



No. 08-127238- -00006-0000

Fecha: 2012-12-03 16:18:23 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 523 RESPUESTA Folios: 380

AS. 122.975

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES
CONVERSIÓN, DIVISIÓN Y FUSIÓN DE SOLICITUDES

1. Identificación del Trámite

☐ Conversión

☒ División

☐ Fusión

☒ Patente de Invención

☐ Patente de Modelo de Utilidad

☐ Registro de Diseño Industrial

☐ Esquema de Trazado de Circuitos Integrados

2. Datos del solicitante

Persona Natural ☐

Persona Jurídica ☒

GENENTECH, INC.

Nombre o denominación / Nombre o razón social

Nombre representante legal

Tipo de empresa

Micro ☐

Pequeña ☐

Mediana ☐

Otra ☒

Documento de identificación:

☐ C.C.

☐ C.E.

☐ NIT

☐ Otro

Número

Nacionalidad/País de constitución	Dirección y domicilio del titular	Ciudad
Estados Unidos de América	1 DNA Way, CA 94080	South San Francisco
Dirección electrónica	No. Fax	Número telefónico

☒ Autorizo expresamente a la Superintendencia de Industria y Comercio para que todas las comunicaciones sean enviadas a través de la dirección de correo electrónico

3. Datos del apoderado:

CADENA SARMIENTO JUAN PABLO

Apellidos y Nombre

80.410.337

Documento de identificación

57492

Tarjeta profesional

Dirección y domicilio	Ciudad
Calle 70 A #4-41	Bogotá, D.C.
Dirección electrónica	No. Fax
	742-2200
	Número telefónico
	744-2200

En caso de haber presentado poder general para asuntos que se adelanten ante la Delegatura de Propiedad Industrial, sírvase indicar el número de su radicación o protocolo de poder general

32

4. Datos del trámite

CONVERSIÓN

Expediente:
De:
A:

DIVISIÓN

Expediente: 08 127.238
De:
A:

FUSIÓN

Expediente:
De:
A:

5. Anexos

Comprobante de pago No. 12-119707; 12-133262

Fecha: 03.12.2012

6. Anexos

- ☒ Comprobante de pago de la tasa para la presentación de la corrección y/o modificación.
- ☒ Poder, si fuere el caso con el que se acredita la representación.
- ☐ Número de documento que ordena la comisión o fusión o división.
- ☐ Documento que contiene la conversión, división o fusión de la solicitud.
- ☒ Copia de la solicitud y sus anexos en formato magnético.

7. Firma

Nombre y apellidos

JUAN PABLO CADENA SARMIENTO
C.C 80.410.337

Firma

Tarjeta Profesional 57492

122975

3

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	RECIBO DE CAJA	No. 12 - 119707
		Bogotá D.C., Noviembre 19 de 2012 - 14:04:23

RECIBIDO DE : BRIGARD & CASTRO S.A. NI 860.047.372
*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	446248460	19/11/2012	68.178.000.00

*** Conceptos Pagados ***			
CANT. CONTABILISTICO	CONCEPTO	VR. CONTABILISTICO	VR. CONCEPTO
7 TRAMITES DE SOL. DE DISENOS INDUSTRIALES		590.000.00	590.000.00
			\$590.000.00

SOM: **QUINIENTOS NOVENTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: _____
Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 08-127238- -00006-0000

Fecha: 2012-12-03 16:18:23 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 523 RESPUESTA Folios: 380

4

122975

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO NIT : 800.176.089-2 -/-					
 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	RECIBO DE CAJA			No. 12 - 133262	
				Bogotá D.C., Noviembre 30 de 2012 - 13:55:24	
RECIBIDO DE : BRIGARD & CASTRO S.A.			NI 860.047.372		
*** Soporte del Pago ***					
TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	446288446	30/11/2012	7.470.000.00
*** Conceptos Pagados ***					
CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNDITARIO	Vr. CONCEPTO	
228	50005-01-01 SOLICITUDES	1607 REIVINDICACION UNITARIA ADICIONAL A LAS 10 INICIALES	30.000.00	6.840.000.00	
				\$6.840.000.00	
=====					
SON: **SEIS MILLONES OCHOCIENTOS CUARENTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***					
Responsable: 			SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO		
*****					
Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____			No. 08-127238- -00006-0000		
			Fecha: 2012-12-03 16:18:23 Dep. 2020 DIR NUEVASCR		
			Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI		
			Act. 523 RESPUESTA Folios: 380		
Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia					
Web: www.sic.gov.co e-mai: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240					
, Noviembre 30 de 2012 - 13:55:25					

5

ANTICUERPOS E INMUNOCONJUGADOS Y SUS USOS

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se relaciona con los anticuerpos anti-CD22 y sus inmunoconjugados. La invención se refiere además, a los métodos de utilización de los anticuerpos anti-CD22 y de sus inmunoconjugados.

ANTECEDENTES

Los linfocitos son una de las muchas clases de glóbulos blancos que se producen en la médula ósea durante la hematopoyesis. Existen dos poblaciones principales de linfocitos: los linfocitos B (células B) y T (células T). Los linfocitos que nos interesan de manera particular en este estudio son las células B.

Las células B maduran en la médula ósea y la abandonan expresando un anticuerpo de unión al antígeno en su superficie celular. Cuando una célula B virgen se encuentra con el antígeno para el que su anticuerpo unido a la membrana es específico, la célula comienza a dividirse rápidamente y las células resultantes se diferencian en células B de memoria y células efectoras denominadas "células plasmáticas". Las células B de memoria tienen mayor duración y continúan expresando el anticuerpo unido a la membrana con la misma especificidad que la célula parental original. Las células plasmáticas no producen un anticuerpo unido a la membrana, sino un anticuerpo en forma secretada. Los anticuerpos secretados son las principales moléculas efectoras de la inmunidad humoral.

Los trastornos relacionados con las células B incluyen, entre otros, linfomas cancerosos (linfoma no de Hodgkin, LNH), mielomas múltiples y leucemia linfocítica crónica (LLC, leucemia de células B (linfocitos B CD5+)). Los linfomas de no Hodgkin (LNH), un grupo heterogéneo de cánceres que generan principalmente los linfocitos B, representan aproximadamente un 4% de todos los cánceres diagnosticados recientemente (Jemal, A. y col., *CA-Cancer J Clin*, 52: 23-47, (2002)). El LNH agresivo comprende aproximadamente entre el 30 y 40% de los LNH en adultos (Harris, N.L. y col., *Hematol. J.* 1:53-66 (2001)) e incluye un linfoma de células B grandes difuso (LCBGD), un linfoma de células del manto (LCM), un linfoma T periférico y un linfoma anaplásico de células grandes. La quimioterapia de combinación de primera línea cura a menos de la mitad de los pacientes con LNH agresivo y la mayoría de éstos sucumben a la enfermedad (Fisher, R.I. *Semin. Oncol.* 27(suppl 12): 2-8 (2000)).

6

Los trastornos relacionados con las células B también incluyen enfermedades autoinmunes. Las enfermedades autoinmunes siguen siendo importantes desde un punto de vista clínico en humanos. Como su nombre indica, las enfermedades autoinmunes actúan sobre el propio sistema inmunológico del organismo. Si bien los mecanismos patológicos difieren entre los distintos tipos de enfermedades autoinmunes, un mecanismo general supone la unión de determinados anticuerpos (denominados en adelante anticuerpos autorreactivos o autoanticuerpos) a las proteínas endógenas del organismo. Médicos y científicos han identificado más de 70 enfermedades autoinmunes clínicamente diferentes, incluidas artritis reumatoide, esclerosis múltiple, vasculitis, diabetes mediada por la autoinmunidad y lupus eritematoso sistémico. Aunque muchas enfermedades autoinmunes son poco frecuentes (afectan a menos de 200.000 sujetos cada una), en conjunto, padecen estas enfermedades millones de estadounidenses, que representan a un 5% de la población, y la mayoría de estas enfermedades afectan a las mujeres mucho más que a los hombres. El carácter crónico de estas enfermedades ocasiona una carga económica y social inmensa.

Los agentes citotóxicos que actúan sobre los antígenos de la superficie de las células B constituyen un enfoque importante de los tratamientos para el cáncer relacionado con dichas células. Uno de estos antígenos de la superficie de las células B es el CD20. El rituximab (Rituxan; Genentech, Inc. (sur de San Francisco, CA) y IDEC Pharmaceutical Corp. (San Diego, CA)), un anticuerpo monoclonal quimérico anti-CD20 (ratón/humano), fue el primer anticuerpo terapéutico que aprobó la Administración de Alimentos y Fármacos estadounidense para el tratamiento de LNH folicular o de bajo grado recurrente o refractario (Leonard, J.P. y col., *Clin. Canc. Res.* 10:5327-5334 (2004)).

Otros antígenos de células B, como por ejemplo CD19, CD22 y CD52, son dianas de potencial terapéutico para tratar el linfoma (Grillo-Lopez A.J. y col., *Curr Pharm Biotechnol*, 2:301-11, (2001)). CD22 es una sialoglicoproteína restringida a células B 135-kDa que sólo se expresa en la superficie de las células B durante las etapas de maduración de diferenciación (Dorken, B. y col., *J. Immunol.* 136:4470-4479 (1986)). La forma predominante de CD22 en los humanos es CD22 beta que contiene siete dominios de la superfamilia de las inmunoglobulinas en el dominio extracelular (Figura 1) (Wilson, G.L. y col., *J. Exp. Med.* 173:137-146 (1991)). Una variante de esta forma, CD22 alfa, no contiene los dominios 3 y 4 de la superfamilia de las inmunoglobulinas (Stamenkovic, I. y Seed, B., *Nature*

345:74-77 (1990)). Se ha demostrado que la unión del ligando al CD22 humano se relaciona con los dominios 1 y 2 de la superfamilia de las inmunoglobulinas (también conocidos como epítomos 1 y 2) (Engel, P. y col., *J. Exp. Med.* 181:1581-1586, 1995).

En el LNH de células B, la expresión de CD22 oscila entre el 91 y 99% en poblaciones agresivas e indolentes, respectivamente (Cesano, A. y col., *Blood* 100:350a (2002)). El CD22 puede funcionar como un componente del complejo de activación de las células B (Sato, S. y col., *Semin. Immunol.* 10:287-296 (1998)) y como una molécula de adhesión (Engel, P. y col., *J. Immunol.* 150:4719-4732 (1993)). Las células B de los ratones con deficiencia de CD22 tienen una menor duración y una apoptosis mejorada que sugiere un papel clave de este antígeno en la supervivencia de la célula B (Otipoby, K.L. y col., *Nature (Lond)* 384:634-637 (1996)). Después de unirse a los ligandos naturales o anticuerpos, el CD22 se internaliza rápidamente y proporciona una señal coestimuladora fuerte en las células B primarias y señales proapoptóticas en las células B neoplásicas (Sato, S. y col., *Immunity* 5:551-562 (1996)).

Se han estudiado los anticuerpos anti-CD22 como posibles tratamientos para los cánceres de células B y otras enfermedades proliferativas de las células B. Estos anticuerpos anti-CD22 incluyen el RFB4 (Mansfield, E. y col., *Blood* 90:2020-2026 (1997)), el CMC-544 (DiJoseph, J.F., *Blood* 103:1807-1814 (2004)) y el LL2 (Pawlak-Byczkowska, E.J. y col., *Cancer Res.* 49:4568-4577 (1989)). El anticuerpo LL2 (anteriormente denominado HPB-2) es un anticuerpo monoclonal de ratón IgG2a que se dirige contra el antígeno CD22 (Pawlak-Byczkowska, E.J. y col. (1989), mencionado anteriormente). Las evaluaciones inmunohistológicas in vitro demostraron una reactividad del anticuerpo LL2 con 50 de los 51 especímenes del LNH de células B evaluados. Sin embargo, esto no ocurrió con otros tejidos no linfoides normales o malignos (Pawlak-Byczkowska (1989), mencionado anteriormente; Stein, R. y col., *Cancer Immunol. Immunother.* 37:293-298 (1993)).

El uso de anticuerpos conjugados con fármacos para la administración local de agentes citotóxicos o citostáticos, es decir, los fármacos que se utilizan para matar o inhibir células tumorales en el tratamiento del cáncer (Syrigos and Epenetos (1999) *Anticancer Research* 19:605-614; Niculescu-Duvaz y Springer (1997) *Adv. Drg Del. Rev.* 26: 151-172; patente de EE. UU. n.º 4975278), permite la administración de la fracción de fármacos a tumores y una acumulación

intracelular en éstos, donde la administración sistemática de estos agentes farmacológicos no conjugados puede resultar en niveles inaceptables de toxicidad tanto para las células normales como para las células tumorales que se intentan eliminar (Baldwin y col., (1986) *Lancet* págs. (Mar. 15, 1986):603-05; Thorpe, (1985) "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review," en *Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications*, A. Pinchera y col. (eds), págs. 475-506). Se busca entonces la máxima eficacia con la mínima toxicidad. Tanto los anticuerpos monoclonales como los policlonales se han descrito como útiles en estas estrategias (Rowland y col., (1986) *Cancer Immunol. Immunother.*, 21:183-87). Los fármacos empleados en estos métodos incluyen a la daunomicina, la doxorubicina, el metotrexato y la vindesina (Rowland y col., *Cancer Immunol. Immunother.* 21:183-87 (1986)). Entra las toxinas empleadas en anticuerpos conjugados con toxinas se encuentran las toxinas bacterianas como la toxina de la difteria, toxinas vegetales como la ricina, toxinas de pequeñas moléculas como la geldanamicina (Kerr y col., (1997) *Bioconjugate Chem.* 8(6):781-784; Mandler y col., (2000) *Journal of the Nat. Cancer Inst.* 92(19):1573-1581; Mandler y col., (2000) *Bioorganic & Med. Chem. Letters* 10:1025-1028; Mandler y col., (2002) *Bioconjugate Chem.* 13:786-791), maitansinoides (patente europea n.º EP 1391213; Liu y col., (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:8618-8623) y caliqueamicina (Lode y col. (1998) *Cancer Res.* 58:2928; Hinman y col., (1993) *Cancer Res.* 53:3336-3342). Las toxinas pueden producir sus efectos citotóxicos y citostáticos mediante mecanismos que incluyen la unión de tubulina, la unión de ADN o la inhibición de la topoisomerasa (Meyer, D.L. y Senter, P.D. "Recent Advances in Antibody Drug Conjugates for Cancer Therapy" en *Annual Reports in Medicinal Chemistry*, Vol 38 (2003) Capítulo 23, 229-237). Algunos fármacos citotóxicos tienden a ser inactivos o menos activos cuando se conjugan con grandes anticuerpos o ligandos receptores de proteínas.

ZEVALIN® (ibritumomab tiuxetan, Biogen/Idec) es un anticuerpo conjugado con un radioisótopo compuesto de un anticuerpo monoclonal kappa IgG1 murino dirigido contra el antígeno CD20 que se encuentra en la superficie de los linfocitos B cancerígenos y normales, y contra el radioisótopo ^{111}In o ^{90}Y unido por un quelante enlazador de tiourea (Wiseman y col., (2000) *Eur. Jour. Nucl. Med.* 27(7):766-77; Wiseman y col., (2002) *Blood* 99(12):4336-42; Witzig y col., (2002) *J. Clin. Oncol.* 20(10):2453-63; Witzig y col., (2002) *J. Clin. Oncol.* 20(15):3262-69). A pesar de que el ZEVALIN presenta actividad contra las células B del

9

linfoma no Hodgkin (LNH), su administración provoca citopenias graves y prolongadas en la mayoría de los pacientes. MYLOTARGTM (Gentuzumab ozogamicina, Wyeth Pharmaceuticals), un conjugado de anticuerpos y fármacos compuesto de un anticuerpo huCD33 enlazado a caliqueamicina, se aprobó en 2000 para el tratamiento de leucemia mieloide aguda por inyección (*Drugs of the Future* (2000) 25(7): 686; Patentes de EE.UU. N.º 4970198; 5079233; 5585089; 5606040; 5693762; 5739116; 5767285; 5773001). Cantuzumab mertansina (Immunogen, Inc.), un anticuerpo conjugado con un fármaco compuesto por el anticuerpo huC242 enlazado a la fracción de fármacos de los maitansinoides por medio de un enlazado de disulfuro SPP, DM1, está desarrollado para el tratamiento de cánceres que expresan el antígeno CanAg, tales como los de colon, páncreas, gástricos y otros. MLN-2704 (Millennium Pharm., BZL Biologics, Immunogen Inc.), un anticuerpo conjugado con un fármaco, compuesto por el anticuerpo monoclonal del antígeno de membrana antiprostático (PSMA) enlazado al grupo de los maitansinoides, DM1, está en fase de desarrollo para el tratamiento potencial de los tumores de próstata. La misma fracción de fármacos de los maitansinoides, DM1, se unió mediante un enlazador no disulfuro, SMCC, a un anticuerpo monoclonal murino, TA.1 (Chari y col., (1992) *Cancer Research* 52:127-131). Se informó que dicho conjugado es 200 veces menos potente que el correspondiente conjugado del enlazador de disulfuro. En la presente memoria descriptiva, el enlazado SMCC se consideró "no escindible".

Se aislaron varios compuestos peptídicos cortos del molusco marino, *Dolabella auricularia*, y se descubrió que tenían actividad biológica (Pettit y col., (1993) *Tetrahedron* 49:9151; Nakamura y col., (1995) *Tetrahedron Letters* 36:5059-5062; Sone y col., (1995) *Journal Org Chem* 60:4474). También se prepararon análogos de estos compuestos y se descubrió que algunos tenían actividad biológica (para su reseña, véase Pettit y col., (1998) *Anti-Cancer Drug Design* 13:243-277). Por ejemplo, la auristatina E (patente de EE.UU. N.º 5635483) es un análogo sintético del producto natural marino dolastatina 10, un agente que inhibe la polimerización de la tubulina al unirse al mismo punto en la tubulina que en la vincristina con acción antineoplásica (G. R. Pettit, (1997) *Prog. Chem. Org. Nat. Prod.* 70:1-79). La dolastatina 10, auristatina PE y auristatina E son péptidos lineales que tienen cuatro aminoácidos, tres de los cuales son únicos de la clase de compuestos de la dolastatina, y una amida C-terminal.

Los péptidos auristatina, la auristatina E (AE) y la monometilauristatina (MMAE), análogos sintéticos de la dolastatina, se conjugaron a: (i) anticuerpos monoclonales quiméricos cBR96 (específicos para Lewis Y en carcinomas); (ii) cAC10 que es específico para CD30 en tumores hematológicos (Klussman, y col., (2004), *Bioconjugate Chemistry* 15(4):765-773; Doronina y col., (2003) *Nature Biotechnology* 21(7):778-784; "Monomethylvaline Compounds Capable of Conjugation to Ligands"; Francisco y col., (2003) *Blood* 102(4):1458-1465; patente de EE.UU. N.º 2004/0018194; (iii) anticuerpos anti-CD20 tal como Rituxan® (rituximab) (documento WO 04/032828) para el tratamiento de células tumorales que expresan CD20 y trastornos inmunitarios; (iv) anticuerpos 2H9 anti-EphB2 y anti-IL-8 para el tratamiento del cáncer colorrectal (Mao, y col., (2004) *Cancer Research* 64(3):781-788); (v) anticuerpo E-selectina (Bhaskar y col., (2003) *Cancer Res.* 63:6387-6394) y (vi) otros anticuerpos anti-CD30 (documento WO 03/043583). La monometilauristatina (MMAE) también se conjugó con 2H9, un anticuerpo contra EphB2R que es un receptor de tirosina quinasa TM tipo 1 con una homología cercana entre el ratón y el humano, y se sobreexpresa en las células cancerígenas colorrectales (Mao y col., (2004) *Cancer Res.* 64:781-788).

Se informó que la monometilauristatina MMAF, una variante de la auristatina E (MMAE) con una fenilalanina en C-terminal (patente de EE.UU. N.º 5767237; patente de EE.UU. N.º 6124431), es menos potente que la MMAE, sin embargo, es más potente cuando se conjuga con anticuerpos monoclonales (Senter y col., *Proceedings for the American Association for Cancer Research*, Volumen 45, Abstract Number 623, presentado el 28 de marzo de 2004). El fenileno diamina auristatina F (AFP), una variante fenilalanina de MMAE que se unió al anti-CD70 mAb, 1F6, a través del C-terminal de 1F6 mediante un separador de fenileno diamina (Law y col., *Proceedings of the American Association for Cancer Research*, Volumen 45, Abstract Number 625, presentado el 28 de marzo de 2004).

Los anticuerpos anti-CD22 conjugados con toxinas también se estudiaron como compuestos terapéuticos potenciales. Por ejemplo, estudios anteriores describen las inmunotoxinas que contienen cadenas de ricina A dirigidas contra los anti-CD22 como posibles agentes antineoplásicos (May, R.D. y col., *Chemical Abstracts* 106(21):168656x páginas 35-36 (1987); Ghetie, M.A. y col., *Cancer Research* 48:2610-2617 (1988) y Amlot, P.L. y col., *Blood* 82(9):2624-2633 (1993)). Cuando la toxina es un radioisótopo, epratuzumab, la versión del IgG1

11

(transplantada de CDR) humanizado de LL2, mostró evidencia de actividad terapéutica para el radioinmunoconjugado (Juweid, M.E. y col., *Clin. Cancer Res.*, 5 (Supl 10):3292s-3303s (1999); Griffiths, G.L. y col., *J. Nucl. Med.* 44:77-84 (2003); Linden, O. y col., *Clin. Cancer Res.*, 5 (supl 10):3287s-3291s (1999)).

