENTS SHALL COME

UNITED STATES DEPARTMENT OF COMMERCE
United States Patent and Trademark Office

March 29, 2005

THIS IS TO CERTIFY THAT ANNEXED IS A TRUE COPY FROM THE
RECORDS OF THIS OFFICE OF A DOCUMENT RECORDED ON
November 07, 2002.

DECLARACION DE AUTENTICIDAD
El NOTARIO del CIRCULO DE SANTO
DE BOGOTA, TESTIFICA Que la present
copia coincide exactamente con el original
que tuvo a la vista de
Escritura de Bog.

By Authority of the
COMMISSIONER OF PATENTS AND TRADEMARKS



L. Edelen

L. EDELEN
Certifying Officer

137

11-14-2002

PTO-1593 (modified)
m. 03/01)
40 No. 0651-0027



102280962

HEET

U.S. DEPARTMENT OF COMMERCE
U.S. Patent and Trademark Office

P8427

To the Honorable Commissioner of Patents and Trademarks: Please record the attached original documents or copy thereof.

Name of conveying party(ies):

Mary G. Hoffee
Daniel Tavares
Robert J. Lutz

2. Name and address of receiving party(ies):

IMMUNOGEN INC.
128 Sidney Street
Cambridge, MA 02139-4239

31040 U.S. PTO
60/424332
08/07/02

11/07/02

Additional name(s) of conveying party(ies) attached? ☐ Yes ☒ No

3. Nature of conveyance:

- ☒ Assignment ☐ Merger
☐ Security Agreement ☐ Change of Name
☐ Other

Execution Date: November 7, 2002

Additional name(s) & address(es) attached? ☐ Yes ☒ No

4. Application number(s) or patent number(s):

If this document is being filed together with a new application, the execution date of the application is: November 7, 2002

A. Patent Application No.(s)

60/424332

B. Patent No.(s)

Additional numbers attached? ☐ Yes ☒ No

5. Name and address of party to whom correspondence concerning document should be mailed:

SUGHRUE MION, PLLC
2100 Pennsylvania Avenue, N.W.
Suite 800
Washington, D.C. 20037-3213

6. Total number of applications and patents involved:

7. Total fee (37 CFR 3.41): \$40.00

- ☐ Enclosed.
☒ Authorized to be charged to Deposit Account No. 19-4880.
The USPTO is directed and authorized to charge all required fees, except for the Issue Fee and the Publication Fee, to Deposit Account No. 19-4880. Please also credit any overpayments to said Deposit Account.

8. Deposit Account Number:

19-4880

(Attach duplicate copy of this page if paying by deposit account)

DO NOT USE THIS SPACE

9. Statement and signature.

To the best of my knowledge and belief, the foregoing information is true and correct and any attached copy is a true copy of the original document.

Drew Hising

Reg. No. 44,765

Total number of pages including cover sheet, attachments, and fee payment:

Mail documents to be recorded with required cover sheet information to:

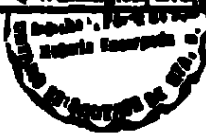
Commissioner of Patents & Trademarks

Box Assignment

Washington, D.C. 20541

AGENCIA DE INVENTACION
EL NOTARIO A. DE
REINVENTOS DEL CIRCULO
DE INVENTOS DE BUGOTA TESTIFICA
copia fotostatica
firmada por la vi.
de 1999

11/12/2002 171021 00000169 194000 60404332
01 FEB0021 40.00 CH



Santafé de Btá.

GEORGINA IDALIA FORERO
Notaria Publica

PATENT
REEL: 013474 FRAME: 0990

144

138

2

3:47PM

IMMUNOGEN, INC

NO. 681

P. 2/4

Docket No. P8427
For U.S. Clients

Assignment

Whereas, I/We, Mary G. Hoffee, Daniel Tavares, and Robert J. Lutz of 59 Leland Road, Woburn, MA 02467, 27 Sylvester Road, Natick, MA 01760, 218 Old Connecticut Path, Woburn, MA 01778, respectively, hereinafter called assignor(s), have invented certain improvements in ANTI-CD33 ANTIBODIES AND METHODS FOR TREATMENT OF ACUTE MYELOID LEUKEMIA USING THE SAME and filed a United States Provisional Patent Application therefor; and

Whereas, IMMUNOGEN INC., 128 Sidney St., Cambridge MA 02139-4239 (assignee), desires to acquire the entire right, title, and interest in the application and invention, and to any United States patents to be obtained therefor;

Now therefore, for valuable consideration, receipt whereof is hereby acknowledged,

I/We, the above named assignor(s), hereby sell, assign and transfer to the above named assignee, its successors and assigns, the entire right, title and interest in the application and the invention disclosed therein for the United States of America and all countries foreign thereto, including rights of priority under the International Convention of Paris (1883) as amended, and I/we request the Director - U.S. Patent and Trademark Office to issue any Letters Patent granted upon the invention set forth in the application to the assignee, its successors and assigns; and I/we hereby agree that the assignee may apply for foreign Letters Patent on the invention and I/we will execute without further consideration all papers deemed necessary by the assignee in connection with the United States and foreign applications when called upon to do so by the assignee.

I/We hereby authorize and request our attorneys SUGHRUB MION, PLLC of 2100 Pennsylvania Avenue, NW, Washington, DC 20037-3213 to insert here in the parentheses (Application number _____ and Confirmation number _____, filed _____) the application number and filing date of said application when known.

Date: November 7, 2002 Mary G. Hoffee
w/Mary G. Hoffee
Date: November 7, 2002 Daniel Tavares
w/Daniel Tavares
Date: November 7, 2002 Robert J. Lutz
w/Robert J. Lutz

(Legalization not required for recording but is prima facie evidence of execution)



DECLARACION DE AUTENTICACION
El Notario Publico de Santa Fe de Bogotá TESTIFICA
Que la presente copia es una copia
exactamente con la fotocopia que tuvo a la vista
Santa Fe de Bogotá, de 10 de 1999

MANUELA IDALIA PEREZ S. GARCIA
Notaria (M) Registrada

RECORDED: 11/07/2002

PATENT
REEL: 013474 FRAME: 0991

142
139

TRADUCCION OFICIAL No. 081-05, DE UN DOCUMENTO ESCRITO EN INGLÉS, SELLADO CON EL SELLO DEL SUSCRITO TRADUCTOR OFICIAL, HOY ABRIL 12 DEL 2005, EN LA CIUDAD DE BOGOTÁ D.C., REPUBLICA DE COLOMBIA.