En la materia existe la necesidad de otros fármacos para tratar diversos cánceres relacionados con las células B, como por ejemplo los linfomas como el linfoma no Hodgkin y otros trastornos proliferativos de las células B. Los fármacos especialmente útiles para este fin incluyen los conjugados de anticuerpos anti-CD22 con fármacos que actúan sobre las células B y que tienen una toxicidad considerablemente baja pero con una eficacia terapéutica útil. Éstas y otras limitaciones y problemas del pasado se tratan en la presente invención.

El recitado de las referencias en la presente solicitud no representa una admisión de que la referencia es un conocimiento en la materia anterior a esta solicitud. Todas las referencias citadas en la presente memoria descriptiva, incluyendo las patentes, las solicitudes de patentes y publicaciones, quedan incorporadas únicamente a modo de referencia.

RESUMEN

La invención proporciona anticuerpos anti-CD22 y sus métodos de utilización.

En un aspecto, se proporciona un anticuerpo que se une a CD22, en el que el anticuerpo comprende al menos una, dos, tres, cuatro, cinco o seis HVR seleccionadas entre:

(1) una HVR-H1 que comprenda la secuencia de aminoácidos de identificador de secuencia n.º: 2;

(2) una HVR-H2 que comprenda la secuencia de aminoácidos de identificador de secuencia n.º: 4;

(3) una HVR-H3 que comprenda la secuencia de aminoácidos de identificador de secuencia n.º: 6;

(4) una HVR-L1 que comprenda la secuencia de aminoácidos de identificador de secuencia n.º: 10;

(5) una HVR-L2 que comprenda la secuencia de aminoácidos de identificador de secuencia n.º: 12; y

(6) una HVR-L3 que comprenda la secuencia de aminoácidos de identificador de secuencia n.º: 14.

En otro aspecto, un anticuerpo que se une a CD22 comprende (a) una HVR-L1 que contiene la secuencia de aminoácidos de identificador de secuencia n.º: 10, y (b) al menos una, dos, tres, cuatro o cinco HVR seleccionadas entre:

(1) una HVR-H1 que comprenda la secuencia de aminoácidos de identificador de secuencia n.º: 2;

(2) una HVR-H2 que comprenda la secuencia de aminoácidos de identificador de secuencia n.º: 4;

(3) una HVR-H3 que comprenda la secuencia de aminoácidos de identificador de secuencia n.º: 6;

(4) una HVR-L2 que comprenda la secuencia de aminoácidos de identificador de secuencia n.º: 12; y

(6) una HVR-L3 que comprenda la secuencia de aminoácidos de identificador de secuencia n.º: 14.

En otro aspecto, un anticuerpo que se une a CD22 comprende (a) una HVR-L1 que contiene la secuencia de aminoácidos de identificador de secuencia n.º: 9, y (b) al menos una, dos, tres, cuatro o cinco HVR seleccionadas entre:

(1) una HVR-H1 que comprenda la secuencia de aminoácidos de identificador de secuencia n.º: 2;

(2) una HVR-H2 que comprenda la secuencia de aminoácidos de identificador de secuencia n.º: 4;

(3) una HVR-H3 que comprenda la secuencia de aminoácidos de identificador de secuencia n.º: 6;

(4) una HVR-L2 que comprenda la secuencia de aminoácidos de identificador de secuencia n.º: 12; y

(6) una HVR-L3 que comprenda la secuencia de aminoácidos de identificador de secuencia n.º: 14.

En otro aspecto, un anticuerpo que se une a CD22 comprende (a) una HVR-H3 que contiene la secuencia de aminoácidos de identificador de secuencia n.º: 5, y (b) al menos una, dos, tres, cuatro o cinco HVR seleccionadas entre:

(1) una HVR-H1 que comprenda la secuencia de aminoácidos de identificador de secuencia n.º: 2;

(2) una HVR-H2 que comprenda la secuencia de aminoácidos de identificador de secuencia n.º: 4;

(3) una HVR-L1 que comprenda la secuencia de aminoácidos de identificador de secuencia n.º: 9;

13

(4) una HVR-L2 que comprenda la secuencia de aminoácidos de identificador de secuencia n.º: 12; y

(5) una HVR-L3 que comprenda la secuencia de aminoácidos de identificador de secuencia n.º: 14.

En otro aspecto, un anticuerpo que se une a CD22 comprende (a) una HVR-H3 que contiene la secuencia de aminoácidos de identificador de secuencia n.º: 5, y (b) al menos una, dos, tres, cuatro o cinco HVR seleccionadas entre:

(1) una HVR-H1 que comprenda la secuencia de aminoácidos de identificador de secuencia n.º: 2;

(2) una HVR-H2 que comprenda la secuencia de aminoácidos de identificador de secuencia n.º: 4;

(3) una HVR-L1 que comprenda la secuencia de aminoácidos de identificador de secuencia n.º: 10;

(4) una HVR-L2 que comprenda la secuencia de aminoácidos de identificador de secuencia n.º: 12; y

(5) una HVR-L3 que comprenda la secuencia de aminoácidos de identificador de secuencia n.º: 14.

En una forma de realización, el anticuerpo comprende una HVR-L1 que contiene la secuencia de aminoácidos de identificador de secuencia n.º 10. En una forma de realización, el anticuerpo también comprende una HVR-H1 que contiene la secuencia de aminoácidos de identificador de secuencia n.º 2 y una HVR-H2 que contiene la secuencia de aminoácidos de identificador de secuencia n.º 4. En una forma de realización, el anticuerpo también comprende una HVR-L2 que contiene la secuencia de aminoácidos de identificador de secuencia n.º 12 y una HVR-L3 que contiene la secuencia de aminoácidos de identificador de secuencia n.º 14.

En ciertas formas de realización, cualquiera de los anticuerpos anteriores comprende, además, al menos una estructura seleccionada entre una estructura de consenso del subgrupo III de VH y una estructura de consenso del sugrupo I de VL.

En un aspecto, se proporciona un anticuerpo que se une a CD22, en el que el anticuerpo comprende un dominio variable de la cadena pesada con al menos un 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 ó 99% de identificador de la secuencia con respecto a la secuencia de aminoácidos de identificador de secuencia n.º 16. En

una forma de realización, el anticuerpo comprende un dominio variable de la cadena pesada de identificador de secuencia n.º 16.

En un aspecto, el anticuerpo también comprende un dominio variable de la cadena ligera con al menos un 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 ó 99% de identificador de la secuencia con respecto a la secuencia de aminoácidos de identificador de secuencia n.º 17. En una forma de realización, el anticuerpo comprende un dominio variable de la cadena ligera de identificador de secuencia n.º 17.

En un aspecto, el anticuerpo también comprende un dominio variable de la cadena ligera con al menos un 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 ó 99% de identificador de la secuencia con respecto a la secuencia de aminoácidos de identificador de secuencia n.º 18. En una forma de realización, el anticuerpo comprende un dominio variable de la cadena ligera de identificador de secuencia n.º 18.

En una forma de realización, el anticuerpo comprende un dominio variable de la cadena pesada con al menos un 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 ó 100% de identificador de la secuencia con respecto a la secuencia de aminoácidos de identificador de secuencia n.º 16 y un dominio variable de la cadena ligera con al menos un 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 ó 100% de identificador de la secuencia con respecto a la secuencia de aminoácidos de identificador de secuencia n.º 17. En una forma de realización, el anticuerpo comprende un dominio variable de la cadena pesada con al menos un 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 ó 100% de identificador de la secuencia con respecto a la secuencia de aminoácidos de identificador de secuencia n.º 16 y un dominio variable de la cadena ligera con al menos un 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 ó 100% de identificador de la secuencia con respecto a la secuencia de aminoácidos de identificador de secuencia n.º 18. En una forma de realización, el dominio variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de identificador de secuencia n.º 16 y el dominio variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de identificador de secuencia n.º 17. En una forma de realización, el dominio variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de identificador de secuencia n.º 16 y el dominio variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de identificador de secuencia n.º 18.

En ciertas formas de realización, se proporciona un polinucleótido que codifica cualquiera de los anticuerpos anteriores. En una forma de realización, se proporciona un vector que comprende el polinucleótido. En una forma de realización, se proporciona un anfitrión celular que comprende el vector. En una forma de realización, el anfitrión celular es una célula eucariótica. En una forma de realización, el anfitrión celular es una célula de ovario de hámster chino (CHO). En una forma de realización, se proporciona un método de fabricación de un anticuerpo anti-CD22, en la que el método comprende el cultivo del anfitrión celular en condiciones aptas para la expresión del polinucleótido que codifica el anticuerpo y el aislamiento del anticuerpo.

En un aspecto, se proporciona un anticuerpo que se une a CD22 expresado en la superficie de una célula. En una forma de realización, el anticuerpo se une a un epítipo en la región del CD22 humano o de ratón que comprende el dominio 1 ó 2 o los dominios 1 y 2. En una forma de realización, la célula es una célula mamífera. En una forma de realización, la célula es una célula humana. En una forma de realización, la célula es una célula cancerosa. En una forma de realización, la célula es una célula B. En una forma de realización, la célula cancerosa es una célula B.

En ciertas formas de realización, cualquiera de los anticuerpos anteriores es un anticuerpo monoclonal. En una forma de realización, el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo seleccionado entre el fragmento Fab, Fab'-SH, Fv, scFv o (Fab')₂. En una forma de realización, el anticuerpo es humanizado. En una forma de realización, el anticuerpo es humano.

En un aspecto, se proporciona un método de detección de la presencia de CD22 en una muestra biológica y dicho método comprende establecer el contacto de la muestra biológica con cualquiera de los anticuerpos anteriores en condiciones que faciliten la unión del anticuerpo a CD22 y detectar si un complejo está formado por el anticuerpo y CD22. En una forma de realización, la muestra biológica comprende las células B. En una forma de realización, la muestra biológica se obtiene de un mamífero que experimenta o se cree que experimenta un trastorno de células B o un trastorno proliferativo de células B, o ambos, incluyendo, entre otros, linfoma, linfoma no Hodgkins (LNH), LNH agresivo, LNH agresivo recurrente, LNH indolente recurrente, LNH refractario, LNH indolente refractario, leucemia linfocítica crónica (LLC), linfoma linfocítico de células

pequeñas, leucemia, leucemia de células pilosas (LCP), leucemia linfocítica aguda (LLA) y linfoma de células del manto.

En un aspecto, se proporciona un método de diagnóstico de un trastorno de proliferación celular asociado a un aumento de la expresión de CD22. Este método comprende establecer un contacto entre una célula de prueba y cualquiera de los anticuerpos anteriores, determinar el nivel de expresión de CD22 mediante la detección de la unión del anticuerpo a CD22 y comparar el nivel de expresión de CD22 mediante la célula de prueba con el nivel de expresión de CD22 mediante una célula de control, donde un nivel más elevado de expresión de CD22 mediante la célula de prueba frente a la célula de control indica la presencia de un trastorno de proliferación celular asociado a un aumento de la expresión de CD22. En una forma de realización, la célula de prueba es una célula de un paciente que se cree que padece un trastorno de proliferación celular tal como el trastorno proliferativo de células B. En una forma de realización, el trastorno proliferativo de células B se selecciona a partir de los trastornos de células B que incluyen, entre otros, linfoma, linfoma no Hodgkins (LNH), LNH agresivo, LNH agresivo recurrente, LNH indolente recurrente, LNH refractario, LNH indolente refractario, leucemia linfocítica crónica (LLC), linfoma linfocítico de células pequeñas, leucemia, leucemia de células pilosas (LCP), leucemia linfocítica aguda (LLA) y linfoma de células del manto. En una forma de realización, el método comprende la determinación del nivel de expresión de CD22 en la superficie de la célula de prueba y la comparación del nivel de expresión de CD22 en la superficie de la célula de prueba con el nivel de expresión de CD22 en la superficie de la célula de control.

En un aspecto, se proporciona un método de diagnóstico de un trastorno de proliferación celular asociado a un aumento de células, tales como las células B, que expresan CD22. Este método comprende establecer un contacto entre células de prueba en una muestra biológica y cualquiera de los anticuerpos anteriores, determinar el nivel de unión del anticuerpo a células de prueba en la muestra mediante la detección de la unión del anticuerpo a CD22 y comparar el nivel de unión del anticuerpo a las células en una muestra de células de control, donde el nivel de unión del anticuerpo se normaliza a la cantidad de células que expresan CD22 en las muestras de células de prueba y de control, y en donde el nivel más elevado de unión del anticuerpo en la muestra de células de prueba

comparado con la muestra de células de control indica la presencia de un trastorno de proliferación celular asociado a células que expresan CD22.

En un aspecto, se proporciona un método de detección de CD22 soluble en la sangre o el suero. Este método comprende establecer el contacto entre una muestra de prueba de sangre o suero de un mamífero que se cree que experimenta un trastorno proliferativo de células B con un anticuerpo anti-CD22 de la invención, y detectar un aumento en el CD22 soluble en la muestra de prueba con respecto a la muestra de control de sangre o suero de un mamífero normal. En una forma de realización, el método de detección es útil como método de diagnóstico de trastornos proliferativos de células B asociados a un aumento de CD22 soluble en la sangre o el suero de un mamífero.

En un aspecto, los anticuerpos de la invención incluyen anticuerpos diseñados con cisteína en donde se reemplazan uno o más aminoácidos de un anticuerpo parental con un aminoácido sin cisteína, tal como se describe en el documento WO2006/034488 (íntegramente incorporado en la presente memoria descriptiva a modo de referencia). Cualquier forma de anticuerpos anti-CD22 puede diseñarse de esta manera, es decir, puede mutarse. Por ejemplo, un fragmento Fab del anticuerpo parental puede diseñarse para formar un Fab diseñado con cisteína, denominado "ThioFab" en la presente memoria descriptiva. Asimismo, un anticuerpo monoclonal parental puede diseñarse para formar un "ThioMab". Se debe tener en cuenta que una mutación en un único sitio produce un solo residuo diseñado con cisteína en un ThioFab, mientras una mutación en un único sitio produce dos residuos diseñados con cisteína en un ThioMab. Esto se debe a la naturaleza dimérica del anticuerpo IgG. Los anticuerpos anti-CD22 diseñados con cisteína de la invención incluyen anticuerpos monoclonales, anticuerpos monoclonales humanizados o quiméricos, y fragmentos de unión a antígeno de los anticuerpos, polipéptidos de fusión y análogos que preferentemente unen polipéptidos CD22 asociados a las células. Un anticuerpo diseñado con cisteína puede comprender alternativamente un anticuerpo que contenga una cisteína en el anticuerpo o Fab, con una posición detallada en la presente memoria descriptiva, que se obtiene del diseño o selección, o ambos, de la secuencia del anticuerpo, sin necesariamente alterar un anticuerpo parental, como por ejemplo, mediante un diseño y selección de anticuerpos presentados en fagos o a través de un diseño nuevo de secuencias estructurales y regiones constantes de la cadena ligera o pesada, o ambas. Un anticuerpo diseñado con

cisteína comprende uno o más aminoácidos sin cisteína con un valor de reactividad del tiol en un rango de entre 0,6 y 1,0; 0,7 y 1,0 ó 0,8 y 1,0. Un aminoácido sin cisteína es un residuo de cisteína que se ha diseñado como anticuerpo parental y no forma parte de un enlace disulfuro. Los anticuerpos diseñados con cisteína son útiles para la unión de compuestos citotóxicos o de imágenes, o ambos, en una posición de la cisteína diseñada mediante, por ejemplo, una maleimida o un haloacetil. La reactividad nucleofílica de la funcionalidad tiol de un residuo cys con un grupo maleimido es aproximadamente 1000 veces mayor en comparación con cualquier otra funcionalidad aminoácida en una proteína, como por ejemplo, el grupo amino de residuos de lisina o el grupo amino N terminal. La funcionalidad tiol específica en los reactivos iodoacétilos y maleimidos puede reaccionar con grupos aminos, sin embargo, se requieren tiempos de reacción mayores a pH (>9,0) y más prolongados (Garman, 1997, *Non-Radioactive Labelling: A Practical Approach*, Academic Press, London).

En una forma de realización, un anticuerpo anti-CD22 de la invención diseñado con cisteína comprende una cisteína diseñada en cualquiera de las siguientes posiciones, donde la posición es el número en la cadena ligera según Kabat y col., (véase Kabat y col., (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD) y en la cadena pesada según la numeración EU (incluyendo la región Fc) (véase Kabat y col., (1991), mencionado anteriormente), en donde la región constante de la cadena ligera que se subraya en la Figura 17A comienza en la posición 108 (numeración de Kabat) y la región constante de la cadena pesada que se muestra subrayada en las Figuras 17B y 17C comienza en la posición 118 (numeración EU). La posición también puede describirse por su posición en la numeración secuencial de los aminoácidos de las cadenas ligera o pesada de longitud completa que se muestran en las Figuras 17A-17C. Según una forma de realización de la invención, un anticuerpo anti-CD22 comprende una cisteína diseñada en LC-V205C (número según Kabat: Val 205; número secuencial 210 en la Figura 17A diseñado para que sea cys en esa posición). La cisteína diseñada en la cadena ligera se muestra en un texto en negrita con doble subrayado en la Figura 17A. Según una forma de realización, un anticuerpo anti-CD22 comprende una cisteína diseñada en HC-A118C (número EU: Ala 118; número secuencial 121 en la Figura 17B diseñado para que sea cys en esa posición). La cisteína diseñada en la cadena pesada se muestra en un texto en

negrita con doble subrayado en la Figura 17B. Según una forma de realización, un anticuerpo anti-CD22 comprende una cisteína diseñada en Fc-S400C (número EU: Ser 400; número secuencial 403 en la Figura 17C diseñado para que sea cys en esa posición). La cisteína diseñada en la región Fc de la cadena pesada se muestra en un texto en negrita con doble subrayado en la Figura 17C. En otras formas de realización, la cisteína diseñada de la cadena pesada (incluyendo la región Fc) se encuentra en cualquiera de las siguientes posiciones (según la numeración EU): 41, 88, 116, 118, 120, 171, 282, 375 ó 400. Por lo tanto, los cambios en los aminoácidos en estas posiciones para un anticuerpo anti-CD22 parental de la invención son: A41C, A88C, S116C, A118C, T120C, A171C, V282C, S375C o S400C. En otras formas de realización, la cisteína diseñada de la cadena ligera se encuentra en cualquiera de las siguientes posiciones (según la numeración de Kabat): 15, 43, 110, 144, 168, 205. Por lo tanto, los cambios en los aminoácidos en estas posiciones para un anticuerpo anti-CD22 parental de la invención son: V15C, A43C, V110C, A144C, S168C o V205C.

Un anticuerpo anti-CD22 diseñado con cisteína comprende uno o más aminoácidos sin cisteína, en donde el anticuerpo anti-CD22 diseñado con cisteína se une al polipéptido CD22 y se prepara mediante un proceso que comprende el reemplazo de uno o más residuos de aminoácidos de un anticuerpo anti-CD22 parental por cisteína, en donde el anticuerpo parental comprende al menos una secuencia HVR seleccionada de:

- (a) una secuencia RSSQSIVHSNGNTFLE (identificador de secuencia n.º 9) o una secuencia RSSQSIVHSVGNTFLE (identificador de secuencia n.º 10) de HVR-L1 (Figura 2B);
- (b) una secuencia KVSNRFS (identificador de secuencia n.º 12) de HVR-L2 (Figura 2B);
- (c) una secuencia FQGSQFPYT (identificador de secuencia n.º 14) de HVR-L3 (Figura 2B);
- (d) una secuencia GYEFSRSWMN (identificador de secuencia n.º 2) de HVR-H1 (Figura 2A);
- (e) una secuencia GRIYPGDGDTNYSKGKFKG (identificador de secuencia n.º 4) de HVR-H2 (Figura 2A); y
- (f) una secuencia DGSSWDWYFDV (identificador de secuencia n.º 6) de HVR-H3 (Figura A).

En cierto aspecto, la invención comprende un anticuerpo anti-CD22 diseñado con cisteína que contiene una secuencia de aminoácidos con al menos un 80% de identificación de secuencia de aminoácidos, en forma alternativa con al menos un 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 ó 100% de identificación de secuencia de aminoácidos, en un anticuerpo diseñado con cisteína con una secuencia de aminoácidos de longitud completa o una secuencia de aminoácidos del anticuerpo diseñado con cisteína carente de un péptido de señal, tal como se detalla en la presente memoria descriptiva.