CESION

Por cuanto, Nosotros, Mary G. Hoffee, Daniel Tavares, y Robvert J. Lutz de 59 Leland Road, Brookline MA 02467, 27 Sylvester Road, Natick MA 01760, 218 Old Connecticut Path, Wayland, MA 01778, respectivamente, de aquí en adelante llamados los Cedentes, hemos inventado con certeza mejoras en los ANTICUERPOS ANTI-CD33 Y LOS MÉTODOS PARA EL TRATAMIENTO LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA USANDO LOS MISMOS y presentaron una Solicitud de Patente Provisional de los Estados Unidos para los mismos, y

Por cuanto, IMMUNOGEN, INC., 128 Sidney Street, Cambridge, MA 02139-4239 (Cesionario), desea adquirir los derechos, títulos e intereses completos en la solicitud y la invención y en cualquier patente de los Estados Unidos que se obtenga para el mismo;

Ahora, por lo tanto, para la consideración valiosa, recibo que se acusa por medio del presente,

Nosotros, los cedentes mencionados anteriormente, por medio del presente vendemos, cedemos, y transferimos al cesionario mencionado anteriormente, sus sucesores y cesionarios, todos los derechos, títulos e intereses en la solicitud y la invención revelados en el mismo para los Estados Unidos de América y todos los países extranjeros del mismo, incluyendo los derechos de prioridad bajo la Convención Internacional de París (1883) según se modifique y Nosotros Solicitamos al Director - Oficina de Patentes y Marcas Registradas de los Estados Unidos expedir cualquier Patente de Invención otorgada sobre la invención establecida en la solicitud para el cesionario, sus sucesores y cesionarios; y por medio del presente acordamos que el Cesionario podrá solicitar la Patente Internacional de Invención sobre la invención, y firmaremos sin consideración adicional todos los documentos necesarios por el cesionario en relación con las solicitudes de Patentes de los Estados Unidos e Internacionales cuando sea requerido hacerlos por el cesionario.

Por medio del presente autorizamos y solicitamos a nuestros abogados SUGHRUE MION, PLLC de 21100 Pennsylvania Avenue, N.W., Washington, DC 20037-3213, a insertar aquí en paréntesis el (Número de Solicitud y Número de Confirmación _____, registrado en _____, fecha de registro y el número de solicitud de esta aplicación cuando se sepa.

Sergio Cloutier Latamora Mendonza
Traductor e Interprete Oficial
Resol. No. 2839 Minjusticia 1991

Fecha: Noviembre 7, 2002

Firmado: (Mary G. Hoffee)

Fecha: Noviembre 7, 2002

Firmado: (Daniel Tavares)

Echa: Noviembre 7, 2002

Firmado (Robert J. Lutz

(no se requiere legalización para el registro pero es presunción de hecho de la ejecución bajo el 35 U.S.C. §261).

INSCRITO: 11/07/2002

: PATENTE

CINTA: 013474 MARCO: 0991

ADJUNTO AL DOCUMENTO SE ENCUENTRA LO SIGUIENTE:

LOS ESTADOS UNIDOS DE AMERICA
PARA TODOS LOS QUE LEAN ESTA PALABRAS, SALUDOS:

EL DEPARTAMENTO DE COMERCIO DE LOS ESTADOS UNIDOS
Oficina de Patentes y Marcas Registradas de los Estados Unidos

Marzo 29, 2005

POR MEDIO DEL PRESENTE SE CERTIFICA QUE EL DOCUMENTO ADJUNTO
ES UNA COPIA AUTENTICA DE LOS REGISTROS DE ESTA OFICINA DE UN
DOCUMENTO INSCRITO EN NOVIEMBRE 07, 2002.

Por autoridad de
COMISIONADO DE PATENTES Y MARCAS REGISTRADAS

FIRMADO
I. EDELEN

Funcionario que certifica

SELLO DORADO EN ALTO RELIEVE DEL DEPARTAMENTO

ADJUNTO AL DOCUMENTO SE ENCUENTRA LO SIGUIENTE

APOSTILLE
(CONVENCION DE LA HAYE DE 5 OCTUBRE 1961)

1. PAIS: ESTADOS UNIDOS DE AMERICA

Sergio Clauterio Latona Mendoza
Traductor e Interprete Oficial
Resol. No. 2839 Minjusticia-1991

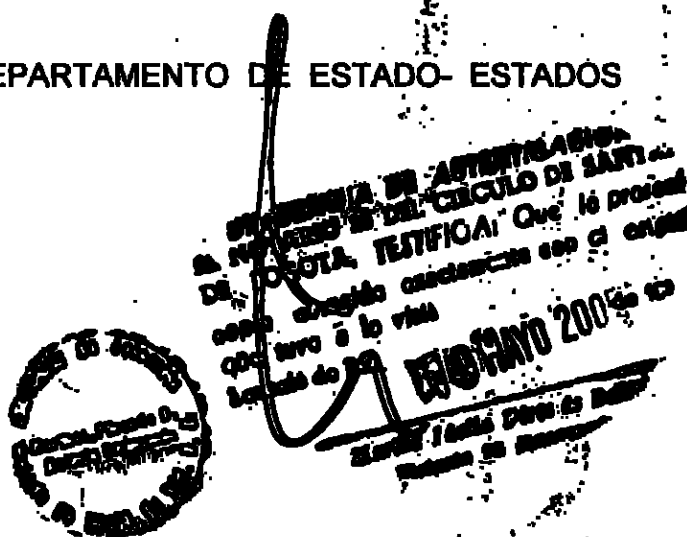
141

141

- ESTE DOCUMENTO PUBLICO
2. HA SIDO FIRMADO POR: L. EDELEN
3. ACTUANDO EN CAPACIDAD DE: FUNCIONARIO DE CERTIFICACIONES
4. LLEVA EL SELLO DE OFICINA DE PATENTES Y MARCAS REGISTRADA
- CERTIFICADO
5. EN: WASHINGTON D.C.
6. EL PRIMERO DE ABRIL, 2005
7. POR: ASISTENTE FUNCIONARIO DE AUTENTICACIONES,
DEPARTAMENTO DE ESTADO DE LOS ESTADOS UNIDOS.
8. No. 05015291-1
9. SELLO/ESTAMPILLA
10. FIRMA

FIRMADO POR:
SONYA N. JOHNSON

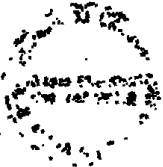
SELLO EN ALTO RELIEVE DEL DEPARTAMENTO DE ESTADO- ESTADOS
UNIDOS DE AMERICA.



Sergio Eleuterio Latorre Mondora
Traductor e Interpret Oficial
Resol. No. 2839 Minjusticia 1991

NOTSE ASUME
RECONSTRUCCION DEL TEXTO
2005 FEB 14 A 20 59
JCS
JEFE DE LEGALIZACIONES
BOGOTA D.C.

RECEIVED
BOGOTA D.C.
2005 FEB 14 A 20 59
JCS
JEFE DE LEGALIZACIONES
BOGOTA D.C.



1428
A45

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property
Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
27 May 2004 (27.05.2004)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2004/043344 A3

(51) International Patent Classification⁷: A61K 39/395,
39/40, 39/42, 39/44, C12N 15/00, 5/06, 5/16, C07H 21/04

(21) International Application Number:
PCT/US2003/032737

(22) International Filing Date:
5 November 2003 (05.11.2003)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/424,332 7 November 2002 (07.11.2002) US

(71) Applicant (for all designated States except US): IM-
MUNOGEN, INC. [US/US]; 128 Sidney Street, Cam-
bridge, MA 02139-4239 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): HOFFEE, Mary, G.
[US/US]; 59 Leland Road, Brookline, MA 02467 (US).
TAVARES, Daniel [US/US]; 27 Sylvester Road, Natick,
MA 01760 (US). LUTZ, Robert, J. [US/US]; 218 Old
Connecticut Path, Wayland, MA 01778 (US).

(74) Agents: HISSONG, Drew et al.; Sughrue Mion, PLLC,
2100 Pennsylvania Ave., N.W., Suite 800, Washington, DC
20037-3213 (US).

(81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU,
AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU,
CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE,
GH, GM, GR, GU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR,
KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK,
MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT,
RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR,
TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (regional): ARIPO patent (BW, GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),
Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
European patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE,
ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE,
SI, SK, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA,
GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

- with International search report
- before the expiration of the time limit for amending the
claims and to be republished in the event of receipt of
amendments
- with (an) indication(s) in relation to deposited biological
material furnished under Rule 13bis separately from the
description

(88) Date of publication of the International search report:
9 December 2004

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guid-
ance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the begin-
ning of each regular issue of the PCT Gazette.

(54) Title: ANTI-CD33 ANTIBODIES AND METHOD FOR TREATMENT OF ACUTE MYELOID LEUKEMIA USING THE
SAME

(57) Abstract: The present invention relates to antibodies that bind CD33. More particularly, the invention relates to anti-CD33 an-
tibodies, fragments and homologues of said antibodies, humanized and resurfaced versions of said antibodies, functional equivalents
and improved versions of said antibodies, immunoconjugates and compositions comprising said antibodies, and the uses of same
in diagnostic, research and therapeutic applications. The invention also relates to a polynucleotide encoding the antibodies, vectors
comprising the polynucleotides, host cells transformed with polynucleotides and methods of producing the antibodies.

WO 2004/043344 A3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US03/32737

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC(O) : A61K 39/395, 39/40, 39/42, 39/44; C12N 15/00, 5/06, 5/16; C07H 21/04

US CL : 424/133.1, 143.1, 155.1, 181.1; 435/69.1, 328, 330; 530/387.3, 388.22, 388.8, 391.7; 536/23.53

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

U.S. : 424/133.1, 143.1, 155.1, 181.1; 435/69.1, 328, 330; 530/387.3, 388.22, 388.8, 391.7; 536/23.53

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
Please See Continuation Sheet

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 94/10332 A1 (TEMPEST et al) 11 May 1994 (11.05.1994), see page 23, sequence 28, which shows 93% amino acid identity with instantly claimed sequence 8.	6

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" documents defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent published on or after the international filing date

"L" documents which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" documents referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" documents of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"A" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

23 September 2004 (23.09.2004)

Date of mailing of the international search report

12 OCT 2004

Name and mailing address of the ISA/US

Mail Stop PCT, Attn: ISA/US
Commissioner for Patents
P.O. Box 1450
Alexandria, Virginia 22313-1450

Facsimile No. (703) 305-3230

Authorized officer

David J. Blanchard

Telephone No. (571) 272-0827

144
144

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US03/32737

Continuation of B. FIELDS SEARCHED Item 3:

WEST, Medline, EMBASE, CAPLUS, Cancerlit, Biotechno Biosis, Lifesci, Geneseq, Swisaprot, PIR 78, SPTRMBL, issued and published patents.

Search terms: SEQ ID NOS:1-10, CD33, antibody, immunocjugate, acute myeloid leukemia, chronic myeloid leukemia, inventor search.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US03/32737

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)

This international report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claim Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claim Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☒ Claim Nos.: 36 and 46
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

☐
☐

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

No protest accompanied the payment of additional search fees.

448
145

(19) World Intellectual Property
Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
27 May 2004 (27.05.2004)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2004/043344 A2

- (51) International Patent Classification⁷: A61K
- (21) International Application Number: PCT/US2003/032737
- (22) International Filing Date: 5 November 2003 (05.11.2003)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 60/424,332 7 November 2002 (07.11.2002) US
- (71) Applicant (for all designated States except US): IMMUNOGEN, INC. [US/US]; 128 Sidney Street, Cambridge, MA 02139-4239 (US).
- (72) Inventors; and
- (75) Inventors/Applicants (for US only): HOFFEE, Mary, G. [US/US]; 59 Laland Road, Brookline, MA 02467 (US). TAVARES, Daniel [US/US]; 27 Sylvester Road, Natick, MA 01760 (US). LUTZ, Robert, J. [US/US]; 218 Old Connecticut Path, Wayland, MA 01778 (US).