En un segundo aspecto adicional, la invención se refiere a un anticuerpo anti-CD22 aislado diseñado con cisteína que comprende una secuencia de aminoácidos que se codifica mediante una secuencia de nucleótidos que se hibridiza con el complemento de una molécula de ADN que codifica (a) un anticuerpo diseñado con cisteína con una secuencia de aminoácidos de longitud completa, tal como se detalla en la presente memoria descriptiva, (b) una secuencia de aminoácidos del anticuerpo diseñado con cisteína carente de un péptido de señal, tal como se detalla en la presente memoria descriptiva, (c) un dominio extracelular de una proteína transmembrana del anticuerpo diseñado con cisteína, con el péptido de señal o sin él, tal como se detalla en la presente memoria descriptiva, (d) una secuencia de aminoácidos que se codifica mediante cualquiera de las secuencias de ácidos nucleicos, tal como se detalla en la presente memoria descriptiva o (e) cualquier otro fragmento específicamente definido de una secuencia de aminoácidos del anticuerpo diseñado con cisteína de longitud completa, tal como se detalla en la presente memoria descriptiva.

En un aspecto específico, la invención proporciona un anticuerpo anti-CD22 aislado diseñado con cisteína sin la secuencia de señal N-terminal ni la metionina inicial, y se codifica mediante una secuencia de nucleótidos que codifica dicha secuencia de aminoácidos, tal como se detalla en la presente memoria descriptiva. Los procesos para producir dicho anticuerpo también se detallan en la presente memoria descriptiva, en donde los procesos comprenden el cultivo de una célula huésped que contiene un vector con la correspondiente molécula de ácido nucleico de codificación bajo las condiciones adecuadas para la expresión del anticuerpo diseñado con cisteína, y la recuperación del anticuerpo diseñado con cisteína del cultivo celular.

Otro aspecto de la invención proporciona un anticuerpo anti-CD22 aislado diseñado con cisteína que es un transmembrana con dominio eliminado o inactivo.

Los procesos para producir dicho anticuerpo también se detallan en la presente memoria descriptiva, en donde esos procesos comprenden el cultivo de una célula huésped con un vector que contiene la correspondiente molécula de ácido nucleico codificada bajo las condiciones adecuadas para la expresión del anticuerpo diseñado con cisteína, y la recuperación del anticuerpo diseñado con cisteína del cultivo celular.

En otras formas de realización, la invención proporciona anticuerpos anti-CD22 quiméricos aislados diseñados con cisteína que comprenden cualquiera de los anticuerpos diseñados con cisteína que se detallan en la presente memoria descriptiva, fusionados a un polipéptido heterólogo (no CD22). Un ejemplo de dichas moléculas quiméricas comprende cualquiera de los anticuerpos diseñados con cisteína que se detallan en la presente memoria descriptiva, fusionados a un polipéptido heterólogo tal como una secuencia de marca de epítipo o una región Fc de una inmunoglobulina.

El anticuerpo anti-CD22 diseñado con cisteína puede ser un anticuerpo monoclonal, un fragmento de anticuerpo, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo de cadena única o un anticuerpo que inhiba competitivamente la unión del anticuerpo polipéptido anti-CD22 a su correspondiente epítipo antigénico. Los anticuerpos de la presente invención pueden conjugarse opcionalmente con un agente inhibidor del crecimiento o un agente citotóxico tal como una toxina, incluyendo, por ejemplo, una auristatina, un antibiótico, un isótopo radioactivo, una enzima nucleolítica o similares. Los anticuerpos de la presente invención pueden producirse opcionalmente en células CHO o células bacterianas y, preferentemente, inhibir el crecimiento o la proliferación, o bien inducir la muerte de una célula a la que se unen. Con fines diagnóstico, los anticuerpos de la presente invención pueden marcarse de forma detectable, unirse a un soporte sólido, etc.

En otras formas de realización de la presente invención, la invención proporciona vectores que comprenden el ADN que codifica cualquiera de los anticuerpos anti-CD22 y anticuerpos anti-CD22 diseñados con cisteína que se detallan en la presente memoria descriptiva. También se proporcionan las células huésped que comprenden cualquiera de estos vectores. A modo de ejemplo, las células huésped pueden ser células CHO, células E. coli o células de levadura. También se proporciona un proceso para producir cualquier polipéptido detallado en la presente memoria descriptiva que comprende el cultivo de células huésped

bajo las condiciones adecuadas para la expresión del polipéptido deseado y la recuperación de dicho polipéptido del cultivo celular.

Los anticuerpos diseñados con cisteína pueden ser útiles en el tratamiento del cáncer e incluir anticuerpos específicos para la superficie celular y los receptores transmembranales, y antígenos asociados al tumor (AAT). Estos anticuerpos pueden utilizarse como anticuerpos desnudos (no conjugados con una fracción de fármacos o marcas) o como anticuerpos conjugados con fármacos (ADC). Los anticuerpos de la invención diseñados con cisteína pueden ubicarse específicamente o acoplarse eficazmente con un reactivo del tiol. El reactivo del tiol puede ser un reactivo enlazador multifuncional, un reactivo de captura marcado, un reactivo fluoróforo o un enlazador a fármacos intermedio. El anticuerpo diseñado con cisteína puede marcarse con una marca detectable, inmovilizarse en un soporte de fase sólida o conjugarse con una fracción de fármacos, o todas las anteriores. La reactividad del tiol puede generalizarse en cualquier anticuerpo, donde la sustitución de aminoácidos por aminoácidos de cisteínas reactivas puede realizarse dentro de los rangos en la cadena ligera seleccionados a partir de los rangos de aminoácidos: de L-10 a L-20, de L-38 a L-48, de L-105 a L-115, de L-139 a L-149, de L-163 a L-173; y dentro de los rangos en la cadena pesada seleccionados a partir de los rangos de aminoácidos: de H-35 a H-45, de H-83 a H-93, de H-114 a H-127 y de H-170 a H-184; y en la región Fc, dentro de los rangos seleccionados de H-268 a H-291, de H-319 a H-344, de H-370 a H-380 y de H-395 a H-405, en el que la numeración de las posiciones de los aminoácidos comienza a partir de la posición 1 del sistema de numeración de Kabat (Kabat y col., (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5.^a Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD) y continúa secuencialmente a partir de entonces, tal como se describe en el documento WO2006034488. La reactividad del tiol también puede generalizarse en determinados dominios de un anticuerpo, como por ejemplo, el dominio constante de la cadena ligera (CL) y los dominios constantes de la cadena pesada, CH1, CH2 y CH3. Las sustituciones de cisteínas que producen como resultado los valores de reactividad del tiol de 0,6 y mayores pueden realizarse en los dominios constantes de la cadena pesada α , δ , ϵ , γ y μ de anticuerpos intactos: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, respectivamente, incluyendo las subclases IgG: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA e IgA2. Estos anticuerpos y sus usos se describen en el documento WO2006/034488.

Los anticuerpos de la invención diseñados con cisteína conservan preferentemente la capacidad de unión al antígeno de los homólogos anticuerpos parentales de tipo natural. Por lo tanto, los anticuerpos diseñados con cisteína son capaces de unirse específica y preferentemente con antígenos. Dichos antígenos incluyen, por ejemplo, antígenos asociados al tumor (AAT), proteínas de los receptores de la superficie celular y otras moléculas de la superficie celular, proteínas transmembranas, proteínas de señalización, factores reguladores de la supervivencia celular, factores reguladores de la proliferación celular, moléculas asociadas al (por ejemplo, que se sabe o se cree que contribuyen de manera funcional al) desarrollo o diferenciación del tejido, linfoquinas, citoquinas, moléculas implicadas en la regulación del ciclo celular o en la vasculogénesis y moléculas asociadas a (por ejemplo, que se sabe o se cree que contribuyen de manera funcional a) la angiogénesis. El antígeno asociado al tumor puede ser un factor de diferenciación de grupos (es decir, una proteína CD, incluyendo, entre otras, la CD22). Los anticuerpos anti-CD22 de la invención diseñados con cisteína conservan la capacidad de unión al antígeno de sus homólogos anticuerpos parentales anti-CD22. Por ende, los anticuerpos anti-CD22 de la invención diseñados con cisteína son capaces de unirse específica y preferentemente a los antígenos CD22, incluyendo las isoformas anti-CD22 humanas beta o alfa, o ambas; aún cuando dichos antígenos se expresan en la superficie celular, incluyendo, entre otras, las células B.

Un anticuerpo de la invención puede conjugarse a otros agentes reactivos del tiol en los que el grupo reactivo es, por ejemplo, un maleimido, una iodoacetamida, un piridil disulfuro u otra molécula de conjugación de los reactivos del tiol (Haugland, 2003, *Molecular Probes Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals*, Molecular Probes, Inc.; Brinkley, 1992, *Bioconjugate Chem.* 3:2; Garman, 1997, *Non-Radioactive Labelling: A Practical Approach*, Academic Press, London; Means (1990) *Bioconjugate Chem.* 1:2; Hermanson, G. en *Bioconjugate Techniques* (1996) Academic Press, San Diego, págs. 40-55, 643-671). La molécula puede ser un agente citotóxico (por ejemplo, una toxina tal como la doxorubicina o toxina pertussis), un fluoróforo tal como un tinte fluorescente como la fluoresceína o rodamina, un agente quelante de metales para la radioterapia o en diagnóstico por imágenes, una marca peptidil o no peptidil o una marca de detección, o un agente modificador de la eliminación

como por ejemplo muchos isómeros del polietilenglicol, un péptido que se une a un tercer componente u otro carbohidrato o agente lipofílico.

En un aspecto, los anticuerpos de la invención pueden conjugarse con cualquier grupo de marcas que pueda unirse covalentemente al anticuerpo a través de un grupo reactivo, un grupo activo o un grupo tiol de cisteína reactivo (Singh y col., (2002) *Anal. Biochem.* 304:147-15; Harlow E. y Lane, D. (1999) *Using Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Springs Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; Lundblad R.L. (1991) *Chemical Reagents for Protein Modification*, 2.^a ed. CRC Press, Boca Raton, FL). La marca unida puede: (i) proporcionar una señal detectable; (ii) interactuar con una segunda marca para modificar la señal detectable que proporcionó la primera o la segunda marca, por ejemplo, para brindar FRET (transferencia resonante de energía de fluorescencia); (iii) estabilizar las interacciones o aumentar la afinidad de unión con un antígeno o ligando; (iv) afectar la movilidad, como por ejemplo, la movilidad electroforética o la permeabilidad celular mediante la carga, hidrofobicidad, forma u otros parámetros físicos; o (v) proporcionar el grupo de captura para modular la afinidad del ligando, la unión antígeno-anticuerpo o la formación de complejos iónicos.

Los anticuerpos diseñados con cisteína y marcados pueden ser útiles en los ensayos de diagnóstico, por ejemplo, para detectar la expresión de un antígeno de interés en células, tejidos o sueros específicos. Para las aplicaciones de diagnóstico, el anticuerpo generalmente se marcará con un grupo detectable. Se dispone de numerosas marcas que pueden agruparse, por lo general, en las siguientes categorías:

Radioisótopos (radionucleidos) tales como ^3H , ^{11}C , ^{14}C , ^{18}F , ^{32}P , ^{35}S , ^{64}Cu , ^{68}Ga , ^{86}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{123}I , ^{124}I , ^{125}I , ^{131}I , ^{133}Xe , ^{177}Lu , ^{211}At o ^{213}Bi . Los anticuerpos marcados con radioisótopos son útiles en los experimentos de diagnóstico por imágenes que actúan sobre el receptor. El anticuerpo puede marcarse con reactivos ligandos que unen agentes quelantes de metales u otros complejos para el radioisótopo, donde el agente es reactivo con el tiol diseñado con cisteína del anticuerpo, mediante las técnicas que se describen en *Current Protocols in Immunology*, Volúmenes 1 y 2, Coligen y col., Ed. Wiley-Interscience, New York, NY, Pubs. (1991). Los ligandos quelantes que pueden combinar un metal ion incluyen DOTA, DOTP, DOTMA, DTPA y TETA (Macrocyclics, Dallas, TX). Los radionucleidos pueden indicarse a través de la formación de complejos con

anticuerpos de la invención conjugados con fármacos (Wu y col., (2005) *Nature Biotechnology* 23(9):1137-1146).

Los reactivos enlazadores tales como el maleimido-DOTA (4-maleimidobutiramidobenzilo-DOTA) pueden prepararse mediante la reacción del aminobenzilo-DOTA con el ácido 4-maleimidobutírico (Fluka) activado con formatocloroisopropil (Aldrich), siguiendo el procedimiento de Axworthy y col., (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97(4):1802-1807). Los agentes reactivos maleimido-DOTA reaccionan con los aminoácidos sin cisteína de los anticuerpos diseñados con cisteína y proporcionan un ligando de formación de complejos de metal en el anticuerpo (Lewis y col., (1998) *Bioconj. Chem.* 9:72-86) Los reactivos de marcación con enlazadores quelantes tales como DOTA-NHS (1, 4, 7, 10-tetraazaciclododecano- 1, 4, 7, 10-monoácido tetraacético (éster de N-hidroxisuccinimida) se encuentran comercialmente disponibles (Macrocylics, Dallas, TX). La imagen que actúa sobre el receptor con los anticuerpos marcados con radionucleidos puede proporcionar un marcador de una vía de activación mediante la detección y cuantificación de la acumulación progresiva de anticuerpos en el tejido tumoral (Albert y col., (1998) *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 8:1207-1210). Los radiometales conjugados pueden permanecer intracelulares después de la degradación lisosomal.

Los complejos quelantes de metales que sirven como marcas de anticuerpos para los experimentos de diagnóstico por imágenes se describen en: patente de EE.UU. N.º 5342606; patente de EE.UU. N.º 5428155; patente de EE.UU. N.º 5316757; patente de EE.UU. N.º 5480990; patente de EE.UU. N.º 5462725; patente de EE.UU. N.º 5428139; patente de EE.UU. N.º 5385893; patente de EE.UU. N.º 5739294; patente de EE.UU. N.º 5750660; patente de EE.UU. N.º 5834456; Hnatowich y col., (1983) *J. Immunol. Methods* 65:147-157; Meares y col., (1984) *Anal. Biochem.* 142:68-78; Mirzadeh y col., (1990) *Bioconjugate Chem.* 1:59-65; Meares y col., (1990) *J. Cancer* 1990, Suppl. 10:21-26; Izard y col., (1992) *Bioconjugate Chem.* 3:346-350; Nikula y col., (1995) *Nucl. Med. Biol.* 22:387-90; Camera y col., (1993) *Nucl. Med. Biol.* 20:955-62; Kukis y col., (1998) *J. Nucl. Med.* 39:2105-2110; Verel y col., (2003) *J. Nucl. Med.* 44:1663-1670; Camera y col., (1994) *J. Nucl. Med.* 21:640-646; Ruegg y col., (1990) *Cancer Res.* 50:4221-4226; Verel y col., (2003) *J. Nucl. Med.* 44:1663-1670; Lee y col., (2001) *Cancer Res.* 61:4474-4482; Mitchell y col., (2003) *J. Nucl. Med.* 44:1105-1112; Kobayashi y col., (1999) *Bioconjugate Chem.* 10:103-111;

Miederer y col., (2004) *J. Nucl. Med.* 45:129-137; DeNardo y col., (1998) *Clinical Cancer Research* 4:2483-90; Blend y col., (2003) *Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals* 18:355-363; Nikula y col., (1999) *J. Nucl. Med.* 40:166-76; Kobayashi y col., (1998) *J. Nucl. Med.* 39:829-36; Mardirossian y col., (1993) *Nucl. Med. Biol.* 20:65-74; Roselli y col., (1999) *Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals*, 14:209-20.

(b) Las marcas fluorescentes tales como los quelantes térreos (quelantes europios) poco frecuentes, los tipos fluoresceína, incluyendo FITC, 5-carboxifluoresceína, 6-carboxifluoresceína; los tipos rodamina, que incluyen TAMRA; dansil; lisamina; cianinas; ficoeritrina; Rojo Texas y los análogos de los mismos. Las marcas fluorescentes pueden conjugarse a anticuerpos mediante las técnicas que se describen en, por ejemplo, *Protocols in Immunology*, mencionado anteriormente. Los reactivos de tintes y marcas fluorescentes incluyen aquellos que se encuentran comercialmente disponibles de *Invitrogen/Molecular Probes* (Eugene, OR) y *Pierce Biotechnology, Inc.* (Rockford, IL).

(c) Se encuentran disponibles o se detallan diversas marcas de sustratos de enzimas (patente de EE.UU. N.º 4275149). Por lo general, la enzima cataliza una alteración química de un sustrato cromogénico que puede medirse mediante diversas técnicas. Por ejemplo, la enzima puede catalizar un cambio de color en un sustrato que puede medirse espectrofotométricamente. Alternativamente, la enzima puede alterar la fluorescencia o quimioluminiscencia de un sustrato. Las técnicas para cuantificar un cambio en fluorescencia se describen anteriormente. El sustrato quimioluminescente se excita electrónicamente mediante una reacción química y entonces puede emitir luz que puede medirse (mediante un quimioluminómetro, por ejemplo) o puede donar energía al aceptor fluorescente. Los ejemplos de marcas enzimáticas incluyen luciferasas (por ejemplo, luciferasa de la luciérnaga y luciferasa bacteriana; patente de EE.UU. N.º 4737456), luciferina, 2,3-dihidroftalazinadionas, malato deshidrogenasa, ureasa, peroxidasa tal como la peroxidasa de rábano picante (HRP), fosfatasa alcalina (AP), beta-galactosidasa, glucoamilasa, lisozima, oxidasas sacáridas (como por ejemplo, glucosa oxidasa, galactosa oxidasa y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa), oxidasas heterocíclicas (tal como uricasa y xantina oxidasa), lactoperoxidasa, microperoxidasa, y similares. Las técnicas para la conjugación de enzimas con anticuerpos se describen en O'Sullivan y col.,

(1981) "Methods for the Preparation of Enzyme-Antibody Conjugates for use in Enzyme Immunoassay", en *Methods in Enzym.* (ed J. Langone & H. Van Vunakis), Academic Press, New York, 73:147-166.

Los ejemplos de combinaciones de sustratos de enzimas incluyen:

(i) Peroxidasa de rábano picante (HRP) con peroxidasa de hidrógeno como un sustrato, donde la peroxidasa de hidrógeno oxida un precursor de tinte (como por ejemplo, el ortofenileno diamina (OPD) o clorhidrato de 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB));

(ii) fosfatasa alcalina (AP) con paranitrofenilfosfato como un sustrato cromogénico; y

(iii) β -D-galactosidasa (β -D-Gal) con un sustrato cromogénico (por ejemplo, p-nitrofenil- β -D-galactosidasa) o un sustrato fluorogénico 4-metilumbeliferil- β -D-galactosidasa.

Se encuentran disponibles muchas otras combinaciones de sustratos de enzimas para aquellos expertos en la materia. Para obtener una revisión general, véase las patentes de EE.UU. 4275149 y 4318980.

Una marca puede conjugarse de manera indirecta con una cadena lateral de aminoácidos, una cadena lateral de aminoácidos activada, un anticuerpo diseñado con cisteína, y similares. Por ejemplo, el anticuerpo puede conjugarse con biotina y cualquiera de las tres categorías amplias de marcas mencionadas anteriormente puede conjugarse con avidina o estreptavidina, o viceversa. La biotina se une selectivamente a la estreptavidina y, por ende, la marca puede conjugarse con el anticuerpo de esta manera indirecta. Alternativamente, para lograr la conjugación indirecta de la marca con la variante polipeptídica, esta última se conjuga con un hapteno pequeño (por ejemplo, digoxina) y uno de los diferentes tipos de marcas mencionadas anteriormente se conjuga con la variante polipeptídica anti-hapteno (por ejemplo, anticuerpo anti-digoxina). Por lo tanto, se puede lograr la conjugación indirecta de la marca con la variante polipeptídica (Hermanson, G. (1996) en *Bioconjugate Techniques*, Academic Press, San Diego)

El anticuerpo de la presente invención puede emplearse en cualquier método de ensayo conocido tales como ELISA, ensayos de unión competitiva, ensayos tipo "sandwich" directos e indirectos y ensayos de inmunoprecipitación (Zola, (1987) *Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques*, págs. 147-158, CRC Press, Inc.).

92

Una marca de detección puede ser útil para localizar, visualizar y cuantificar una unión o un evento de reconocimiento. Los anticuerpos marcados de la invención pueden detectar receptores en la superficie celular. Otro uso de los anticuerpos marcados de forma detectable es un método de inmunocaptura basado en partículas que comprende la conjugación de una partícula con un anticuerpo fluorescente marcado y la detección de una señal fluorescente sobre la unión de un ligando. Metodologías similares de detección de uniones utilizan el efecto de la resonancia de plasmón superficial (RPS) para medir y detectar las interacciones entre anticuerpos y antígenos.

Las marcas de detección, como por ejemplo, los tintes fluorescentes y quimioluminescentes (Briggs y col., (1997) "Synthesis of Functionalised Fluorescent Dyes and Their Coupling to Amines and Amino Acids," *J. Chem. Soc., Perkin-Trans. 1*:1051-1058), proporcionan una señal detectable y por lo general, se aplican en los anticuerpos marcados, preferentemente en aquellos que tienen las siguientes propiedades: (i) el anticuerpo marcado debe producir una señal muy alta con un entorno bajo para que las pequeñas cantidades de anticuerpos puedan detectarse sensiblemente tanto en los ensayos con células como en aquellos sin células; y (ii) el anticuerpo marcado debe ser fotoestable para que la señal fluorescente pueda observarse, controlarse y registrarse sin un fotoblanqueamiento significativo. Para las aplicaciones que implican una unión en la superficie celular del anticuerpo marcado a las membranas o superficies celulares, especialmente células vivas, las marcas preferentemente (iii) deben tener una buena solubilidad en agua para lograr una concentración de conjugado y una sensibilidad de detección eficaces y (iv) no deben ser tóxicas para las células vivas para no alterar los procesos metabólicos normales de las células ni causar la muerte prematura de éstas.

La cuantificación directa de la intensidad de la fluorescencia celular y la enumeración de los eventos marcados fluorescentemente, como por ejemplo, la unión en la superficie celular de los conjugados de tinte peptídica, pueden realizarse en un sistema (Sistema FMAT® 8100 HTS, Applied Biosystems, Foster City, Calif.) que automatiza la mezcla y lectura de los ensayos no radiactivos con células vivas o partículas (Miraglia, "Homogeneous cell- and bead-based assays for high throughput screening using fluorometric microvolume assay technology", (1999) *J. of Biomolecular Screening* 4:193-204). Los usos de los anticuerpos marcados también incluyen los ensayos de unión del receptor de superficie

celular, los ensayos de inmunocaptura, los ensayos de inmunoabsorción ligado a fluorescencia (FLISA), la escisión de la caspasa (Zheng, "Caspase-3 controls both cytoplasmic and nuclear events associated with Fas-mediated apoptosis in vivo", (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:618-23; US 6372907), la apoptosis (Vermes, "A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V" (1995) *J. Immunol. Methods* 184:39-51) y los ensayos de citotoxicidad. La tecnología de ensayos de microvolumen fluorométrico puede utilizarse para identificar las regulaciones a la alza y a la baja mediante una molécula que actúa sobre la superficie celular (Swartzman, "A homogeneous and multiplexed immunoassay for high-throughput screening using fluorometric microvolume assay technology", (1999) *Anal. Biochem.* 271:143-51).

Los anticuerpos marcados de la invención son útiles como biomarcadores de diagnóstico por imágenes y sondas que se utilizan en los distintos métodos y técnicas de diagnóstico por imagen biomédica y molecular, tales como: (i) MRI (imágenes obtenidas mediante resonancia magnética); (ii) MicroCT (tomografía computarizada); (iii) SPECT (tomografía computarizada de emisión de fotón único); (iv) PET (tomografía con emisión de positrones) Chen y col., (2004) *Bioconjugate Chem.* 15:41-49; (v) bioluminiscencia; (vi) fluorescencia y (vii) ultrasonido. La inmunoscintigrafía es un procedimiento de diagnóstico por imágenes en el que los anticuerpos marcados con sustancias radiactivas se administran a un animal o a un paciente humano y se obtiene una fotografía de los lugares del cuerpo donde se localizan dichos anticuerpos (patente de EE.UU. N.º 6528624). Los biomarcadores de diagnóstico por imágenes pueden medirse y evaluarse objetivamente como un indicador de procesos biológicos normales, procesos patogénicos o respuestas farmacológicas a una intervención terapéutica. Existen diferentes tipos de biomarcadores: los Tipo 0 son marcadores de la historia natural de una enfermedad y están correlacionados longitudinalmente con índices clínicos conocidos, como por ejemplo, la valoración por MRI de la inflamación sinovial en la artritis reumatoide; los marcadores Tipo I capturan el efecto de una intervención de acuerdo con un mecanismo de acción, inclusive si el mecanismo no está relacionado con el resultado clínico; los marcadores Tipo II funcionan como puntos de valoración alternativos en donde el cambio o la señal del biomarcador pronostica un beneficio clínico para "validar" la respuesta objetiva, como por ejemplo, una erosión ósea que mide la tomografía

computarizada en la artritis reumatoide. Por lo tanto, los biomarcadores de diagnóstico por imágenes pueden proporcionar información terapéutica farmacodinámica (FD) sobre: (i) la expresión de una proteína diana, (ii) la unión de un agente terapéutico a la proteína diana, es decir, la selectividad, y (iii) los datos de eliminación y semivida farmacocinética. Las ventajas de los biomarcadores de imágenes *in vivo* con respecto a los biomarcadores basados en el laboratorio incluyen: tratamiento no invasivo, cuantificación, evaluación de todo el cuerpo, evaluaciones y dosis repetitivas, es decir, muchos momentos específicos, y transferencia potencial de efectos preclínicos (en animales pequeños) a resultados clínicos (en humanos). Para algunas aplicaciones, la bioimagen sustituye o minimiza la cantidad de experimentos realizados en animales en estudios preclínicos.

Los métodos de marcado con péptidos son bien conocidos. Véase Haugland, 2003, *Molecular Probes Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals*, Molecular Probes, Inc.; Brinkley, 1992, *Bioconjugate Chem.* 3:2; Garman, (1997) *Non-Radioactive Labelling: A Practical Approach*, Academic Press, London; Means (1990) *Bioconjugate Chem.* 1:2; Glazer y col., (1975) *Chemical Modification of Proteins*. Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology (T. S. Work y E. Work, Eds.) American Elsevier Publishing Co., New York; Lundblad, R. L. y Noyes, C. M. (1984) *Chemical Reagents for Protein Modification*, Vols. I y II, CRC Press, New York; Pfeleiderer, G. (1985) "Chemical Modification of Proteins", *Modern Methods in Protein Chemistry*, H. Tschesche, Ed., Walter DeGruyter, Berlin y New York; y Wong (1991) *Chemistry of Protein Conjugation and Cross-linking*, CRC Press, Boca Raton, Fla.); De Leon-Rodriguez y col., (2004) *Chem.Eur. J.* 10:1149-1155; Lewis y col., (2001) *Bioconjugate Chem.* 12:320-324; Li y col., (2002) *Bioconjugate Chem.* 13:110-115; Mier y col., (2005) *Bioconjugate Chem.* 16:240-237.

Los péptidos y las proteínas marcados con dos grupos, un indicador fluorescente y uno de absorción lo suficientemente cerca entre sí experimentan la transferencia resonante de energía de fluorescencia (FRET). Por lo general, los grupos de indicadores son tintes fluorescentes que se excitan mediante la luz a una longitud de onda determinada y transfieren la energía a un grupo de aceptores o absorbentes con el cambio Stokes adecuado para producir la emisión con un brillo máximo. Los tintes fluorescentes incluyen moléculas con una aromaticidad extendida tal como la fluoresceína y la rodamina y sus derivados. La

fracción absorbente en un péptido intacto puede absorber parcial o completamente el indicador fluorescente. Cuando la peptidasa o la protasa producen la escisión de un péptido, puede medirse un aumento detectable en la fluorescencia (Knight, C. (1995) "Fluorimetric Assays of Proteolytic Enzymes", *Methods in Enzymology*, Academic Press, 248:18-34).

Los anticuerpos marcados de la invención también pueden utilizarse como un agente para la purificación por afinidad. En este proceso, el anticuerpo marcado se inmoviliza en un soporte sólido, como una resina Sephadex o papel de filtro, utilizando métodos conocidos en la materia. El anticuerpo inmovilizado entra en contacto con una muestra que contiene el antígeno que deberá purificarse y, a continuación, el soporte se lava con un solvente adecuado que eliminará sustancialmente todo el material de la muestra, excepto el antígeno que se purificará y que está unido a la variante polipeptídica inmovilizada. Finalmente, el soporte se lava con otro solvente adecuado tal como el tampón glicina, pH 5,0, que liberará el antígeno de la variante polipeptídica.

Los reactivos de marcación tienen generalmente una funcionalidad reactiva que puede reaccionar (i) directamente con un tiol de cisteína de un anticuerpo diseñado con cisteína para formar un anticuerpo marcado, (ii) con un reactivo enlazador para formar un enlazador marcado intermedio o (iii) con un anticuerpo enlazador para formar un anticuerpo marcado. La funcionalidad reactiva de los reactivos de marcación incluye: maleimido, haloacetil, éster succinimidil iodoacetamida (por ejemplo, NHS, N-hidroxisuccinimida), isotiocianato, cloruro sulfonil, 2,6-diclorotriazinil, éster pentafluorofenil y fosforamidita, a pesar de que también pueden utilizarse otros grupos funcionales.

Un grupo funcional reactivo ejemplar es el éster N-hidroxisuccinimidil (NHS) de un grupo carboxilo que sustituye una marca detectable, por ejemplo, una biotina o un tinte fluorescente. El éster NHS de la marca puede preformarse, aislarse, purificarse o caracterizarse, o todos los anteriores, o bien puede formarse in situ y reaccionar con un grupo nucleofílico de un anticuerpo. Por lo general, la forma carboxilo de la marca se activa cuando reacciona con alguna combinación de un reactivo de carbodiimida, como por ejemplo, diciclohexilcarbodiimida, diisopropilcarbodiimida, o un reactivo de uronio, como por ejemplo, TSTU (O-(N-Succinimidil)-N,N,N',N'-tetrametiluronio tetrafluoroborato, HBTU (O-benzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetrametiluronio hexafluorofosfato) o HATU (O-(7-azabenzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetrametiluronio hexafluorofosfato), un activador tal como 1-

hidroxibenzotriazol (HOBt) y N-hidroxisuccinimida para proporcionar el éster NHS de la marca. En algunos casos, la marca y el anticuerpo deben acoplarse mediante la activación de la marca en el lugar y reaccionar con el anticuerpo para formar el conjugado de anticuerpo y marca en un paso. Otros reactivos de activación y acoplamiento incluyen TBTU (2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,3,3-tetrametiluronio hexafluorofosfato), TFFH (N,N',N'',N'''-tetrametiluronio 2-fluoro-hexafluorofosfato), PyBOP (benzotriazol-1-il-oxi-tris-pirrolidino-fosfonio hexafluorofosfato), EEDQ (2-etoxi-1-etoxicarbonil-1,2-dihidroquinolina), DCC (diciclohexilcarbodiimida); DIPCDI (diisopropilcarbodiimida), MSNT (1-(mesitileno-2-sulfonil)-3-nitro-1H-1,2,4-triazolo y arilo sulfonil halidos, como ejemplo, cloruro de triisopropilbenzensulfonil.

Compuestos de péptidos-Fab de unión a la albúmina de la invención:

En un aspecto, el anticuerpo de la invención se fusiona con una proteína de unión a la albúmina. La unión a proteínas plasmáticas puede ser una manera eficaz de mejorar las propiedades farmacocinéticas de las moléculas de vida corta. La albúmina es la proteína que se encuentra en mayor abundancia en el plasma. Los péptidos de unión a la albúmina sérica (ABP) pueden alterar la farmacodinámica de las proteínas fusionadas al dominio activo, incluyendo la alteración de la absorción, penetración y difusión de tejido. Estos parámetros farmacodinámicos pueden modularse mediante la selección específica de la secuencia adecuada del péptido de unión a la albúmina sérica (US 20040001827). Se identificaron una serie de péptidos de unión a la albúmina mediante la detección de representación en imágenes de fagos (Dennis y col., (2002) "Albumin Binding As A General Strategy for Improving The Pharmacokinetics Of Proteins" J Biol Chem. 277:35035-35043; documento WO 01/45746). Los compuestos de la invención incluyen secuencias de péptidos de unión a la albúmina (ABP) que se indican en: (i) Dennis y col., (2002) J Biol Chem. 277:35035-35043 en las Tablas III y IV, página 35038; (ii) US 20040001827 en [0076] identificadores de secuencia n.º: 9-22; y (iii) en el documento WO 01/45746 en las páginas 12-13, los cuales se incorporan en la presente memoria descriptiva a modo de referencia. Los Fabs de unión a la albúmina (ABP) están diseñados mediante la fusión de un péptido de unión a la albúmina y el extremo C-terminal de la cadena pesada de Fab con un coeficiente estequiométrico de 1:1 (1 ABP / 1 Fab). Se demostró que la asociación de estos ABP-Fabs con la albúmina incrementó la semivida del anticuerpo más de 25 veces en conejos y ratones. Por lo tanto, los residuos Cys

27

reactivos mencionados anteriormente pueden introducirse en estos ABP-Fabs y utilizarse para la conjugación específica de un punto con fármacos citotóxicos seguidos de estudios *in vivo* en animales.

Las secuencias de péptidos de unión a la albúmina ejemplares incluyen, entre otras, las secuencias de aminoácidos que se enumeran en los identificadores de secuencia n.º:42-46:

CDKTHHTGGGSQRLMEDICLPRWGCLWEDDF Identificador de
secuencia n.º:42

QRLMEDICLPRWGCLWEDDF Identificador de secuencia
n.º:43

QRLIEDICLPRWGCLWEDDF Identificador de
secuencia n.º:44

RLIEDICLPRWGCLWEDD Identificador de
secuencia n.º:45

DICLPRWGCLW Identificador de secuencia
n.º:46

Conjugados de anticuerpos con fármacos

En otro aspecto, la invención proporciona inmunoconjugados, conjugados de anticuerpos con fármacos (ADC), que comprenden un anticuerpo conjugado con un agente citotóxico, como por ejemplo un agente quimioterapéutico, un fármaco, un agente inhibidor del crecimiento, una toxina (por ejemplo, una toxina enzimáticamente activa de origen bacteriano, fúngico, animal o vegetal, o fragmentos de la misma), o un isótopo radioactivo (es decir, un radioconjugado). En otro aspecto, la invención también ofrece métodos de uso de los inmunoconjugados. En un aspecto, un inmunoconjugado comprende cualquiera de los anticuerpos anti-CD22 mencionados anteriormente unidos covalentemente a un agente citotóxico o detectable.

El uso de anticuerpos conjugados con fármacos para la administración local de agentes citotóxicos o citostáticos, es decir, los fármacos que se utilizan para matar o inhibir células tumorales en el tratamiento del cáncer (Syrigos y Epenetos (1999) *Anticancer Research* 19:605-614; Niculescu-Duvaz y Springer (1997) *Adv. Drg Del. Rev.* 26: 151-172; patente de EE. UU. n.º 4.975.278), permite la administración de la fracción de fármacos a tumores y una acumulación intracelular en éstos, donde la administración sistemática de estos agentes

47

farmacológicos no conjugados puede resultar en niveles inaceptables de toxicidad tanto para las células normales como para las células tumorales que se intentan eliminar (Baldwin y col., (1986) *Lancet* págs. (Mar. 15, 1986):603-05; Thorpe, (1985) "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review," en *Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications*, A. Pinchera y col. (eds), págs. 475-506). Se busca entonces la máxima eficacia con la mínima toxicidad. Tanto los anticuerpos monoclonales como los policlonales se han descrito como útiles en estas estrategias (Rowland y col., (1986) *Cancer Immunol. Immunother.*, 21:183-87). Los fármacos empleados en estos métodos incluyen a la daunomicina, la doxorubicina, el metotrexato y la vindesina (Rowland y col., (1986) mencionado anteriormente). Entre las toxinas empleadas en los conjugados de anticuerpos con toxinas se encuentran toxinas bacterianas como la toxina de la difteria, toxinas vegetales como la ricina, toxinas de molécula pequeña como la geldanamicina (Mandler y col., (2000) *Jour. of the Nat. Cancer Inst.* 92(19):1573-1581; Mandler y col., (2000) *Bioorganic & Med. Chem. Letters* 10:1025-1028; Mandler y col., (2002) *Bioconjugate Chem.* 13:786-791), maitansinoides (EP 1391213; Liu y col., (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:8618-8623) y caliqueamicina (Lode y col. (1998) *Cancer Res.* 58:2928; Hinman y col., (1993) *Cancer Res.* 53:3336-3342). Las toxinas pueden producir sus efectos citotóxicos y citostáticos mediante mecanismos que incluyen la unión de tubulina, la unión de ADN o la inhibición de la topoisomerasa. Algunos fármacos citotóxicos tienden a ser inactivos o menos activos cuando se conjugan con grandes anticuerpos o ligandos receptores de proteínas.

ZEVALIN® (ibritumomab tiuxetan, Biogen/Idec) es un anticuerpo conjugado con un radioisótopo compuesto de un anticuerpo monoclonal kappa IgG1 murino dirigido contra el antígeno CD20 que se encuentra en la superficie de los linfocitos B cancerígenos y normales, y contra el radioisótopo ^{111}In o ^{90}Y unido por un quelante enlazador de tiourea (Wiseman y col., (2000) *Eur. Jour. Nucl. Med.* 27(7):766-77; Wiseman y col., (2002) *Blood* 99(12):4336-42; Witzig y col., (2002) *J. Clin. Oncol.* 20(10):2453-63; Witzig y col., (2002) *J. Clin. Oncol.* 20(15):3262-69). A pesar de que el ZEVALIN presenta actividad contra las células B del linfoma no Hodgkin (LNH), su administración provoca citopenias graves y prolongadas en la mayoría de los pacientes. MYLOTARG™ (Gentuzumab ozogamicina, Wyeth Pharmaceuticals), un conjugado de anticuerpos y fármacos compuesto de un anticuerpo huCD33 enlazado a caliqueamicina, se aprobó en

2000 para el tratamiento de leucemia mieloide aguda por inyección (*Drugs of the Future* (2000) 25(7): 686; Patentes de EE.UU. n.º 4970198; 5079233; 5585089; 5606040; 5693762; 5739116; 5767285; 5773001). Cantuzumab mertansina (Imugen, Inc.), un conjugado de un anticuerpo con fármacos compuesto por el anticuerpo huC242 enlazado a la fracción de fármacos de los maitansinoides por medio de un enlazador de disulfuro SPP, DM1, está bien avanzado en ensayos clínicos de Fase II para el tratamiento de cánceres que expresan CanAg, como los de colon, páncreas, gástricos y otros. MLN-2704 (Millennium Pharm., BZL Biologics, Immunogen Inc.), un anticuerpo conjugado con un fármaco, compuesto por el anticuerpo monoclonal del antígeno de membrana antiprostático (PSMA) enlazado al grupo de los maitansinoides, DM1, está en fase de desarrollo para el tratamiento potencial de los tumores de próstata. Los péptidos auriestatinos, la auristatina E (AE) y la monometilauristatina (MMAE), análogos sintéticos de la dolastatina, se conjugaron a anticuerpos monoclonales quiméricos cBR96 (específicos para Lewis Y en carcinomas) y cAC10 (específicos para CD30 en tumores hematológicos) (Doronina y col., (2003) *Nature Biotechnology* 21(7):778-784) y se encuentran en desarrollo terapéutico.

Los agentes quimioterapéuticos útiles en la generación de inmunoconjugados se describen en la presente memoria descriptiva. Las toxinas enzimáticamente activas y los fragmentos de las mismas que se pueden utilizar incluyen la cadena de difteria A, los fragmentos activos sin unión de la toxina de la difteria, la cadena de exotoxina A (de *Pseudomonas aeruginosa*), la cadena de ricina A, la cadena de abrina A, la cadena de modicina A, la alfa-sarcina, las proteínas de *Aleurites fordii*, las proteínas de diantina, las proteínas de *Phytolacca americana* (PAPI, PAPII y PAP-S), el inhibidor de la Momordica charantia, la curcina, la crotina, el inhibidor de la Saponaria officinalis, la gelonina, la mitogelina, la restrictocina, la fenomicina, la enomicina y el tricotecenos. Véase, por ejemplo, el documento WO 93/21232, publicado el 28 de octubre de 1993. Se dispone de diversos radionúclidos para la producción de anticuerpos radioconjugados. Entre los ejemplos se incluyen ^{212}Bi , ^{131}I , ^{131}In , ^{90}Y y ^{186}Re . Los conjugados del anticuerpo y el agente citotóxico se pueden realizar utilizando una variedad de agentes de unión a proteína bifuncionales, como por ejemplo N-succinimidil-3-(2-piridilditio) propionato (SPDP), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (como el dimetiladipimidato HCl), ésteres activos (por ejemplo, disuccinimidil suberato), aldehídos (por ejemplo, glutaraldehídos),

compuestos bis-azido (como bis (p-azidobenzoil) hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (como bis-(p-diazoniobenzoil)-etilenodiamina), diisocianatos (por ejemplo, 2,6-diisocianato de tolueno) y compuestos bis-activos de fluoruro (como 1,5-difluoruro-2,4-dinitrobenceno). Por ejemplo, una inmunotoxina de ricina puede prepararse como se describe en Vitetta y col., (1987) *Science*, 238:1098. El ácido triaminopentaacético 1-isotiocianatobencil-3-metildietileno marcado con carbono 14 (MX-DTPA) es un ejemplo de agente quelante para la conjugación de un radionucleótido a un anticuerpo (documento WO 94/11026).

También se contemplan en la presente memoria descriptiva los conjugados de un anticuerpo y una o más toxinas de molécula pequeña, como una calicheamicina, maitansinoides, dolastatinas, auristatinas, un tricoteceno y un CC1065, y los derivados de estas toxinas que tengan actividad tóxica.