- (74) Agents: HISSONG, Drew et al.; Saghrue Mion, PLLC, 2100 Pennsylvania Ave., N.W., Suite 800, Washington, DC 20037-3213 (US).
- (81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published: — without international search report and to be republished upon receipt of that report

(Continued on next page)

(54) Title: ANTI-CD33 ANTIBODIES AND METHOD FOR TREATMENT OF ACUTE MYELOID LEUKEMIA USING THE SAME

Mouse Mv2-4 CDRs

Link Chain	SEQ ID NO:
CDR1: K S S Q S V F F S S S Q K N Y L A	4
CDR2: W A S T R E S	5
CDR3: H Q Y L S S R T	6
Heavy Chain	
CDR1: S Y Y I H	1
CDR2: V I Y P G N D D I S Y N Q K F K G	57
CDR3: E V R L R Y F D V	3
AbM Heavy Chain	
CDR1: G Y T F T S Y Y I H	58
CDR2: V I Y P G N D D I S	59
CDR3: E V R L R Y F D V	3

(57) Abstract: The present invention relates to antibodies that bind CD33. More particularly, the invention relates to anti-CD33 antibodies, fragments and homologues of said antibodies, humanized and resurfaced versions of said antibodies, functional equivalents and improved versions of said antibodies, immunoconjugates and compositions comprising said antibodies, and the uses of same in diagnostic, research and therapeutic applications. The invention also relates to a polynucleotide encoding the antibodies, vectors comprising the polynucleotides, host cells transformed with polynucleotides and methods of producing the antibodies.

WO 2004/043344 A2

147 150
7

WO 2004/043344 A2



— with (an) indication(s) in relation to deposited biological material furnished under Rule 13bis separately from the description

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

PCT REQUEST

Original (for SUBMISSION) - printed on 05.11.2003 02:10:47 PM

0	For receiving Office use only	
0-1	International Application No.	
0-2	International Filing Date	
0-3	Name of receiving Office and "PCT International Application"	
0-4	Form - PCT/RO/101 PCT Request	
0-4-1	Prepared using	PCT-EASY Version 2.92 (updated 01.07.2003)
0-5	Petition The undersigned requests that the present international application be processed according to the Patent Cooperation Treaty	
0-6	Receiving Office (specified by the applicant)	United States Patent and Trademark Office (USPTO) (RO/US)
0-7	Applicant's or agent's file reference	F174222
I	Title of invention	ANTI-CD33 ANTIBODIES AND METHOD FOR TREATMENT OF ACUTE MYELOID LEUKEMIA USING THE SAME
II	Applicant	
II-1	This person is:	applicant only
II-2	Applicant for	all designated States except US
II-4	Name	IMMUNOGEN, INC.
II-5	Address:	128 Sidney Street Cambridge, MA 02139-4239 United States of America
II-6	State of nationality	US
II-7	State of residence	US
II-8	Telephone No.	202-293-7060
II-9	Facsimile No.	202-293-7860
III-1	Applicant and/or inventor	
III-1-1	This person is:	applicant and inventor
III-1-2	Applicant for	US only
III-1-4	Name (LAST, First)	HOFFE, Mary, G.
III-1-5	Address:	59 Leland Road Brookline, MA 02467 United States of America
III-1-6	State of nationality	US
III-1-7	State of residence	US

PCT REQUEST

Original (for SUBMISSION) - printed on 05.11.2003 02:10:47 PM

III-2	Applicant and/or inventor	
III-2-1	This person is:	applicant and inventor
III-2-2	Applicant for	US only
III-2-4	Name (LAST, First)	TAVARES, Daniel
III-2-5	Address:	27 Sylvester Road Natick, MA 01760 United States of America
III-2-6	State of nationality	US
III-2-7	State of residence	US
III-3	Applicant and/or inventor	
III-3-1	This person is:	applicant and inventor
III-3-2	Applicant for	US only
III-3-4	Name (LAST, First)	LUTZ, Robert, J.
III-3-5	Address:	218 Old Connecticut Path Wayland, MA 01778 United States of America
III-3-6	State of nationality	US
III-3-7	State of residence	US
IV-1	Agent or common representative; or address for correspondence The person identified below is hereby/has been appointed to act on behalf of the applicant(s) before the competent International Authorities as:	agent
IV-1-1	Name (LAST, First)	HISSONG, Drew
IV-1-2	Address:	SUGHRUE MION, PLLC 2100 Pennsylvania Ave., N.W. Suite 800 Washington, DC 20037-3213 United States of America
IV-1-3	Telephone No.	202-293-7060
IV-1-4	Facsimile No.	202-293-7860
IV-2	Additional agent(s)	additional agent(s) with same address as first named agent
IV-2-1	Name(s)	KASPER, Alan, J.; MACK, Susan, J.

PCT REQUEST

Original (for SUBMISSION) - printed on 05.11.2003 02:10:47 PM

V	Designation of States	
V-1	Regional Patent (other kinds of protection or treatment, if any, are specified between parentheses after the designation(s) concerned)	AP: GH GM KE LS MW MZ SD SL SZ TZ UG ZM ZW and any other State which is a Contracting State of the Harare Protocol and of the PCT EA: AM AZ BY KG KZ MD RU TJ TM and any other State which is a Contracting State of the Eurasian Patent Convention and of the PCT EP: AT BE BG CH&LI CY CZ DE DK EE ES FI FR GB GR HU IE IT LU MC NL PT RO SE SI SK TR and any other State which is a Contracting State of the European Patent Convention and of the PCT OA: BF BJ CF CG CI CM GA GN GQ GW ML MR NE SN TD TG and any other State which is a member State of OAPI and a Contracting State of the PCT
V-2	National Patent (other kinds of protection or treatment, if any, are specified between parentheses after the designation(s) concerned)	AE AG AL AM AT AU AZ BA BB BG BR BY BZ CA CH&LI CN CO CR CU CZ DE DK DM DZ EC EE EG ES FI GB GD GE GH GM HR HU ID IL IN IS JP KE KG KP KR KZ LC LK LR LS LT LU LV MA MD MG MK MN MW MX MZ NI NO NZ OM PG PH PL PT RO RU SC SD SE SG SK SL SY TJ TM TN TR TT TZ UA UG US UZ VC VN YU ZA ZM ZW
V-3	Precautionary Designation Statement In addition to the designations made under items V-1, V-2 and V-3, the applicant also makes under Rule 4.8(b) all designations which would be permitted under the PCT except any designation(s) of the State(s) indicated under item V-6 below. The applicant declares that those additional designations are subject to confirmation and that any designation which is not confirmed before the expiration of 15 months from the priority date is to be regarded as withdrawn by the applicant at the expiration of that time limit.	
V-6	Exclusion(s) from precautionary designations	NONE
VI-1	Priority claim of earlier national application	
VI-1-1	Filing date	07 November 2002 (07.11.2002)
VI-1-2	Number	60/424,332
VI-1-3	Country	US

PCT REQUEST

Original (for SUBMISSION) - printed on 05.11.2003 02:10:47 PM

VI-2	Priority document request The receiving Office is requested to prepare and transmit to the International Bureau a certified copy of the earlier application(s) identified above as item(s):	VI-1	
VII-1	International Searching Authority Chosen	United States Patent and Trademark Office (USPTO) (ISA/US)	
VIII	Declarations	Number of declarations	
VIII-1	Declaration as to the identity of the inventor	-	
VIII-2	Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to apply for and be granted a patent	-	
VIII-3	Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to claim the priority of the earlier application	-	
VIII-4	Declaration of inventorship (only for the purposes of the designation of the United States of America)	-	
VIII-5	Declaration as to non-prejudicial disclosures or exceptions to lack of novelty	-	
IX	Check list	number of sheets	electronic file(s) attached
IX-1	Request (including declaration sheets)	5	-
IX-2	Description	50	-
IX-3	Claims	12	-
IX-4	Abstract	1	EZABST00.TXT
IX-5	Drawings	25	-
IX-7	TOTAL	93	
	Accompanying items	paper document(s) attached	electronic file(s) attached
IX-8	Fee calculation sheet	✓	-
IX-16	Sequence listing in computer readable form:		
IX-16 (f)	additional copies including, where applicable, the copy for the purposes of international search under Rule 13ter	-	1 Diskette
IX-17	PCT-EASY diskette	-	Diskette
IX-18	Other (specified):	Transmittal Sheet	-
IX-18	Other (specified):	Sequence Listing in Paper Form	-
IX-19	Figure of the drawings which should accompany the abstract	9	
IX-20	Language of filing of the international application	English	
X-1	Signature of applicant, agent or common representative		
X-1-1	Name (LAST, First)	HISSONG, Drew	

152-555
F174222

PCT REQUEST

Original (for SUBMISSION) - printed on 05.11.2003 02:10:47 PM

FOR RECEIVING OFFICE USE ONLY

10-1	Date of actual receipt of the purported international application	
10-2	Drawings:	
10-2-1	Received	
10-2-2	Not received	
10-3	Corrected date of actual receipt due to later but timely received papers or drawings completing the purported international application	
10-4	Date of timely receipt of the required corrections under PCT Article 11(2)	
10-5	International Searching Authority	ISA/US
10-6	Transmittal of search copy delayed until search fee is paid	

FOR INTERNATIONAL BUREAU USE ONLY

11-1	Date of receipt of the record copy by the International Bureau	
------	--	--

PATENT COOPERATION TREATY

153 *12*
153

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION CONCERNING
SUBMISSION OR TRANSMITTAL
OF PRIORITY DOCUMENT

(PCT Administrative Instructions, Section 411)

To:

HISSONG, Drew
Sughrue Mion, PLLC
2100 Pennsylvania Ave., N.W.
Suite 800
Washington, DC 20037-3213
United States of America

Date of mailing (day/month/year) 20 January 2004 (20.01.2004)	IMPORTANT NOTIFICATION
Applicant's or agent's file reference F174222	
International application No. PCT/US2003/032737	
International publication date (day/month/year) Not yet published	
International filing date (day/month/year) 05 November 2003 (05.11.2003)	Priority date (day/month/year) 07 November 2002 (07.11.2002)
Applicant IMMUNOGEN, INC. et al	

1. By means of this Form, which replaces any previously issued notification concerning submission or transmittal of priority documents, the applicant is hereby notified of the date of receipt by the International Bureau of the priority document(s) relating to all earlier application(s) whose priority is claimed. Unless otherwise indicated by the letters "NR", in the right-hand column or by an asterisk appearing next to a date of receipt, the priority document concerned was submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b).
2. (If applicable) The letters "NR" appearing in the right-hand column denote a priority document which, on the date of mailing of this Form, had not yet been received by the International Bureau under Rule 17.1(a) or (b). Where, under Rule 17.1(a), the priority document must be submitted by the applicant to the receiving Office or the International Bureau, but the applicant fails to submit the priority document within the applicable time limit under that Rule, the attention of the applicant is directed to Rule 17.1(a) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.
3. (If applicable) An asterisk(*) appearing next to a date of receipt, in the right-hand column, denotes a priority document submitted or transmitted to the International Bureau but not in compliance with Rule 17.1(a) or (b) (the priority document was received after the time limit prescribed in Rule 17.1(a) or the request to prepare and transmit the priority document was submitted to the receiving Office after the applicable time limit under Rule 17.1(b)). Even though the priority document was not furnished in compliance with Rule 17.1(a) or (b), the International Bureau will nevertheless transmit a copy of the document to the designated Offices, for their consideration. In case such a copy is not accepted by the designated Office as priority document, Rule 17.1(c) provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

Priority date	Priority application No.	Country or regional Office or PCT receiving Office	Date of receipt of priority document
07 Nove 2002 (07.11.2002)	60/424,332	US	09 Janu 2004 (09.01.2004)

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No. (41-22) 338.89.85	Authorized officer Juan CRUZ Telephone No. (41-22) 338 8239
--	---

PATENT COOPERATION TREATY

13-157
154

From the
INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINING AUTHORITY

To:
DREW HISSONG
SUGHRUE MION, PLLC
2100 PENNSYLVANIA AVE., N.W.
SUITE 800
WASHINGTON, DC 20037-3213

PCT

WRITTEN OPINION

(PCT Rule 66)

Applicant's or agent's file reference F174222		Date of Mailing (day/month/year) 07 DEC 2004 REPLY DUE within 1 months/days from the above date of mailing
International application No. PCT/US03/32737	International filing date (day/month/year) 05 November 2003 (05.11.2003)	Priority date (day/month/year) 07 November 2002 (07.11.2002)
International Patent Classification (IPC) or both national classification and IPC IPC(7): A61K 39/395, 39/40, 39/42, 39/44; C12N 15/00, 5/06, 5/16; C07H 21/04 and US Cl.: 424/133.1, 143.1, 155.1, 181.1; 435/69.1, 328, 330; 530/387.3, 388.22, 388.8, 391.7; 536/23.53		
Applicant IMMUNOGEN, INC.		