Maitansina y maitansinoides

En algunas realizaciones, el inmunoconjugado comprende un anticuerpo de la invención (longitud completa o fragmentos) conjugado con una o más moléculas de maitansinoides.

Los maitansinoides son inhibidores mitóticos que actúan inhibiendo la polimerización de la tubulina. La maitansina se aisló por primera vez a partir del arbusto de África oriental *Maytenus serrata* (patente de EE.UU. N.º 3896111). Posteriormente, se descubrió que determinados microbios también producían maitansinoides, como el maitansinol y los ésteres de C-3 amitansinol (patente de EE.UU. N.º 4.151.042). El maitansinol sintético y sus derivados y análogos se describen, por ejemplo, en las patentes de EE.UU. N.º 4.137.230; 4.248.870; 4.256.746; 4.260.608; 4.265.814; 4.294.757; 4.307.016; 4.308.268; 4.308.269; 4.309.428; 4.313.946; 4.315.929; 4.317.821; 4.322.348; 4.331.598; 4.361.650; 4.364.866; 4.424.219; 4.450.254; 4.362.663 y 4.371.533.

Los grupos de fármacos maitansinoides son grupos de fármacos que resultan atractivos para la elaboración de anticuerpos conjugados con fármacos por sus siguientes características: (i) son relativamente accesibles en lo que se refiere a su preparación mediante fermentación, modificación química o derivación de productos de fermentación, (ii) son fáciles de someter a derivación, con grupos funcionales adecuados para conjugación a través de los enlazadores no disulfuro con anticuerpos, (iii) tienen estabilidad en plasma y (iv) resultan efectivos frente a distintas líneas celulares tumorales.

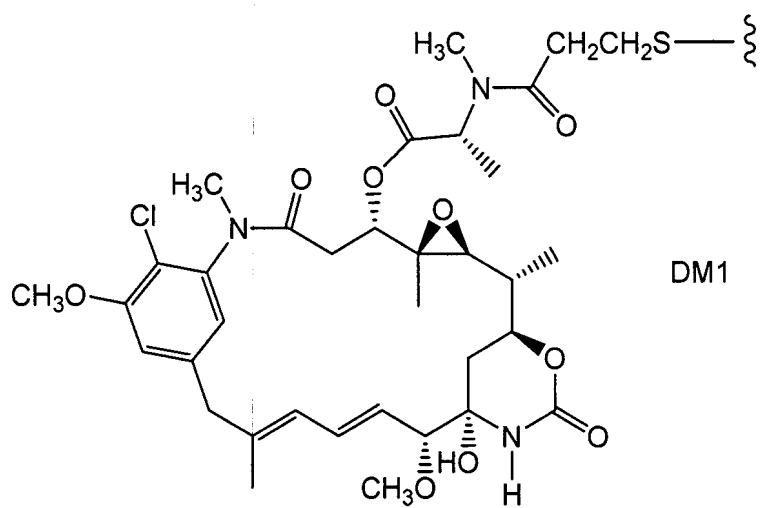
Los compuestos de maitansina aptos para uso como grupos de fármacos maitansinoides son bien conocidos en la materia y se pueden aislar de fuentes naturales según métodos conocidos o se pueden producir mediante técnicas de ingeniería genética (véase Yu y col., (2002) *PNAS* 99:7968-7973), o utilizando maitansinol y sus análogos preparados de forma sintética mediante métodos conocidos.

Entre los grupos ejemplares de fármacos maitansinoides están los que tienen un anillo aromático modificado, como por ejemplo: C-19-dicloro (patente de EE.UU. N.º 4256746) (preparado por reducción de ansamitocina P2 mediante hidruro de litio-aluminio); C-20-hidroxi (o C-20-dimetil) +/-C-19-dicloro (patentes de EE.UU. N.º 4361650 y 4307016) (preparado mediante desmetilación utilizando *Streptomyces* o *Actinomyces* o decoloración con LAH); y C-20-dimetoxi, C-20-aciloxi (-OCOR), +/-dicloro (patente de EE.UU. N.º 4.294.757) (preparado mediante acilación usando cloruros de acilo) y aquellos que tienen modificaciones en otras posiciones.

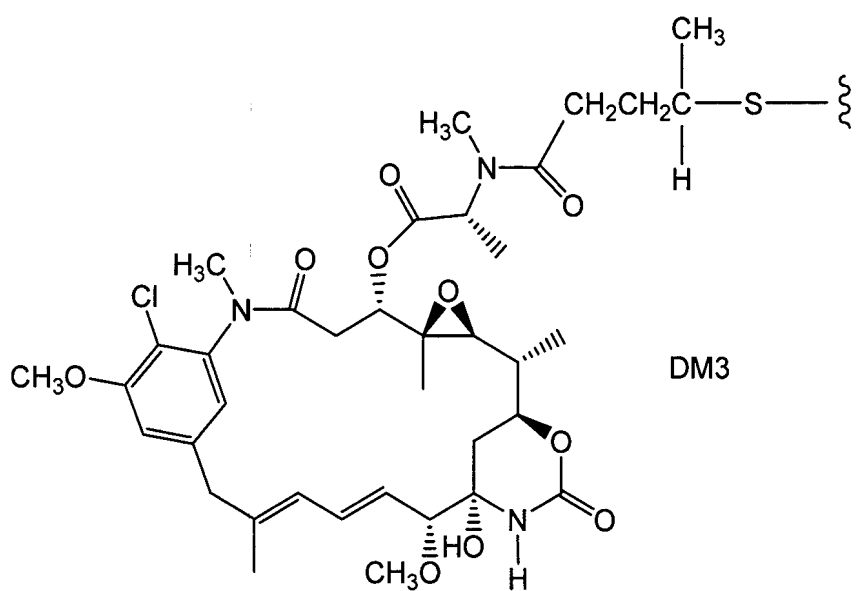
Entre los grupos ejemplares de fármacos maitansinoides también están los que tienen modificaciones como por ejemplo: C-9-SH (patente de EE.UU. N.º 4424219) (preparado mediante reacción de maitansinol con H_2S o P_2S_5); C-14-alcoximetil(dimetoxi/ CH_2OR)(patente de EE.UU. N.º 4331598); C-14-hidroximetil o aciloximetil (CH_2OH o CH_2OAc) (patente de EE.UU. N.º 4450254) (preparado a partir de *Nocardia*); C-15-hidroxi/aciloxi (patente de EE.UU. N.º 4364866) (preparado mediante la conversión de maitansinol por *Streptomyces*); C-15-metoxi (patentes de EE.UU. N.º 4313946 y 4315929) (aislado a partir de *Trewia nudiflora*); C-18-N-dimetil (patentes de EE.UU. N.º 4362663 y 4322348) (preparado por desmetilación de maitansinol por *Streptomyces*); y 4,5-deoxi (patentes de EE.UU. N.º 4371533) (preparado por la reducción de maitansinol mediante tricloruro de titanio/LAH).

A continuación se citan algunos ejemplos de formas de realización ejemplares de grupos de fármacos maitansinoides: DM1; DM3; y DM4, con las estructuras:

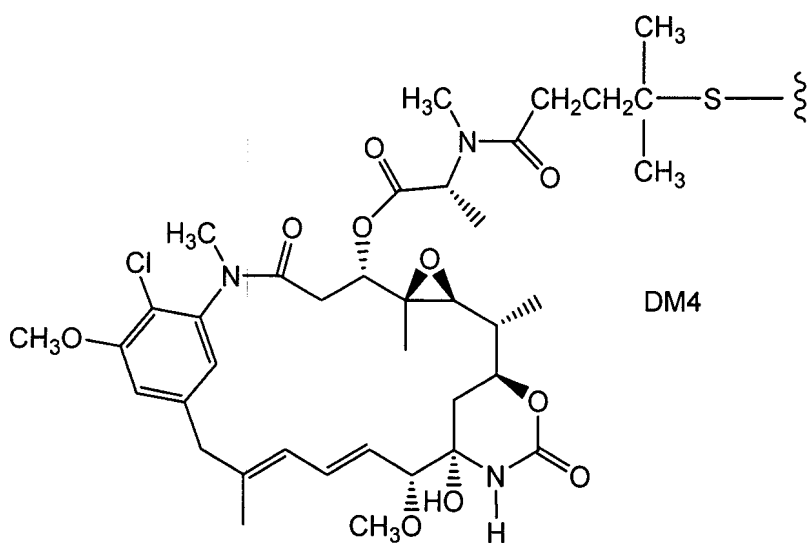
30



DM1



DM3



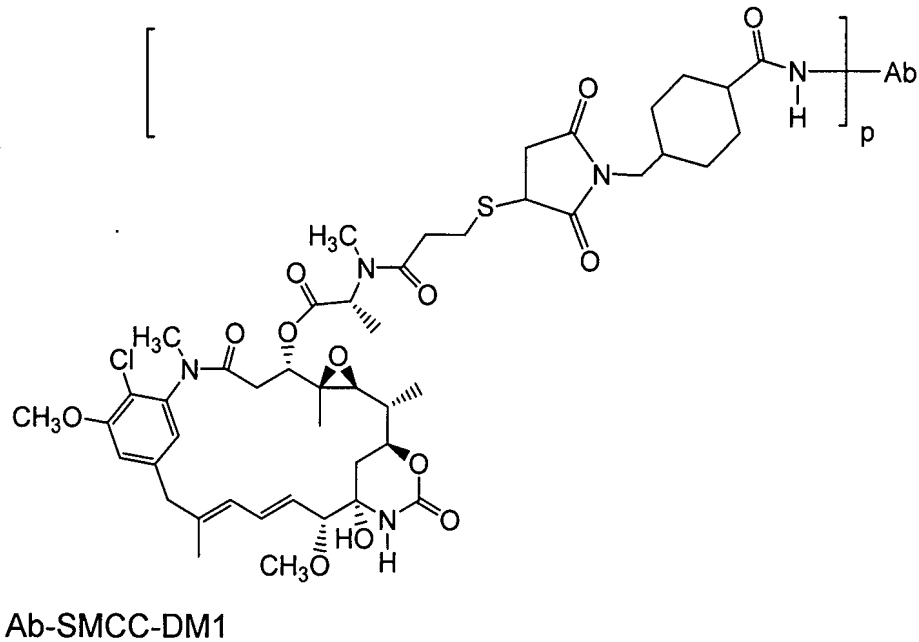
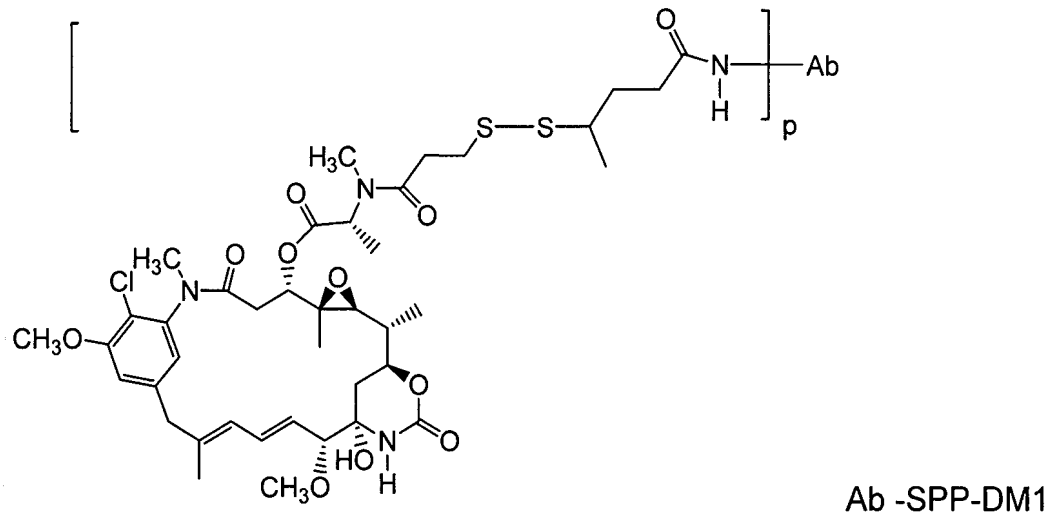
DM4

donde la línea ondulada indica el enlace covalente del átomo de sulfuro del fármaco a un enlazador (L) de un conjugado de anticuerpo con fármaco. Se ha informado sobre el HERCEPTIN® (trastuzumab, anticuerpo anti-HER2) enlazado por SMCC a DM (documento WO 2005/037992, que se incorpora en la presente

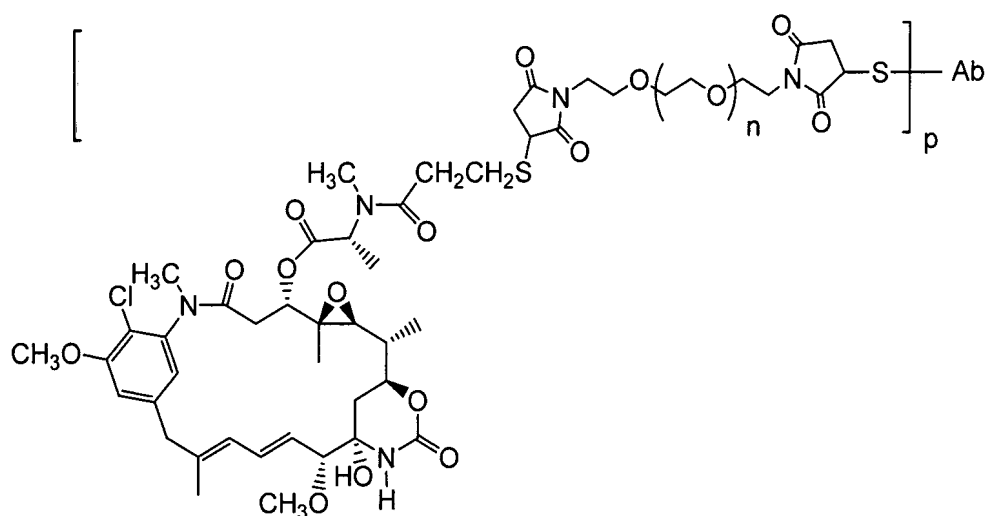


memoria descriptiva a modo de referencia). Un conjugado de anticuerpo con fármacos de la presente invención se puede preparar de acuerdo con los procedimientos divulgados en esta memoria descriptiva.

Otros conjugados ejemplares de anticuerpo con fármacos maitansinoides tienen las siguientes estructuras y abreviaturas (donde Ab es el anticuerpo y p es 1 a aproximadamente 8):



Los conjugados ejemplares de un anticuerpo con fármacos donde DM1 se enlaza a través de un enlazador BMPEO a un grupo tiol del anticuerpo tienen la estructura y abreviatura:



donde Ab es el anticuerpo; n es 0, 1 ó 2; y p es 1, 2, 3 ó 4.

Los inmunoconjugados que contienen maitansinoides, los métodos para elaborarlos y su uso terapéutico se describen, por ejemplo, en las patentes de EE.UU N.º 5.208.020 y 5.416.064, 6.441.163 y en la patente Europea EP 0 425 235 B1, y los descubrimientos de las mismas se incorporan expresamente a la presente memoria descriptiva a modo de referencia. Liu y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:8618-8623 (1996) describe los inmunoconjugados que comprenden un maitansinoide denominado DM1 enlazado al anticuerpo monoclonal C242 dirigido contra el cáncer colorrectal humano. Se descubrió que el conjugado era altamente citotóxico para las células del cáncer de colon en cultivo y demostró actividad antitumoral en ensayos de crecimiento tumoral *in vivo*. Chari y col., *Cancer Research* 52:127-131 (1992) describen inmunoconjugados en los que un maitansinoide se conjugaba por medio de un enlazado de disulfuro al anticuerpo murino A7 que se une a un antígeno en las líneas celulares de cáncer de colon humanas, o a otro anticuerpo monoclonal murino TA.1 que se une al oncogen HER-2/neu. La citotoxicidad del conjugado TA.1-maitansinoide se probó *in vitro* en la línea celular de cáncer de mama SK-BR-3, que expresa 3×10^5 antígenos de superficie HER-2 por célula. El conjugado de fármaco consiguió un alto grado de citotoxicidad similar al fármaco maitansinoide libre, que podría ser mayor si se aumentase el número de moléculas maitansinoides por cada molécula de anticuerpo. El conjugado A7-maitansinoide mostró una citotoxicidad sistémica baja en ratones.

Los conjugados de un anticuerpo con un maitansinoide anti-CD22 se preparan mediante enlace químico de un anticuerpo a una molécula de maitansinoide sin hacer que disminuya significativamente la actividad biológica de ambos elementos del conjugado. Véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. N.º

41

5.208.020 (cuyos descubrimientos se incorporan expresamente a la presente memoria descriptiva a modo de referencia). Una media de 3-4 moléculas maitansinoides conjugadas por anticuerpo ha mostrado eficacia en la mejora de la citotoxicidad de las células diana sin afectar negativamente a la función o la solubilidad del anticuerpo, aunque cabría esperar incluso que una molécula toxina/anticuerpo mejore la citotoxicidad en relación con el uso del anticuerpo desnudo. Los maitansinoides son bien conocidos en la materia y pueden sintetizarse mediante técnicas conocidas o aislarse de fuentes naturales. En la patente de EE.UU. N.º 5.208.020 y en otras patentes y publicaciones no patentadas a las que anteriormente se ha hecho referencia, por ejemplo, se describen maitansinoides adecuados. Los maitansinoides preferidos son el maitansinol y análogos modificados del maitansinol, en el anillo aromático o en otras posiciones de la molécula de maitansinol, como distintos ésteres del maitansinol.

Se conocen muchos grupos de enlace en la materia para producir conjugados de anticuerpos con maitansinoides, incluidos, por ejemplo, los descritos en las patentes de EE.UU. N.º 5208020, 6441163 o patente europea 0 425 235 B1, Chari y col., *Cancer Research* 52:127-131 (1992), y de la patente de EE.UU. N.º 2005/0169933 A1, y lo descrito en los mismos se incorpora expresamente en la presente memoria descriptiva a modo de referencia. Los conjugados de anticuerpos con maitansinoide que incluyen el componente enlazador SMCC pueden prepararse como se indica en la solicitud de patente de EE.UU. N.º 11/141344, presentada el 31 de mayo de 2005, "*Antibody Drug Conjugates and Methods*". Los grupos enlazadores comprenden grupos disulfuro, grupos de tioéteres, grupos lábiles al ácido, grupos fotolábiles, grupos lábiles a la peptidasa o grupos lábiles a la esterasa, como se revela en las patentes mencionadas anteriormente. En la presente memoria descriptiva se dan ejemplos y se describen grupos enlazadores adicionales.

Los conjugados del anticuerpo y el maitansinoide se pueden realizar utilizando una variedad de agentes de unión a proteína bifuncionales, como por ejemplo N-succinimidil-3-(2-piridilditio) propionato (SPDP), succinimidil-4-(N-maleimidometil) ciclohexano-1-carboxilato (SMCC), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (como el dimetiladipimidato HCl), ésteres activos (por ejemplo, disuccinimidil suberato), aldehídos (por ejemplo, glutaraldehídos), compuestos bis-azido (como bis (p-azidobenzoil) hexanodiamina), derivados de

42

bis-diazonio (como bis-(p-diazoniobenzoil)-etilenodiamina), diisocianatos (por ejemplo, 2,6-diisocianato de tolueno) y compuestos bis-activos de fluoruro (como 1,5-difluoruro-2,4-dinitrobenceno). Los agentes de unión que se prefieren sobre todo son N-sucinimidil-3-(2-piridilditio)propionato (SPDP) (Carlsson et al., *Biochem. J.* 173:723-737 [1978]) y N-sucinimidil-4-(2-piridilditio)pentanoato (SPP) para proporcionar un enlace de disulfido.

El enlazador se puede unir a la molécula de maitansinoide en varias posiciones, dependiendo del tipo de enlace. Por ejemplo, un enlace con éster se puede formar mediante reacción con un grupo hidroxilo que utilice técnicas de unión convencionales. La reacción puede producirse en la posición C-3 que tiene un grupo hidroxilo, la posición C-14 modificada con hidroximetilo, la posición C-15 modificada con un grupo hidroxilo y la posición C-20 que tiene un grupo hidroxilo. En una forma de realización preferente, el enlace se forma en la posición C-3 del maitansinol o un análogo del maitansinol.

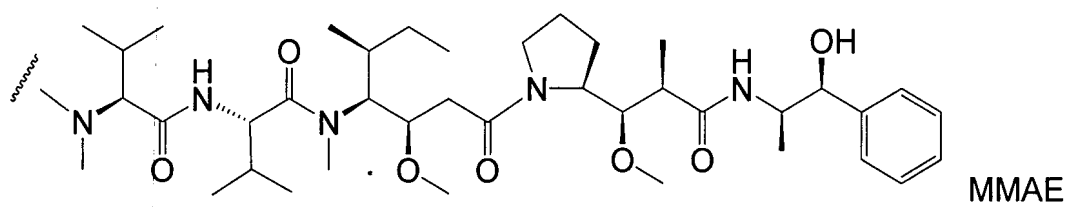
En una forma de realización, cualquiera de los anticuerpos de la invención (longitud completa o fragmentos) se conjuga con una o más moléculas de maitansinoides. En una forma de realización del inmunoconjugado, el agente citotóxico D es un maitansinoide DM 1. En una forma de realización del inmunoconjugado, el enlazador es SMCC. En una forma de realización, el conjugado fármaco-enlazador-anticuerpo es un anticuerpo anti-CD22 como se describe en la presente memoria descriptiva, al cuál está unido covalentemente a un agente citotóxico DM1 a través del enlazador SMCC.

Auristatinas y dolostatinas

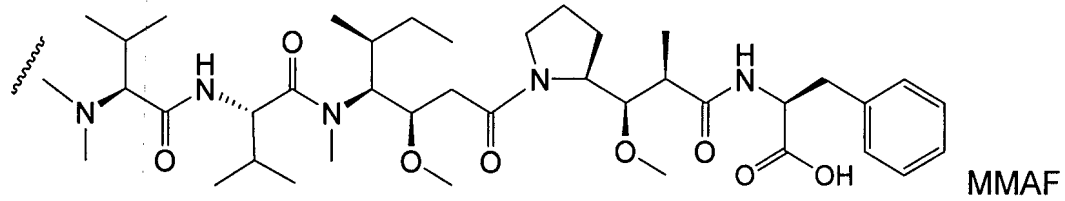
En algunas formas de realización, el inmunoconjugado comprende un anticuerpo de la invención conjugado con dolastatinas o análogos peptídicos a la dolastatina y derivados, las auristatinas (patentes de EE.UU. N.º 5635483; 5780588). Se ha establecido que las dolastatinas y las auristatinas interfieren con la dinámica de microtúbulos, la hidrólisis GTP y la división nuclear y celular (Woyke y col., (2001) *Antimicrob. Agents and Chemother.* 45(12):3580-3584) y tienen actividad anticancerígena (patente de EE.UU. N.º 5663149) y antifúngica (Pettit y col., (1998) *Antimicrob. Agents Chemother.* 42:2961-2965). La fracción del fármaco auristatina o dolastatina puede estar unida al anticuerpo a través de los extremos terminales N (amino) o C (carboxil) de la fracción péptido del fármaco (documento WO 02/088172).

Entre las formas de realización ejemplares de auristatina están los grupos de fármacos DE y DF de monometilauristatina enlazados al extremo N-terminal, descritas en Senter y col., *Proceedings of the American Association for Cancer Research*, Volumen 45, Abstract Number 623, presentada el 28 de marzo de 2004, cuyo contenido se incorpora expresamente en su totalidad a modo de referencia.

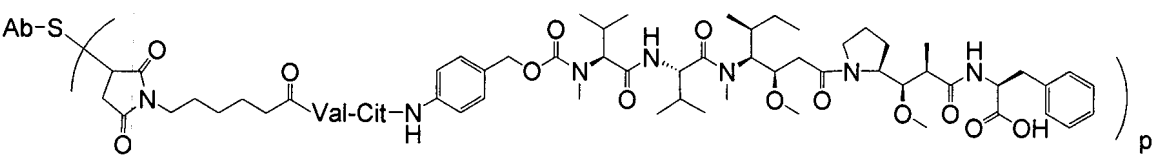
Una forma ejemplar de realización de auristatina es MMAE (donde la línea ondulada indica el enlace covalente a un enlazador (L) de un conjugado de anticuerpo con fármaco).



Otra forma ejemplar de realización de auristatina es MMAF, donde la línea ondulada indica el enlace covalente a un enlazador (L) de un conjugado de anticuerpo con fármaco (patente de EE.UU. N.º 2005/0238649):

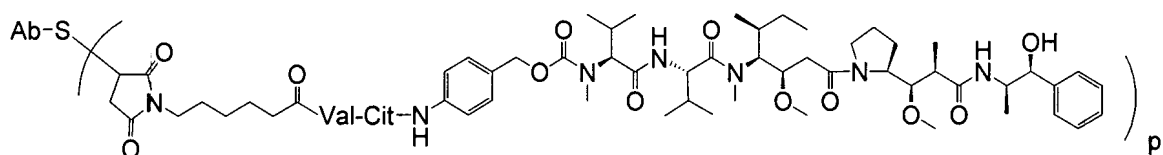


Otros ejemplos de realizaciones ejemplares que comprenden MMAE o MMAF y varios componentes enlazadores (descritos en la presente memoria en mayor detalle) tienen las siguientes estructuras y abreviaturas (donde Ab significa anticuerpo y p es 1 a aproximadamente 8):

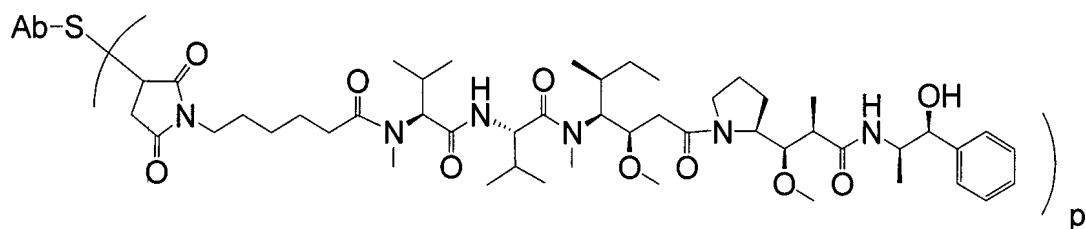


Ab-MC-vc-PAB-MMAF

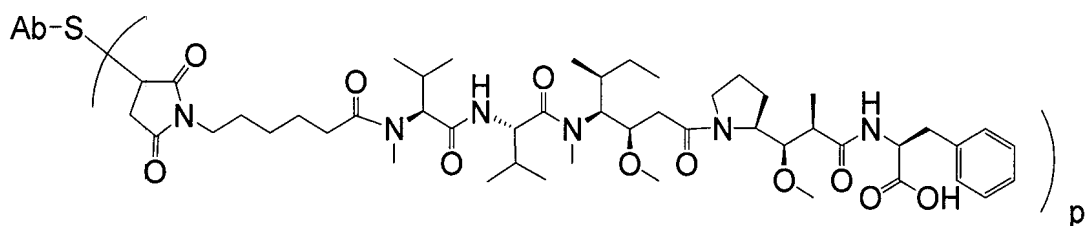
44



Ab-MC-vc-PAB-MMAE



Ab-MC-MMAE



Ab-MC-MMAF

Por lo general, los grupos de fármacos basados en péptidos pueden prepararse formando un enlace peptídico entre dos o más aminoácidos y/o fragmentos de péptidos. Estos enlaces peptídicos pueden prepararse, por ejemplo, de acuerdo con el método de síntesis de fase líquida (véase E. Schröder y K. Lübke, *"The Peptides"*, volumen 1, págs. 76-136, 1965, Academic Press) que es bien conocido en el campo de la química de péptidos. Los grupos de fármacos auristatina/dolastatina pueden prepararse de acuerdo con los siguientes métodos: patente de EE.UU. N.º 5635483; patente de EE.UU. N.º 5780588; Pettit y col., (1989) *J. Am. Chem. Soc.* 111:5463-5465; Pettit y col., (1998) *Anti-cancer Drug Design* 13:243-277; Pettit, G.R., y col., *Synthesis*, 1996, 719-725; Pettit y col., (1996) *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* 5:859-863; y Doronina (2003) *Nat. Biotechnol.* 21(7):778-784.

Caliqueamicina

En otras realizaciones, el inmunocombinado comprende un anticuerpo de la invención combinado con una o más moléculas de calicheamicina. La familia de antibióticos de la calicheamicina es capaz de producir la ruptura del ADN de hebra doble en concentraciones por debajo de picomolar. Para la preparación de combinados de la familia de la caliqueamicina, véanse las patentes de EE.UU. N.º

5.712.374, 5.714.586, 5.739.116, 5.767.285, 5.770.701, 5.770.710, 5.773.001 y 5.877.296 (todas para American Cyanamid Company). Entre análogos estructurales de la caliqueamicina que se pueden utilizar se incluyen, entre otros, γ_1^I , α_2^I , α_3^I , N-acetil- γ_1^I , PSAG y θ_1^I (Hinman y col., *Cancer Research* 53:3336-3342 (1993), Lode y col., *Cancer Research* 58:2925-2928 (1998) y las patentes de EE.UU. anteriormente mencionadas para American Cyanamid). Otro fármaco antitumoral con el que es posible conjugar el anticuerpo es QFA, que es un atifolato. Tanto la caliqueamicina como el QFA tienen puntos intracelulares de acción y no atraviesan fácilmente la membrana plasmática. Por ello, la absorción celular de estos agentes a través de la internalización mediada por el anticuerpo potencia enormemente sus efectos citotóxicos.

Otros agentes citotóxicos

Otros agentes antitumorales que se pueden conjugar con los anticuerpos de la invención incluyen BCNU, estreptozaicina, vincristina y 5-fluorouracilo, la familia de agentes conocidos colectivamente como complejo LL-E33288 descrito en las patentes de EE.UU. N.º 5.053.394, 5.770.710, así como las esperamicinas (patente de EE.UU. N.º 5.877.296).

Las toxinas enzimáticamente activas y los fragmentos de las mismas que se pueden utilizar incluyen cadena de difteria A, fragmentos activos sin unión de la toxina de la difteria, cadena de exotoxina A (de *Pseudomonas aeruginosa*), cadena de ricina A, cadena de abrina A, cadena de modecina A, alfa-sarcina, proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas de diantina, proteínas de *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII y PAP-S), inhibidor de la Momordica charantia, curcina, crotina, inhibidor de la Saponaria officinalis, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina y el tricotecenos. Véase, por ejemplo, el documento WO 93/21232 publicado el 28 de octubre de 1993.

Esta invención también contempla un inmunoconjugado formado entre un anticuerpo y un compuesto con actividad nucleolítica (por ejemplo, una ribonucleasa o una endonucleasa de ADN como por ejemplo la desoxirribonucleasa; ADNasa).

Para la destrucción selectiva del tumor, el anticuerpo puede comprender un átomo altamente radioactivo. Se dispone de una variedad de isótopos radiactivos para la producción de anticuerpos radioconjugados. Entre los ejemplos se incluyen At^{211} , I^{131} , I^{125} , Y^{90} , Re^{186} , Re^{188} , Sm^{153} , Bi^{212} , P^{32} , Pb^{212} e isótopos radiactivos de Lu. Cuando el conjugado se utiliza para la detección, puede

4

comprender un átomo radioactivo para gammagrafía, por ejemplo ^{99m}Tc o ^{123}I , o un marcador giratorio para resonancia magnética nuclear (RMN) (también conocida como diagnóstico por imágenes obtenidas mediante resonancia magnética), como yodo-123 nuevamente, yodo-131, indio-111, fluorina-19, carbono-13, nitrógeno-15, oxígeno-17, gadolinio, manganeso o hierro.

El radio u otros marcadores se pueden incorporar en el conjugado en formas conocidas. Por ejemplo, el péptido se puede biosintetizar o sintetizar mediante síntesis química de aminoácidos utilizando precursores adecuados de aminoácidos que contengan, por ejemplo, fluorina-19 en vez de hidrógeno. Los marcadores como ^{99m}Tc o ^{123}I , ^{186}Re , ^{188}Re e ^{111}In se pueden unir a través de un residuo de cisteína en el péptido. El itrio-90 se puede unir a través de un residuo de lisina. El método IODOGEN (Fraker y col., (1978) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 80: 49-57 se puede utilizar para incorporar yodo-123. "Monoclonal Antibodies in Immunoscintigraphy" (Chatal, CRC Press 1989) describe otros métodos detalladamente.

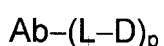
Los conjugados del anticuerpo y el agente citotóxico se pueden realizar utilizando una variedad de agentes de unión a proteína bifuncionales como por ejemplo N-succinimidil-3-(2-piridilditio) propionato (SPDP), succinimidil-4-(N-maleimidometil) ciclohexano-1-carboxilato (SMCC), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (como el dimetiladipimidato HCl), ésteres activos (por ejemplo, disuccinimidil suberato), aldehídos (por ejemplo, glutaraldehídos), compuestos bis-azido (como bis (p-azidobenzoil) hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (como bis-(p-diazoniobenzoil)-etilenodiamina), diisocianatos (por ejemplo, 2,6-diisocianato de tolueno) y compuestos bis-activos de fluoruro (como 1,5-difluoruro-2,4-dinitrobenceno). Por ejemplo, una inmunotoxina de ricina se puede preparar tal y como se describe en Vitetta y col., *Science*, 238:1098 (1987). El ácido triaminopentaacético 1-isotiocianatobencil-3-metildietileno marcado con carbono 14 (MX-DTPA) es un ejemplo de agente quelante para la conjugación de un radionucleótido a un anticuerpo. Véase el documento WO94/11026. El enlazador puede ser un "enlazador escindible" que facilita la liberación del fármaco citotóxico en la célula. Por ejemplo, se puede utilizar un enlazador lábil al ácido, un enlazador sensible a la peptidasa, un enlazador fotolábil, un enlazador de dimetilo o un enlazador que contenga disulfuri (Cari y col., *Cancer Research* 52:127-131, Patente de EE.UU. N.º 5.208.020).

X

Los compuestos de la invención contemplan expresamente, entre otros, el ADC preparado con reactivos reticulares: BMPS, EMCS, GMBS, HBVS, LC-SMCC, MBS, MPBH, SBAP, SIA, SIAB, SMCC, SMPB, SMPH, sulfo-EMCS, sulfo-GMBS, sulfo-KMUS, sulfo-MBS, sulfo-SIAB, sulfo-SMCC y sulfo-SMPB, y SVSB (sucinimidil-(4-vinilsulfona)benzoata) que se comercializan (por ejemplo, por Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL., EE.UU). Véanse las páginas 467-498, 2003-2004 *Applications Handbook and Catalog*.

Preparación de los conjugados de anticuerpos con fármacos:

En los conjugados de anticuerpos con fármacos (ADC) de la invención, un anticuerpo (Ab) se conjuga con uno o más grupos de fármacos (D), por ejemplo, grupos de fármacos de aproximadamente 1 a aproximadamente 20 por anticuerpo, a través de un enlazador (L). Los ADC de la formula I se pueden preparar por varios medios, empleando reacciones químicas orgánicas, condiciones y reactivos conocidos por los expertos, como: (1) una reacción de un grupo nucleofílico de un anticuerpo con un reactivo enlazador bivalente, para formar un Ab-L, mediante un enlace covalente, seguida de la reacción con una fracción de fármaco D; y (2) una reacción de un grupo nucleofílico de una fracción de fármaco con un reactivo enlazador bivalente, para formar D-L, mediante un enlace covalente, seguido de la reacción con el grupo nucleofílico del anticuerpo. En la presente memoria descriptiva se describen métodos adicionales para la preparación del ADC.



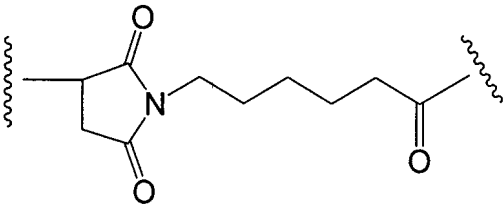
Fórmula I

El enlazador puede estar formado por uno o más componentes enlazadores. Los componentes de enlace ejemplares incluyen: 6-maleimidocaproilo ("MC"), maleimidopropanoilo ("MP"), valina-citrulina ("val-cit"), alanina-fenilalanina ("ala-phe"), p-aminobensiloxycarbonil ("PAB"), N-Succinimidil 4-(2-piridiltio) pentanoato ("SPP"), N-Succinimidil 4-(N-maleimidometil) ciclohexano-1 carboxilato ("SMCC"), y N-Succinimidil (4-yodo-acetil) aminobenzoato ("SIAB"). Los componentes enlazadores adicionales son conocidos en la materia y algunos se describen en la presente memoria descriptiva.

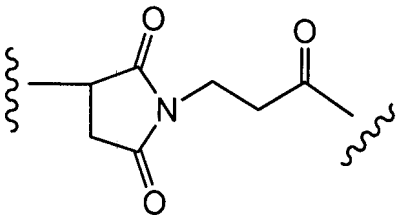
En ciertas formas de realización, el enlazador puede comprender residuos de aminoácidos. Los componentes enlazadores ejemplares de aminoácidos incluyen un dipéptido, un tripéptido, un tetrapéptido o un pentapéptido. Los dipéptidos ejemplares incluyen: valina-citrulina (vc o val-cit), alanina-fenilalanina

(af o ala-phe). Los tripéptidos ejemplares incluyen: glicina-valina-citrulina (gly-val-cit) y glicina-glicina-glicina (gly-gly-gly). Los residuos de aminoácidos que comprenden un componente enlazador de aminoácidos incluyen aquellos que se producen de forma natural, como así también los aminoácidos menores y los análogos de aminoácidos que no se producen de forma natural, como la citrulina. Los componentes enlazadores de aminoácidos pueden designarse y optimizarse en su selectividad para la escisión enzimática mediante una enzima específica, por ejemplo, una proteasa asociada a un tumor, catepsina B, C y D o una proteasa plasmina.

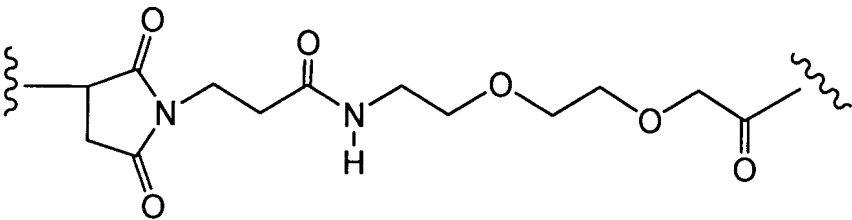
A continuación se muestran las estructuras ejemplares de los componentes enlazadores (donde la línea ondulada indica los sitios de enlace covalente a otros componentes del ADC)



MC

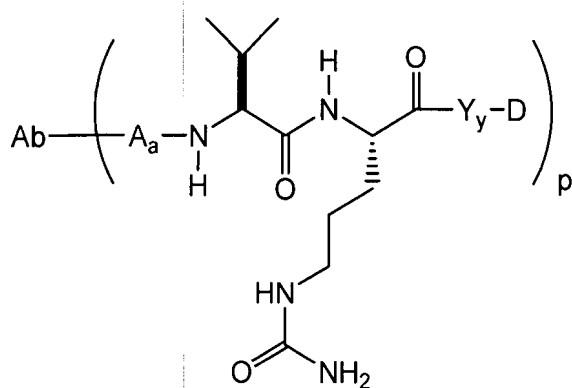


MP

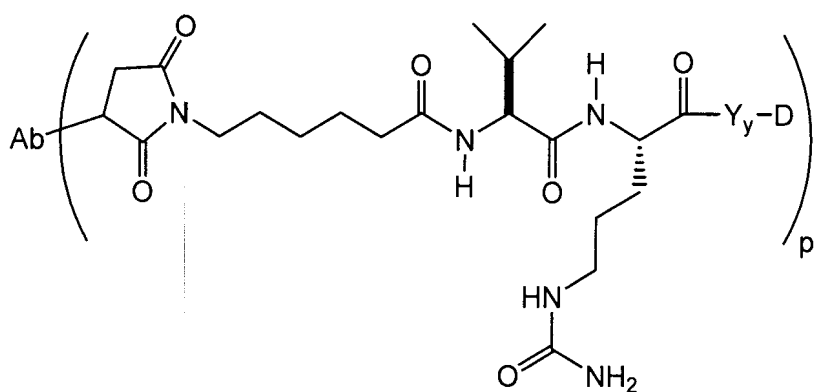


MPEG

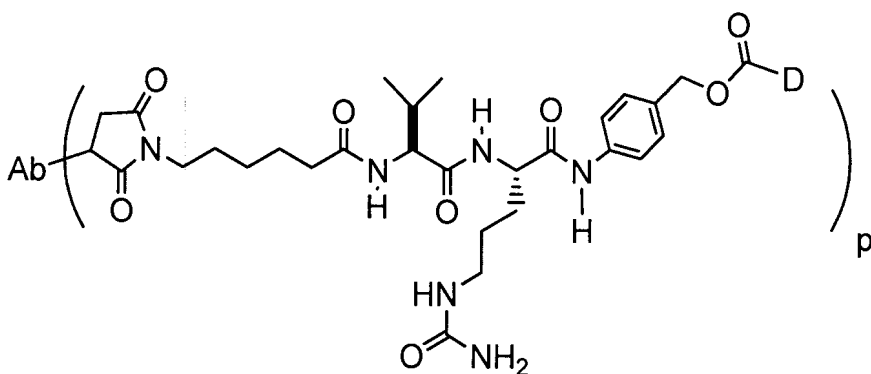
Los componentes enlazadores ejemplares adicionales y las abreviaciones incluyen (donde se muestra el anticuerpo (Ab) y el enlazador, y p es 1 a aproximadamente 8):



Val-cit



MC-val-cit



MC-val-cit-PAB

Los grupos nucleofílicos en los anticuerpos incluyen entre otros: (i) grupos amino N-terminal, (ii) grupos amino de la cadena lateral, por ejemplo lisina, (iii) grupos tiol de la cadena lateral, por ejemplo cisteína, y (iv) grupos amino o hidroxilo de azúcares donde el anticuerpo es glicosilado. Los grupos amino, tiol e hidroxilo son nucleofílicos y son capaces de reaccionar para formar uniones covalentes con grupos electrofílicos en las fracciones del enlazador y los reactivos enlazadores, que incluyen: (i) ésteres activos como los ésteres NHS, los ésteres HOBt, haloformos y haluro de ácido; (ii) haluros de alquilo y bencilo como las haloacetamidas; (iii) aldehídos, cetonas, carboxilo y grupos maleimidos. Ciertos anticuerpos contienen bisulfuros de intercadena reducible, es decir, puentes de cisteína. Los anticuerpos pueden convertirse en reactivos mediante conjugación

con reactivos enlazadores mediante el tratamiento con un agente reductor como el DTT (ditiotreitól). Por lo tanto, cada puente de cisteína formará, en teoría, dos nucleófilos tiol reactivos. Los grupos nucleofílicos adicionales pueden introducirse en los anticuerpos a través de la reacción de las lisinas con 2-iminotiolano (reactivo de Traut), lo que da lugar a la conversión de una amina en un tiol. Los grupos tiol reactivos pueden introducirse en un anticuerpo (o un fragmento del mismo) mediante la introducción de uno, dos, tres, cuatro o más residuos de cisteína (por ejemplo preparando anticuerpos mutantes que comprendan uno o más residuos de aminoácidos de cisteínas no nativas).