1. This written opinion is the first (first, etc.) drawn by this International Preliminary Examining Authority.

2. This opinion contains indications relating to the following items:

- I ☒ Basis of the opinion
- II ☐ Priority
- III ☒ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV ☐ Lack of unity of invention
- V ☒ Reasoned statement under Rule 66.2 (a)(ii) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- VI ☐ Certain documents cited
- VII ☐ Certain defects in the international application
- VIII ☐ Certain observations on the international application

3. The applicant is hereby invited to reply to this opinion.

When? See the time limit indicated above. ~~The applicant may, before the expiration of that time limit, request this Authority to grant an extension. See rule 66.2(d).~~

How? By submitting a written reply, accompanied, where appropriate, by amendments, according to Rule 66.3. For the form and the language of the amendments, see Rules 66.8 and 66.9.

Also For an additional opportunity to submit amendments, see Rule 66.4.
For the examiner's obligation to consider amendments and/or arguments, see Rule 66.4 *bis*.
For an informal communication with the examiner, see Rule 66.6

If no reply is filed, the international preliminary examination report will be established on the basis of this opinion.

4. The final date by which the international preliminary examination report must be established according to Rule 69.2 is: **07 March 2005 (07.03.2005)**.

Name and mailing address of the IPEA/US Mail Stop PCT, Attn: IPEA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (703)305-3230	Authorized officer David J. Blanchard Telephone No. (571) 272-0827
--	--

WRITTEN OPINION

Internat. application No.

PCT/US03/32737

155 174 158

I. Basis of the opinion

1. With regard to the elements of the international application:*

- ☒ the international application as originally filed
- ☒ the description:
 pages 1-50, as originally filed
 pages NONE, filed with the demand
 pages NONE, filed with the letter of _____
- ☒ the claims:
 pages 51-62, as originally filed
 pages NONE, as amended (together with any statement) under Article 19
 pages NONE, filed with the demand
 pages NONE, filed with the letter of _____
- ☒ the drawings:
 pages 1-25, as originally filed
 pages NONE, filed with the demand
 pages NONE, filed with the letter of _____
- ☒ the sequence listing part of the description:
 pages 1-34, as originally filed
 pages NONE, filed with the demand
 pages NONE, filed with the letter of _____

2. With regard to the language, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language _____ which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rules 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the written opinion was drawn on the basis of the sequence listing:

- ☒ contained in the international application in printed form.
- ☒ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☐ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages NONE
- ☐ the claims, Nos. NONE
- ☐ the drawings, sheets/fig NONE

5. ☐ This opinion has been drawn as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).

* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this opinion as "originally filed."

156 + 154

WRITTEN OPINION

International application No.

PCT/US03/32737

III. Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

1. The question whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step (to be non-obvious), or to be industrially applicable have not been examined in respect of:

☐ the entire international application,

☒ claims Nos. 36 and 46

because:

☐ the said international application, or the said claim Nos. _____ relate to the following subject matter which does not require international preliminary examination (*specify*):

☒ the description, claims or drawings (*indicate particular elements below*) or said claims Nos. 36 and 46 are so unclear that no meaningful opinion could be formed (*specify*):

Claims 36 and 46 are not drafted in the alternative and therefore, are not in accordance with PCT Rule 6.4(a).

☐ the claims, or said claims Nos. _____ are so inadequately supported by the description that no meaningful opinion could be formed.

☒ no international search report has been established for said claims Nos. 36 and 46.

2. A written opinion cannot be drawn due to the failure of the nucleotide and/or amino acid sequence listing to comply with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions:

☐ the written form has not been furnished or does not comply with the standard.

☐ the computer readable form has not been furnished or does not comply with the standard.

157 ~~16~~
~~168~~

WRITTEN OPINION

International application No.
PCT/US03/32737

V. Reasoned statement under Rule 66.2(a)(ii) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. STATEMENT

Novelty (N)	Claims <u>1-5, 7-35, 37-45 and 47-71</u>	YES
	Claims <u>6</u>	NO
Inventive Step (IS)	Claims <u>1-5, 7-35, 37-45, 47-71</u>	YES
	Claims <u>6</u>	NO
Industrial Applicability (IA)	Claims <u>1-35, 37-45, 47-71</u>	YES
	Claims <u>NONE</u>	NO

2. CITATIONS AND EXPLANATIONS

Claim 6 lacks novelty under PCT Article 33(2) as being anticipated by Tempest et al.

Claim 6 is drawn to an antibody or epitope-binding fragment thereof wherein the light chain has at least 90% amino acid identity to SEQ ID NO:8.

Tempest et al teach an antibody comprising a light chain having 93% identity with SEQ ID NO:8 (see SEQ ID NO:28 at page 23 and figure 2).

Claims 1-5, 7-35, 37-45 and 47-71 meet the criteria set out in PCT Article 33(2)-(3), because the prior art does not teach or fairly suggest isolated antibodies comprising the recited CDR sequences or variable chains that has the ability to bind CD33 or a method of inhibiting the growth of a cell expressing CD33 with said antibodies or immunoconjugates thereof or a method for treating a subject having a disease wherein CD33 is expressed comprising administering said antibodies and immunoconjugates thereof or a method of isolating CD33 using said antibodies or nucleic acids encoding said antibodies.

Claims 1-5, 7-35, 37-45 and 47-71 meet the criteria set out in PCT Article 33(4), and thus have industrial applicability because the subject matter claimed can be made or used in industry.

158 ~~158~~

WRITTEN OPINION

International application No.
PCT/US03/32737

Supplemental Box
(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

TIME LIMIT:

The time limit set for response to a Written Opinion may not be extended. 37 CFR 1.484(d). Any response received after the expiration of the time limit set in the Written Opinion will not be considered in preparing the International Preliminary Examination Report.

PATENT COOPERATION TREATY

159 285 162

From the
INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINING AUTHORITY

To:
DREW HISSONG
SUGHRUE MION, PLLC
2100 PENNSYLVANIA AVE., NW, SUITE 800
WASHINGTON, DC 20037-3213

PCT NOTIFICATION OF TRANSMITTAL OF INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Rule 71.1)

Date of Mailing
(day/month/year)

14 MAR 2005

Applicant's or agent's file reference

F174222

IMPORTANT NOTIFICATION

International application No.

PCT/US03/32737

International filing date (day/month/year)

05 November 2003 (05.11.2003)

Priority date (day/month/year)

07 November 2002 (07.11.2002)

Applicant

IMMUNOGEN, INC.

1. The applicant is hereby notified that this International Preliminary Examining Authority transmits herewith the international preliminary examination report and its annexes, if any, established on the international application.
2. A copy of the report and its annexes, if any, is being transmitted to the International Bureau for communication to all the elected Offices.
3. Where required by any of the elected Offices, the International Bureau will prepare an English translation of the report (but not of any annexes) and will transmit such translation to those Offices.
4. REMINDER

The applicant must enter the national phase before each elected Office by performing certain acts (filing translations and paying national fees) within 30 months from the priority date (or later in some Offices)(Article 39(1))(see also the reminder sent by the International Bureau with Form PCT/IB/301).

Where a translation of the international application must be furnished to an elected Office, that translation must contain a translation of any annexes to the international preliminary examination report. It is the applicant's responsibility to prepare and furnish such translation directly to each elected Office concerned.

For further details on the applicable time limits and requirements of the elected Offices, see Volume II of the PCT Applicant's Guide.

Name and mailing address of the IPEA/US

Mail Stop PCT, Attn: IPEA/ US
Commissioner for Patents
P.O. Box 1430
Alexandria, Virginia 22313-1430

Facsimile No. (703) 305-3230

Form PCT/IPEA/416 (July 1992)

Authorized official

David J. Blanchard

Telephone No. (571) 272-0827

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference F174222	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IP/EA/416)	
International application No. PCT/US03/32737	International filing date (day/month/year) 05 November 2003 (05.11.2003)	Priority date (day/month/year) 07 November 2002 (07.11.2002)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC IPC(7): A61K 39/395, 39/40, 39/42, 39/44; C12N 15/00, 5/06, 5/16; C07H 21/04 and US Cl.: 424/133.1, 143.1, 155.1, 181.1; 435/69.1, 328, 330; 530/387.3, 388.22, 388.8; 391.7; 536/23.53		
Applicant IMMUNOGEN, INC.		
1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36. 2. This REPORT consists of a total of <u>3</u> sheets, including this cover sheet. ☒ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT). These annexes consist of a total of <u>2</u> sheets.		
3. This report contains indications relating to the following items: I ☒ Basis of the report II ☐ Priority III ☐ Non-establishment of report with regard to novelty, inventive step and industrial applicability IV ☐ Lack of unity of invention V ☒ Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement VI ☐ Certain documents cited VII ☐ Certain defects in the international application VIII ☐ Certain observations on the international application		
Date of submission of the demand 06 May 2004 (06.05.2004)	Date of completion of this report 02 March 2005 (02.03.2005)	
Name and mailing address of the IPEA/US Mail Stop PCT, Attn: IPEA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (703) 305-3230	Authorized officer <i>David T. Burchard</i> David T. Burchard Telephone No. (571) 272-0827	

Form PCT/IP/EA/409 (cover sheet)(July 1998)

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/US03/32737

25
161

I. Basis of the report

1. With regard to the elements of the international application:*

- ☐ the international application as originally filed.
- ☒ the description:
pages 1-50 _____ as originally filed
pages NONE _____, filed with the demand
pages NONE _____, filed with the letter of _____.
- ☒ the claims:
pages 51-56 and 59-62 _____, as originally filed
pages NONE _____, as amended (together with any statement) under Article 19
pages NONE _____, filed with the demand
pages 57 and 58 _____, filed with the letter of 05 January 2005 (05.01.2005)
- ☒ the drawings:
pages 1-25 _____, as originally filed
pages NONE _____, filed with the demand
pages NONE _____, filed with the letter of _____.
- ☒ the sequence listing part of the description:
pages 1-34 _____, as originally filed
pages NONE _____, filed with the demand
pages NONE _____, filed with the letter of _____.

2. With regard to the language, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language _____ which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rules 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☒ contained in the international application in printed form.
- ☒ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☐ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages NONE
- ☐ the claims, Nos. NONE
- ☐ the drawings, sheets/fig. NONE

5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).**

* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rules 70.16 and 70.17).

** Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.
PCT/US03/32737

V. Reasoned statement under Rule 66.2(a)(II) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. STATEMENT

Novelty (N)	Claims <u>1-71</u>	YES
	Claims <u>NONE</u>	NO
Inventive Step (IS)	Claims <u>1-71</u>	YES
	Claims <u>NONE</u>	NO
Industrial Applicability (IA)	Claims <u>1-71</u>	YES
	Claims <u>NONE</u>	NO

2. CITATIONS AND EXPLANATIONS

Claims 1-71 meet the criteria set out in PCT Article 33(2)-(3), because the prior art does not teach or fairly suggest teach or fairly suggest isolated antibodies comprising the recited CDR sequences or variable chains that has the ability to bind CD33 or a method of inhibiting the growth of a cell expressing CD33 with said antibodies or immunoconjugates thereof or a method for treating a subject having a disease wherein CD33 is expressed comprising administering said antibodies and immunoconjugates thereof or a method of isolating CD33 using said antibodies or nucleic acids encoding said antibodies.