Los conjugados de anticuerpos con fármacos de la invención también pueden producirse mediante la modificación del anticuerpo para introducir fracciones electrofílicas, que pueden reaccionar con sustituyentes nucleofílicos en el reactivo enlazador o el fármaco. Las azúcares de los anticuerpos glicosilados pueden oxidarse, por ejemplo, con reactivos oxidantes de periodato, a fin de formar grupos cetonas o aldehídos, los cuales pueden reaccionar con el grupo amina de los reactivos enlazadores o las fracciones del fármaco. Los grupos resultantes de amina base de Schiff pueden formar un enlace estable, o pueden reducirse, por ejemplo, mediante los reactivos de hidruro de boro para formar enlaces amina estables. En una forma de realización, la reacción de la porción carbohidratada de un anticuerpo glicosilado, ya sea con galactosa oxidasa o con metaperiodato de sodio, puede producir grupos de carbonilo (aldehídos y cetonas) en la proteína que pueden reaccionar con los grupos apropiados en el fármaco ("*Bioconjugate Techniques*" de Hermanson). En otra forma de realización, las proteínas que contienen residuos de serina o treonina N-terminal pueden reaccionar con metaperiodato de sodio, lo que da lugar a la producción de un aldehído en lugar del primer aminoácido (Geoghegan y Stroh, (1992) *Bioconjugate Chem.* 3:138-146; patente de EE.UU. N.º 5362852). Se puede hacer que este aldehído reaccione con una fracción de fármaco o un nucleófilo enlazador.

Del mismo modo, los grupos nucleofílicos en una fracción del fármaco incluyen los siguientes compuestos: los grupos amino, tiol, hidroxilo, hidracida, oxima, hidracina, tiosemicarbazona, carboxilato de hidracina y aril-hidracida, capaces de reaccionar para formar enlaces covalentes con grupos electrofílicos en las fracciones enlazadoras y reactivos enlazadores, que incluyen: (i) ésteres activos como los ésteres NHS, los ésteres HOBt, haloformos y haluro de ácido; (ii)

haluros de alquilo y bencilo como las haloacetamidas; (iii) aldehídos, cetonas, carboxilo y grupos maleimidos.

En otro aspecto, el anticuerpo tiene uno o más residuos de lisina que pueden modificarse químicamente para introducir uno o más grupos sulfidrilos. La unidad del anticuerpo se enlaza a la unidad del enlazador mediante el átomo de sulfuro del grupo sulfidrilos. Entre los reactivos que pueden utilizarse para modificar las lisinas se encuentran, entre otros, N-succimidil S-acetiltioacetato (SATA) y clorhidrato de 2-iminotiolano (reactivo de Traut).

En otra forma de realización, el anticuerpo puede tener uno o más grupos carbohidratos que pueden modificarse químicamente para obtener uno o más grupos sulfidrilos. La unidad del anticuerpo se enlaza a la unidad del enlazador, como la unidad de extensión, mediante el átomo de sulfuro del grupo sulfidrilos, tal como se describe en la presente memoria descriptiva.

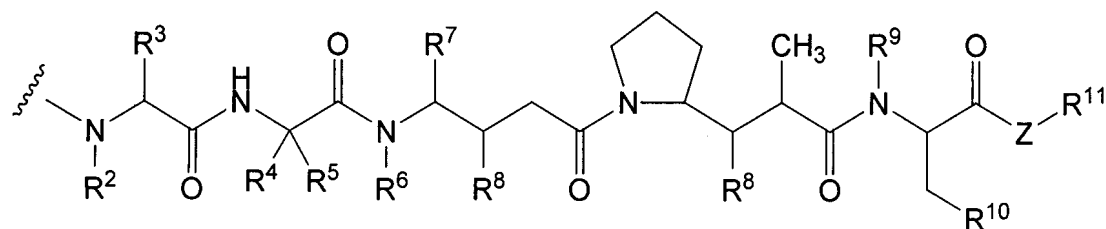
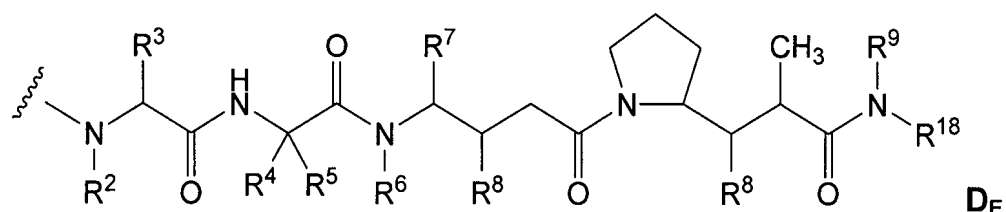
En otra forma de realización, el anticuerpo puede tener uno o más grupos carbohidratos que pueden oxidarse para proporcionar un grupo aldehído (-CHO) (véase, por ejemplo, Laguzza, y col., *J. Med. Chem.* 1989, 32(3), 548-55). El aldehído correspondiente puede formar una unión con un punto reactivo en una unidad de extensión. Entre los puntos reactivos en una unidad de extensión que pueden reaccionar con un grupo carbonilo en un anticuerpo se incluyen, entre otros, hidracina e hidroxilamina. Otros protocolos para la modificación de proteínas para el enlace o la asociación con unidades de fármacos se describen en Coligan y col., *Current Protocols in Protein Science*, vol. 2, John Wiley y Sons (2002), incorporados en la presente memoria descriptiva a modo de referencia.

Se encuentran métodos de conjugación de fracciones enlazador-fármaco a proteínas que actúan sobre las células, tales como los anticuerpos, la inmonoglobulina o los fragmentos de la misma en, por ejemplo, patente de EE.UU. N.º 5.208.020; patente de EE.UU. N.º 6.441.163; documentos WO2005037992, WO2005081711 y WO2006/034488, los cuales se incorporan expresamente en su totalidad a modo de referencia.

Alternativamente, es posible realizar una fusión de proteínas que contengan el anticuerpo y el agente citotóxico, por ejemplo mediante técnicas recombinantes o síntesis de péptidos. La longitud del ADN puede incluir regiones respectivas que codifiquen las dos porciones del conjugado, ya sea adyacentes entre sí o separados por una región que codifica un péptido de enlace, el cual no destruye las propiedades deseadas del conjugado.

En otra forma de realización, el anticuerpo puede conjugarse con un "receptor" (como la estreptavidina) y actuar previamente contra el tumor, donde se administra al paciente el conjugado de anticuerpo con receptor, luego se elimina de la circulación el conjugado no unido utilizando un agente de eliminación, y posteriormente se administra un "ligando" (por ejemplo, avidina) que se conjuga con un agente citotóxico (por ejemplo, un radionucleótico).

En una forma de realización del inmunoconjugado, el agente citotóxico, D, es una auristatina de fórmula D_E o D_F



D_F

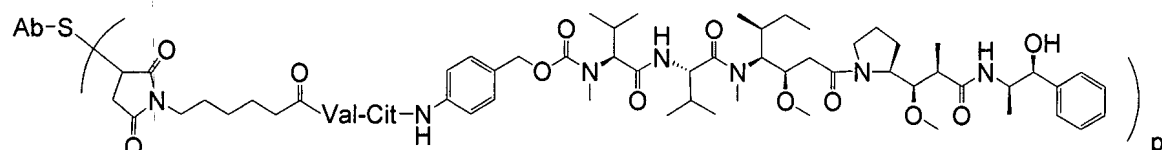
y donde R² y R⁶ son, cada uno, metilo; R³ y R⁴ son cada uno isopropilo; R⁷ es sec butilo, cada R⁸ se selecciona independientemente entre CH₃, O-CH₃, OH, y H; R⁹ es H; R¹⁰ es arilo; Z es -O- o -NH-; R¹¹ es H, C₁-C₈ alquilo o -(CH₂)₂-O-(CH₂)₂-O-(CH₂)₂-O-CH₃; y R¹⁸ es -C(R⁸)₂-C(R⁸)₂-arilo; y

(d) p oscila entre aproximadamente 1 y 8.

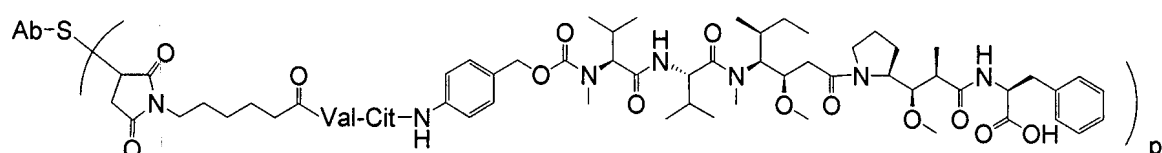
Se proporcionan también las siguientes formas de realización para cualquiera de los inmunoconjugados anteriores. En una forma de realización, un inmunoconjugado tiene actividad destructora de células *in vitro* o *in vivo*. En una forma de realización, el enlazador se une al anticuerpo a través de un grupo tiol en el anticuerpo. En una forma de realización, el enlazador es escindible mediante una proteasa. En una forma de realización, el enlazador comprende un dipéptido val-cit. En una forma de realización, el enlazador comprende una unidad p-aminobenzilo. En una forma de realización, la unidad p-aminobenzilo está situada entre el fármaco y un sitio de escisión de la proteasa en el enlazador. En una forma de realización, la unidad p-aminobenzilo es un p-aminobenziloxicarbonilo (PAB). En una forma de realización, el enlazador comprende 6-maleimidocaproilo. En una forma de realización, 6-maleimidocaproilo está situado

entre el anticuerpo y un sitio de escisión de la proteasa en el enlazador. Las formas de realización anteriores pueden darse por separado o combinadas entre sí.

En una forma de realización, el fármaco se selecciona entre MMAE y MMAF. En una forma de realización, el inmunoconjugado tiene la fórmula



donde Ab es cualquiera de los anticuerpos anti-CD22 anteriores, S es un átomo de sulfuro y p oscila entre 2 y 5. En una forma de realización, el inmunoconjugado tiene la fórmula



donde Ab es cualquiera de los anticuerpos anti-CD22 anteriores, S es un átomo de sulfuro y p oscila entre aproximadamente 1 y aproximadamente 6, entre aproximadamente 2 y aproximadamente 5, entre aproximadamente 2 y aproximadamente 6, entre aproximadamente 2 y aproximadamente 4, entre aproximadamente 2 y aproximadamente 3, entre aproximadamente 3 y aproximadamente 4, entre aproximadamente 3 y aproximadamente 5, entre aproximadamente 3 y aproximadamente 6, entre aproximadamente 4 y aproximadamente 6.

Métodos de diagnóstico por imágenes del anticuerpo marcado:

En otra forma de realización de la invención, los anticuerpos diseñados con cisteína pueden marcarse mediante tior de cisteína con radionucleidos, tintes fluorescentes, grupos de sustratos activadores de la bioluminiscencia, grupos de sustratos activadores de la quimioluminiscencia, enzimas y otros marcadores de detección para experimentos con imágenes con aplicaciones de diagnóstico, farmacodinámica y terapéuticas. Generalmente, el anticuerpo diseñado con cisteína marcado, es decir, “biomarcador” o “sonda”, se administra por inyección, perfusión o ingesta oral a un organismo vivo, por ejemplo, un ser humano, un roedor u otro animal pequeño, un órgano perfundido o una muestra de tejido. La distribución de la sonda se detecta durante un período de tiempo y se representa mediante una imagen.

Artículos de fabricación:

En otra forma de realización de la invención, se proporcionan artículos fabricados o "kit" que contienen materiales útiles para el tratamiento de los trastornos descritos anteriormente. El elemento de fabricación comprende un envase y una etiqueta o prospecto en el envase o asociado a él. Entre los envases adecuados se encuentran, por ejemplo, botes, viales, jeringas, ampollas, etc. Los envases pueden estar hechos de diversos materiales, como vidrio o plástico. El envase contiene una composición de conjugado de anticuerpo con fármaco (ADC) que es eficaz en el tratamiento de la enfermedad y puede tener un puerto de acceso estéril (por ejemplo, el envase puede ser una bolsa para solución intravenosa o un vial con un tapón perforable por una aguja hipodérmica). Al menos un agente activo de la composición es un conjugado de anticuerpo con fármaco. La etiqueta o prospecto indica que la composición se utiliza para el tratamiento de la afección concreta, tal como el cáncer. De modo alternativo o adicional, el elemento de fabricación puede comprender un segundo (o tercer) envase que contiene una solución farmacéuticamente aceptable, como agua bacteriostática para inyección (BWFI), una solución salina fosfatada, una solución de Ringer y una solución de dextrosa. También puede incluir otros materiales deseables desde el punto de vista comercial y del usuario, incluidas otras soluciones, diluyentes, filtros, agujas y jeringas.

Composiciones farmacéuticas:

En un aspecto, se proporciona una composición farmacéutica que comprende cualquiera de los inmunoconjugados anteriores y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En un aspecto, se proporciona un método para el tratamiento de un trastorno proliferativo de la células B, en el cual dicho método comprende la administración a un sujeto de la composición farmacéutica. En una forma de realización, el trastorno proliferativo de células B se selecciona a partir de los linfoma, linfoma no Hodgkins (LNH), LNH agresivo, LNH agresivo recurrente, LNH indolente recurrente, LNH refractario, LNH indolente refractario, leucemia linfocítica crónica (LLC), linfoma linfocítico de células pequeñas, leucemia, leucemia de células pilosas (LCP), leucemia linfocítica aguda (LLA) y linfoma de células del manto. En una forma de realización, el trastorno de proliferación celular se asocia a un aumento de la expresión de CD22 en la superficie de una célula.

En un aspecto, se proporciona un método para inhibir la proliferación celular, en el cual dicho método comprende la exposición de una célula a cualquiera de los inmunos conjugados anteriores en condiciones que favorezcan la unión del inmunos conjugado a CD22. En una forma de realización, la célula B es una célula tumoral. En una forma de realización, la célula tumoral es una célula B de un mamífero que experimenta o se cree que experimenta el trastorno proliferativo de células B seleccionada a partir de los linfoma, linfoma no Hodgkins (LNH), LNH agresivo, LNH agresivo recurrente, LNH indolente recurrente, LNH refractario, LNH indolente refractario, leucemia linfocítica crónica (LLC), linfoma linfocítico de células pequeñas, leucemia, leucemia de células pilosas (LCP), leucemia linfocítica aguda (LLA) y linfoma de células del manto. La célula es un xenotrasplante. En una forma de realización, la exposición se produce *in vitro*. En una forma de realización, la exposición se produce *in vivo*.

En un aspecto, se proporciona un método de utilización del anticuerpo anti-CD22 para efectuar un ensayo de suero soluble CD22 en un mamífero que experimenta leucemia o un linfoma para diagnosticar leucemia de las células B o linfoma de las células B, midiendo la progresión clínica o la regresión de las enfermedades, o evaluando la carga o recurrencia del tumor. Estos métodos se describen en la patente de EE.UU. N.º 20050244828 (Kreitman, R.J. y col., la totalidad de los contenidos de éste se incorporan en la presente memoria descriptiva a modo de referencia) utilizando un conjugado de anticuerpo PE38 anti-CD22 RFB4 (fragmento 38 de exotoxina A de *Pseudomonas*) con toxina (véase R.J. y col., NEJM 345:241-247 (2001)).

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figuras de 1A a 1D: La **Figura 1A** es un diagrama de CD22 que indica los siete dominios de tipo inmunoglobulina del dominio extracelular de la isoforma beta. La isoforma alfa carece de los dominios 3 y 4. "TM" se refiere al dominio transmembrana. La **Figura 1B** describe la secuencia de aminoácidos de la forma beta de CD22 (identificador de secuencia n.º: 27). La forma alfa de CD22 carece de los aminoácidos que se muestran en letra cursiva (que codifican los dominios 3 y 4 del dominio extracelular). El dominio extracelular de la forma madura de la proteína se muestra subrayado (identificador de secuencia n.º: 28). Los aminoácidos del 1 al 21 describen la secuencia de señal escindida de la forma madura. La **Figura 1C** constituye la secuencia de aminoácidos de CD22 alfa (identificador de secuencia n.º: 29). El dominio extracelular (ECD) de CD22 alfa

se muestra subrayado (identificador de secuencia n.º: 30). La **Figura 1D** constituye la secuencia de aminoácidos de CD22 del mono cinomolgus (identificador de secuencia n.º 31). Los primeros 19 aminoácidos de CD22 de mono cinomolgus es la secuencia de señal.

Figuras 2A y 2B: La **Figura 2A** describe la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo anti-CD22 10F4 murino de la invención (m10F4) que se alinea con el anticuerpo 1 de la versión 10F4 humanizado (h10F4v1) y con la secuencia del subgrupo humano III. Las regiones hipervariables (HVR) se muestran en un recuadro (HVR-H1, HVR-H2, HVR-H3). Las secuencias que agrupan las HVR corresponden a las secuencias de estructuras (de FR-H1 a FR-H4). Las secuencias se enumeran de acuerdo con la numeración de Kabat. Las CDR de Kabat, Chothia y de contacto se indican en las HVR recuadradas. La **Figura 2B** describe la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera del anticuerpo anti-CD22 10F4 murino de la invención (m10F4) que se alinea con el anticuerpo 1 de la versión 10F4 humanizado (h10F4v1) y con la secuencia kappa humana I. Las versiones 2 y 3 del anticuerpo 10F4 humanizado (h10F4v2 y h10F4v3) tienen la misma secuencia de aminoácidos para la forma madura secretada. Los anticuerpos h10F4v2 y h10F4v3 difieren del h10F4v1 en el aminoácido 28 de la HVR-L1 (N28V). Las HVR se muestran en recuadros. Las secuencias FR-L1, FR-L2, FR-L3 y FR-L4 agrupan las HVR (HVR-L1, HVR-L2, HVR-L3). Las secuencias se enumeran de acuerdo con la numeración de Kabat. Las CDR de Kabat, Chothia y de contacto se indican en las HVR recuadradas.

Las **Figuras 3A y 3B** muestran secuencias de estructuras de consenso humanas pesadas variables (VH) del aceptor ejemplares para utilizar en la práctica de la invención con identificadores de secuencia tal como se indica a continuación, donde los números de identificadores de secuencia de estructuras se enumeran en el orden de FR-H1, FR-H2, FR-H3, FR-H4:

- estructura "A" de consenso del subgrupo I humano de VH menos las CDR de Kabat (identificadores de secuencia n.º: 26, 47, 48, 7).

- estructuras "B", "C" y "D" de consenso del subgrupo I humano de VH menos las regiones hipervariables extendidas (identificadores de secuencia n.º: 50, 51, 52, 7; identificadores de secuencia n.º: 50, 51, 52, 7; e identificadores de secuencia n.º: 50, 51, 53, 7).

57

- estructura "A" de consenso del subgrupo II humano de VH menos las CDR de Kabat (identificadores de secuencia n.º: 54, 55, 56, 7).

- estructuras "B", "C" y "D" de consenso del subgrupo II humano de VH menos las regiones hipervariables extendidas (identificadores de secuencia n.º: 57, 58, 56, 7; identificadores de secuencia n.º: 57, 58, 59, 7; e identificadores de secuencia n.º: 57, 58, 60, 7).

- estructura "A" de consenso del subgrupo III humano de VH menos las CDR de Kabat (identificadores de secuencia n.º: 61, 62, 63, 7).

- estructuras "B", "C" y "D" de consenso del subgrupo III humano de VH menos las regiones hipervariables extendidas (identificadores de secuencia n.º: 64, 65, 63, 7; identificadores de secuencia n.º: 64, 65, 66, 7; e identificadores de secuencia n.º: 64, 65, 67, 7).

- estructura "A" del aceptor 1 humano de VH menos las CDR de Kabat (identificadores de secuencia n.º: 68, 62, 69, 7).

- estructuras "B" y "C" del aceptor humano de VH menos las regiones hipervariables extendidas (identificadores de secuencia n.º: 64, 65, 69, 7; e identificadores de secuencia n.º: 64, 65, 70, 7).

- estructura "A" del aceptor 2 humano de VH menos las CDR de Kabat (identificadores de secuencia n.º: 68, 62, 71, 7).

- estructuras "B", "C" y "D" del aceptor 2 humano de VH menos las regiones hipervariables extendidas (identificadores de secuencia n.º: 64, 65, 71, 7; identificadores de secuencia n.º: 64, 65, 72, 7; e identificadores de secuencia n.º: 64, 65, 73, 7).

Las **Figuras 4A y 4B** muestran secuencias de estructuras de consenso humanas ligeras variables (VL) del aceptor ejemplares para utilizar en la práctica de la invención con identificadores de secuencia tal como se indica a continuación:

- estructura de consenso del subgrupo I-1 kappa humano VL (κ v1-1): identificadores de secuencia n.º: 74, 75, 76, 77

- estructura de consenso del subgrupo I kappa humano de VL (κ v1): identificadores de secuencia n.º: 74, 78, 76, 77

- estructura de consenso del subgrupo II kappa humano de VL (κ v2): identificadores de secuencia n.º: 49, 79, 80, 77

- estructura de consenso del subgrupo III kappa humano de VL (κ v3): identificadores de secuencia n.º: 81, 82, 83, 77

9

- estructura de consenso del subgrupo IV kappa humano de VL (kv4):
identificadores de secuencia n.º: 84, 85, 86, 77

Figuras 5A y 5B: La **Figura 5A** representa las alineaciones de las secuencias de la región Fc de IgG humana de secuencia nativa, humIgG1 (alotipos no A, identificador de secuencia n.º: 38; y alotipos A, donde la secuencia de aminoácidos SREEM en el identificador de secuencia n.º: 38 cambia a SRDEL), humIgG2 (identificador de secuencia n.º 39), humIgG3 (identificador de secuencia n.º: 40) y humIgG4 (identificador de secuencia n.º: 41) con diferencias entre las secuencias marcadas con asteriscos. Los números sobre las secuencias representan el sistema de numeración EU. También se muestra un ejemplo de la región constante kappa. La **Figura 5B** representa las secuencias de aminoácidos de longitud completa (regiones variables y constantes) de las cadenas ligera y pesada del anticuerpo anti-CD22 10F4v2 humanizado, isotipo IgG1. Las partes subrayadas representan los dominios constantes.

Las **Figuras de la 6A a la 6D** muestran los resultados de los ensayos que miden diversos determinantes de la eficacia del anticuerpo CD22 conjugado con fármacos en las líneas celulares de linfomas. La **Figura 6A** indica que los niveles más elevados de la superficie celular CD22 se correlacionan con un nivel más bajo del anticuerpo anti-CD22-MCC-DM1 IC50 (mayor eficacia). La **Figura 6B** indica que la mayor internalización del anti-CD22-MCC-DM1 se correlaciona con un anti-CD22-MCC-DM1 IC50 menor. La **Figura 6C** indica que una mayor sensibilidad intrínseca de las células sin fármacos se correlaciona con un anti-CD22-MCC-DM1 IC50 menor. La **Figura 6D** es un fotomicrográfo que muestra la internalización del anticuerpo anti-CD22 marcado fluorescentemente después de la unión a CD22 en la superficie celular.

Figuras 7A y 7B: La **Figura 7A** es un gráfico de la reducción de volumen del tumor *in vivo* en un modelo xenotransplantado que muestra que la administración de un anticuerpo anti-CD22 mu10F4-smcc-DM1 y hu10F4v1-smcc-DM1 a un ratón SCID con tumores de células B humanas redujeron considerablemente el volumen tumoral. La concentración del fármaco fue aproximadamente 4 y 4,6, véase la Tabla 4. La **Figura 7B** es un gráfico de un estudio similar, pero la concentración del fármaco fue ligeramente inferior a aproximadamente 2,9 y 3,0 (véase la Tabla 5), y la eficacia de mu10F4-smcc-DM1 y hu10F4v2-smcc-DM1 se comparó con el anticuerpo de control y el mu10F4 no conjugado. La **Figura 7C** es un gráfico sobre la reducción del tumor *in vivo* en

un modelo xenotransplantado en el que el anti-CD22-spp-DM1 se administró según se indica en la Tabla 6.

Figuras 8A y 8B: La **Figura 8A** es un gráfico de anticuerpos anti-CD22 5E8.1.8-smcc-DM1 y RFB4-smcc-DM1 que se administraron a xenotransplantes de células Ramos. La **Figura 8B** es un gráfico de anticuerpos anti-CD22 5E8.1.8-smcc-DM1 y RFB4-smcc-DM1 que se administraron a xenotransplantes de células BJAB-luc.

La **Figura 9** es un gráfico que muestra el efecto relativo en el volumen tumoral con el transcurso del tiempo después de la administración del anti-CD22 (RFB4)-smcc-DM1 en concentraciones bajas, medias y altas de fármacos.

La **Figura 10** es un gráfico que muestra el efecto relativo en el volumen tumoral con el transcurso del tiempo después de la administración del anti-CD22 (RFB4)-MC-vcPAB-MMAF o anti-CD22 (RFB4)-MC-MMAF en xenotransplantes Ramos.

La **Figura 11** es un gráfico que muestra el efecto relativo en el volumen tumoral con el transcurso del tiempo después de la administración del anti-CD22(RFB4)-smcc-DM1 o -MCvcPAB-MMAE.

La **Figura 12** es un gráfico que muestra el efecto relativo en el volumen tumoral con el transcurso del tiempo después de la administración de las variantes anti-CD22 10F4 humanizadas tales como los inmunoconjugados MMAF o DM1, tal como se describen en la Tabla 12.

Las **Figuras de la 13A a la 13C** son gráficos que muestran el efecto relativo en el volumen tumoral en el tiempo después de la administración del anti-CD22-smcc-DM1 o anti-CD22-MC-MMAF en diferentes modelos de xenotransplantes de linfomas de células B: SuDHL-4 (Figura 13A), DoHH2 (Figura 13B) y Granta-519 (Figura 13C).

La **Figura 14** muestra diagramas de los dominios CD22 eliminados del mapeo de epítomos, tal como se describe en los ejemplos. Los dominios se enumeran del 1 al 7. "TM" se refiere al dominio transmembrana.

La **Figura 15** muestra las representaciones de los conjugados de anticuerpo anti-CD22 diseñado con cisteína (ADC) con fármacos, donde una fracción del fármaco se une a un grupo diseñado con cisteína en: La cadena ligera (LC-ADC); la cadena pesada (HC-ADC) y la región Fc (Fc-ADC).

La **Figura 16** muestra los pasos para: (i) reducir los aductos de disulfuros de cisteína, las intercadenas y los disulfuros de las intercadenas en un anticuerpo

60

anti-CD22 diseñado con cisteína (ThioMab) con un agente TCEP reductor (tris(2-carboxietil)fosfino hidrocloreto); (ii) oxidar parcialmente, es decir, reoxidar para reformar la intercadena y los disulfuros de intercadenas con dhAA (ácido dehidroascórbico); y (iii) lograr la conjugación del anticuerpo reoxidado con un enlazador a fármaco intermedio para formar un conjugado de anticuerpo anti-CD22 diseñado con cisteína con fármacos (ADC).

Las **Figuras de la 17A a la 17C** representan las secuencias de aminoácidos de anticuerpos anti-CD22 de la invención diseñados con cisteína, en los que la cadena ligera, la cadena pesada o la región Fc se modifican para diseñar una cisteína en las posiciones determinadas de aminoácidos. La **Figura 17A** representa una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera anti-CD22 10F4 en la que una valina en la posición 205 de la numeración de Kabat (posición secuencial 210 de la valina) se modifica a una cisteína. La **Figura 17B** representa una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada anti-CD22 10F4 en la que una alanina en la posición 118 de la numeración EU (posición secuencial 121 de la alanina) se modifica a una cisteína. La **Figura 17C** representa una secuencia de aminoácidos de la región variable de Fc anti-CD22 10F4 en la que una serina en la posición 400 de la enumeración EU (posición secuencial 403 de la serina) se modifica a una cisteína. En cada figura, el aminoácido modificado se muestra en un texto en negrita con doble subrayado. Los subrayados simples indican regiones constantes. Las regiones variables no están subrayadas.

Las **Figuras de la 18A a la 18E** son diagramas FACS que indican que la unión de los conjugados de thiomab anti-CD22 con fármacos (TDC) de la invención se unen a CD22 expresado en la superficie de células BJAB-luc es similar a las regiones variables de LC, HC y Fc de thiomab, así como a los diferentes conjugados de fármacos mostrados.

La **Figura 19** es un gráfico que indica los cambios en el volumen medio del tumor que se produjeron en el tiempo en un modelo xenotransplantado tratado con diversos conjugados de thiomab anti-CD22 con fármacos, que variaron según la posición de la cisteína diseñada (LC, HC o Fc) o según el conjugado de fármaco (MMAF o MMAE), o ambos. Los modelos xenotransplantados tratados con conjugados de thiomab anti-CD22 con fármacos 10F4-LC-V210C-MCvcPAB-MMAE y anti-CD22 10F4-HC-A121C-MCvcPAB-MMAE indicaron una reducción en el volumen tumoral durante el estudio.

La **Figura 20A** es un gráfico que indica cambios en el volumen medio del tumor producidos durante el transcurso del tiempo en un xenotransplante de linfoma de células del manto Granta-519 humanas en ratones CB17 SCID tratados con conjugados de thiomab anti-CD22 A118C de cadena pesada con fármacos conjugados a diversos grupos de fármacos del enlazador o administrados en diferentes dosis, o ambos, tal como se muestra. Los conjugados de thiomab anti-CD22 10F4-HC (A118C)-MCvcPAB-MMAE con fármacos aparentemente son los agentes de prueba más eficaces de este experimento. La **Figura 20B** es un gráfico que indica los cambios en el volumen medio del tumor producidos en el tiempo en un xenotransplante DOHH2 de linfoma folicular en ratones CB17 SCID tratados con los mismos conjugados de thiomab anti-CD22 con fármacos A118C de cadena pesada, pero en dosis más altas. Los conjugados de thiomab anti-CD22 10F4-HC (A118C)-MCvcPAB-MMAE con fármacos aparentemente son los agentes de prueba más eficaces de este experimento. La **Figura 20C** es un diagrama sobre el porcentaje de cambios de peso en los ratones utilizados en el estudio del xenotransplante DOHH2 que muestra que no se produjo ningún cambio de peso significativo durante los primeros 14 días del estudio.

Las **Figuras 21A y 21B** son gráficos de barras que muestran los cambios de AST (aspartato aminotransferasa) en el suero (**Figura 21A**) y neutrófilos en el suero (**Figura 21B**) en los días 0 y 5, durante los que se administraron los conjugados de anticuerpos con fármacos que contienen enlazadores escindibles y no escindibles.

Las **Figuras 22A y 22B** son gráficos que muestran la reducción de células B periféricas (células CD20⁺) en monos cinomolgus a los que se les suministró una dosis de 10, 20 y 30 mg/kg de anti-CD22 MMAF (**Figura 22A**) y anti-CD22 DM1 (**Figura 22B**).

Las **Figuras 23A y 23B** son gráficos que no muestran ningún cambio significativo en los linfocitos CD4⁺ con dosis de 10, 20 y 30 mg/kg de anti-CD22 MMAF (**Figura 23A**) y anti-CD22 DM1 (**Figura 23B**).

Las **Figuras 24A y 24B** indican muestras histológicas del tejido tonsilar del mono cinomolgus, en el que la reducción de las células B del centro germinal, que se manifiestan en el control vehicular (**Figura 24A**), se reducen en una muestra tonsilar de un animal al que se le suministró una dosis de 10 mg/kg de hu10F4v3-SMCC-DM1.

La **Figura 25A** es un diagrama que indica las regiones de folículos esplénicos de donde se obtuvieron las muestras para un estudio en el que se demostró que los conjugados de anticuerpos anti-CD22 con fármacos conservan las células B en el tejido en reposo en los monos cinomolgus. Las células en división en el centro germinal de los folículos esplénicos de mono cinomolgus se redujeron a células germinales en división de los bazo de estos animales, a los que se les administró una dosis de 10 mg/kg de hu10F4v3-MC-MMAF (**Figuras 25B y 25C**). Las células B vírgenes no en división no se redujeron bajo las mismas condiciones (**Figuras 25D y 25E**).

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LAS FORMAS DE REALIZACIÓN DE LA INVENCION

Se proporcionan anticuerpos aislados que se unen a CD22. Se proporcionan, además, inmunoconjugados que comprenden anticuerpos anti-CD22. También se proporcionan anticuerpos anti-CD22 diseñados con cisteína y sus inmunoconjugados. Los anticuerpos e inmunoconjugados de la invención son útiles, como por ejemplo, para el diagnóstico o tratamiento de trastornos asociados a una expresión alterada, como por ejemplo, una expresión aumentada, de CD22. En determinadas formas de realización, los anticuerpos o inmunoconjugados de la invención son útiles para el diagnóstico o tratamiento de un trastorno de proliferación celular, como un tumor o cáncer. En determinadas formas de realización, los anticuerpos o inmunoconjugados de la invención son útiles para la detección de CD22, como por ejemplo, CD22 expresado en la superficie celular.

Se proporcionan polinucleótidos que codifican anticuerpos anti-CD22. Se proporcionan vectores que comprenden polinucleótidos que codifican anticuerpos anti-CD22, así como células huésped que comprenden dichos vectores. También se proporcionan composiciones, incluyendo las formulaciones farmacéuticas, que comprenden uno o más de los polinucleótidos, anticuerpos anti-CD22 o inmunoconjugados de la invención.

Técnicas generales

Las técnicas y procedimientos descritos o remitidos en la presente memoria descriptiva por lo general se conocen bien y se emplean habitualmente con la metodología tradicional utilizada por los expertos en la materia, como por ejemplo, las metodologías ampliamente utilizadas descritas en Sambrook y col., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* 3.^a edición (2001) Cold Spring Harbor Laboratory

Press, Cold Spring Harbor, N.Y.; *Current Protocols in Molecular Biology* (F. M. Ausubel, y col. eds., (2003)); la serie *Methods in Enzymology* (Academic Press, Inc.); *Pcr 2: A Practical Approach* (M. J. MacPherson, B. D. Hames y G. R. Taylor eds. (1995)), Harlow y Lane, eds. (1988) *Antibodies, A Laboratory Manual, and Animal Cell Culture* (R. I. Freshney, ed. (1987)); *Oligonucleotide Synthesis* (M. J. Gait, ed., 1984); *Methods in Molecular Biology*, Humana Press; *Cell Biology: A Laboratory Notebook* (J. E. Cellis, ed., 1998) Academic Press; *Animal Cell Culture* (R. I. Freshney), ed., 1987); *Introduction to Cell and Tissue Culture* (J. P. Mather y P. E. Roberts, 1998) Plenum Press; *Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures* (A. Doyle, J. B. Griffiths, y D. G. Newell, eds., 1993-8) J. Wiley y Sons; *Handbook of Experimental Immunology* (D. M. Weir y C. C. Blackwell, eds.); *Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells* (J. M. Miller y M. P. Calos, eds., 1987); *PCR: The Polymerase Chain Reaction*, (Mullis y col., eds., 1994); *Current Protocols in Immunology* (J. E. Coligan y col., eds., 1991); *Short Protocols in Molecular Biology* (Wiley and Sons, 1999); *Immunobiology* (C. A. Janeway y P. Travers, 1997); *Antibodies* (P. Finch, 1997); *Antibodies: A Practical Approach* (D. Catty., ed., IRL Press, 1988-1989); *Monoclonal Antibodies: A Practical Approach* (P. Shepherd y C. Dean, eds., Oxford University Press, 2000); *Using Antibodies: A Laboratory Manual* (E. Harlow y D. Lane (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999); *The Antibodies* (M. Zanetti y J. D. Capra, eds., Harwood Academic Publishers, 1995); y *Cancer. Principles and Practice of Oncology* (V. T. DeVita y col., eds., J.B. Lippincott Company, 1993).

DEFINICIONES Y ABREVIATURAS

Definiciones

Un anticuerpo "aislado" es aquél que se ha identificado y separado, y/o recuperado, a partir de un componente de su entorno natural. Los componentes contaminantes de su entorno natural son materiales que podrían interferir en la investigación, el diagnóstico o los usos terapéuticos del anticuerpo y pueden incluir enzimas, hormonas y otros solutos proteináceos y no proteináceos. En algunas formas de realización, un anticuerpo se purificará (1) en más del 95% de su peso tal como se determina, por ejemplo, por el método de Lowry, y en algunas formas de realización, en más del 99% de su peso, (2) en un grado suficiente para obtener al menos 15 residuos de una secuencia de aminoácidos N-terminal o interna mediante, por ejemplo, un secuenciador de taza giratoria, o (3) hasta alcanzar la homogeneidad mediante SDS-PAGE, en condiciones reductoras o no

reductoras, empleando, por ejemplo, la tinción con azul de Coomassie o plata. Los anticuerpos aislados incluyen el anticuerpo *in situ* dentro de células recombinantes, ya que al menos un componente del entorno natural del anticuerpo no estará presente. En cualquier caso, normalmente, el anticuerpo aislado se preparará mediante al menos una etapa de purificación.

Una molécula de ácido nucleico "aislada" es una molécula de ácido nucleico que se separa de al menos una de las otras moléculas de ácido nucleico con las que se asocia habitualmente, por ejemplo, en su entorno natural. Una molécula aislada de ácido nucleico incluye, además, una molécula de ácido nucleico contenida en células que habitualmente expresan la molécula de ácido nucleico, pero la molécula de ácido nucleico está presente extracromosómicamente o en una ubicación cromosómica diferente de su ubicación cromosómica natural.

Por "purificada" se entiende una molécula que está presente en una muestra a una concentración de al menos el 98% de su peso, o al menos el 98% del peso de la muestra en la que está contenida.

Las frases "sustancialmente similar" o "sustancialmente el/la mismo(a)", tal y como se usan en la presente memoria descriptiva, indican un grado suficientemente elevado de similitud entre dos valores numéricos (por ejemplo, uno asociado a un anticuerpo de la invención y el otro asociado a un anticuerpo de control/referencia), de forma que alguien experto en la materia consideraría la diferencia entre los dos valores de escasa o ninguna significación estadística o biológica, o ambos, dentro del contexto de la característica biológica medida por dichos valores (por ejemplo, valores Kd). La diferencia entre dichos dos valores es, por ejemplo, inferior al 50% aproximadamente, al 40% aproximadamente, al 30% aproximadamente, al 20% aproximadamente y/o al 10% aproximadamente como función del valor para la molécula de control/referencia.

Las frases "sustancialmente reducido(a)", "sustancialmente diferente", tal y como se usan en la presente memoria descriptiva, indican un grado suficientemente elevado de diferencia entre dos valores numéricos (por lo general, uno asociado a una molécula y el otro asociado a una molécula de control/referencia), de forma que alguien experto en la materia consideraría que la diferencia entre los dos valores tiene una significación estadística dentro del contexto de la característica biológica medida por dichos valores (por ejemplo, valores Kd). La diferencia entre dichos dos valores es, por ejemplo, superior al

10% aproximadamente, al 20% aproximadamente, al 30% aproximadamente, al 40% aproximadamente y/o al 50% aproximadamente como función del valor para la molécula de control/referencia.

En la presente memoria descriptiva, por “vector” se entiende una molécula de un ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico al que se ha unido. Un tipo de vector es un “plásmido”, que hace referencia a un ADN circular de doble cadena al que se pueden ligar segmentos adicionales de ADN. Otro tipo de vector es un vector fágico. Otro tipo de vector es un vector vírico, en el que segmentos adicionales de ADN se pueden ligar al genoma vírico. Algunos vectores tienen capacidad de replicación autónoma en una célula huésped en la que se introducen (por ejemplo, vectores bacterianos que tienen un origen bacteriano de replicación y vectores episomales en mamíferos). Otros vectores (por ejemplo, vectores no episomales en mamíferos) pueden integrarse en el genoma de una célula huésped al introducirse en ésta y, de este modo, se replican al mismo tiempo que el genoma del huésped. Asimismo, existen vectores capaces de dirigir la expresión de genes a los que están enlazados por su función. Estos vectores se denominan en la presente memoria descriptiva “vectores de expresión recombinantes” o simplemente “vectores recombinantes”. En general, los vectores de expresión de utilidad en las técnicas de ADN recombinante tienen con frecuencia la forma de plásmidos. En la presente especificación, los términos “plásmido” y “vector” son intercambiables, dado que el plásmido es la forma de vector más frecuentemente usada.

En la presente memoria descriptiva, “polinucleótido” o “ácido nucleico” son términos que se utilizan indistintamente y se refieren a polímeros de nucleótidos de cualquier longitud e incluyen ADN y ARN. Los nucleótidos pueden ser desoxirribonucleótidos