Claims 1-71 meet the criteria set out in PCT Article 33(4), and thus have industrial applicability because the subject matter claimed can be made or used in industry.

Attorney Docket No. F174222

32. The diagnostic reagent of claim 30, wherein said label is selected from the group consisting of a biotin label, an enzyme label, a radio-label, a fluorophore, a chromophore, an imaging agent and a metal ion.

33. A method for inhibiting the growth of a cell expressing CD33 comprising contacting said cell with the antibody or epitope-binding fragment thereof of claim 1 or 2.

34. A method for inhibiting the growth of a cell expressing CD33 comprising contacting said cell with the immunoconjugate of claim 17 or 18.

35. A method for inhibiting the growth of a cell expressing CD33 comprising contacting said cell with the composition of claim 21 or 22.

36. A method for inhibiting the growth of a cell expressing CD33 comprising contacting said cell with a pharmaceutical composition selected from one of claims 23, 24, 25, 26, 27 or 28.

37. A method for treating a subject having a disease wherein CD33 is expressed, comprising administering to said subject an effective amount of the antibody or epitope-binding fragment thereof of claim 1 or 2.

38. A method for treating a subject having a disease wherein CD33 is expressed, comprising administering to said subject an effective amount of the immunoconjugate of claim 17 or 18.

39. A method for treating a subject having a disease wherein CD33 is expressed, comprising administering to said subject an effective amount of the composition of claim 21 or 22.

40. A method for treating a subject having a disease wherein CD33 is expressed, comprising administering to said subject an effective amount of the pharmaceutical composition of claim 23 or 24.

1 PEA/US

28
164

Attorney Docket No. F174222

41. A method for treating a subject having a disease wherein CD33 is expressed, comprising administering to said subject an effective amount of the pharmaceutical composition of claim 25 or 26.

42. A method for treating a subject having a disease wherein CD33 is expressed, comprising administering to said subject an effective amount of the pharmaceutical composition of claim 27 or 28.

43. A method for treating a subject having a disease wherein CD33 is expressed, comprising contacting one or more cells of said subject *ex vivo* with an effective amount of the antibody or epitope-binding fragment thereof of claim 1 or 2.

44. A method for treating a subject having a disease wherein CD33 is expressed, comprising contacting one or more cells of said subject *ex vivo* with an effective amount of an immunoconjugate of claim 17 or 18.

45. A method for treating a subject having a disease wherein CD33 is expressed, comprising contacting one or more cells of said subject *ex vivo* with an effective amount of a composition of claim 21 or 22.

46. A method for treating a subject having a disease wherein CD33 is expressed, comprising contacting one or more cells of said subject *ex vivo* with an effective amount of a pharmaceutical composition selected from one of claims 23, 24, 25, 26, 27 or 28.

47. The method of treatment of claim 37, wherein said disease is a disease selected from the group consisting of myelodysplastic syndrome (MDS), acute myeloid leukemia (AML), chronic myeloid leukemia (CML) and pro-myelocytic leukemia (PML).

48. The method of treatment of claim 38, wherein said disease is a disease selected from the group consisting of myelodysplastic syndrome (MDS), acute myeloid leukemia (AML), chronic myeloid leukemia (CML) and pro-myelocytic leukemia (PML).

29
165-168

REFERENCES

Roy et al., 1991, Anti-MY9-Blocked-Ricin: An Immunotoxin for Selective Targeting of Acute Myeloid Leukemia Cells, *Blood* 77(11):2404-2412

Sabbath et al., 1985, Heterogeneity of Clonogenic Cells in Acute Myeloblastic Leukemia, *J. Clin. Invest.* 75:746-753

LaRussa et al., 1992, Effects of Anti-CD33 Blocked Ricin Immunotoxin on the Capacity of CD34⁺ Human Marrow Cells to Establish in vitro Hematopoiesis in Long-term Marrow Cultures, *Exp. Hematol.* 20:442-448.

Griffin et al., 1984, A Monoclonal Antibody Reactive with Normal and Leukemic Human Myeloid Progenitor Cells, *Leukemia Res.* 8:521-534.

Mason et al. eds., Leucocyte Typing VII White Cell Differentiation Antigens, pages 777-778, Oxford University Press, 2002.

166
~~169~~

REQUISITOS NECESARIOS PARA PRESENTACION Y AGILIZACION DEL TRAMITE

USUARIO RADICADOR

PATENTE DE INVENCION

MODELO DE UTILIDAD

- | | | |
|--|-----|-----|
| - Indicación de que se solicita la concesión de una patente | () | () |
| - Datos de identificación del solicitante o de la persona que se presenta la solicitud | () | () |
| - Descripción de la invención | () | () |
| - Dibujos de ser estos pertinentes | () | () |
| - Comprobante de Pago de las tasas establecidas | () | () |

COMPLETA ()

INCOMPLETA ()

DISEÑO INDUSTRIAL ()

- | | | |
|---|-----|-----|
| - Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial | () | () |
| - Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud | () | () |
| - Representación grafica o fotografica del Diseño Industrial o muestra del Material que incorpora el diseño | () | () |
| - Comprobante de pago de las tasas establecidas | () | () |

COMPLETA ()

INCOMPLETA ()

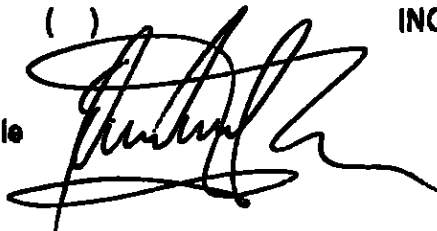
ESQUEMA DE TRAZADO ()

- | | | |
|---|-----|-----|
| - Indicación de que solicita el registro de un Esquema de trazado | () | () |
| - Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta La solicitud | () | () |
| - Representación gráfica del esquema de trazado | () | () |
| - Comprobante de pago de las tasas establecidas | () | () |

COMPLETA ()

INCOMPLETA ()

Firma Responsable



Fecha

SUPERINDUSTRIAS Y COMERCIO

Radicacion : 05048853 00000000

Folios: 168

Fecha (AMB) 2005-05-20 11:49:01

Tramite 011 PCT-PATENT 379 FASE INCI 411 PRESENTAC

Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES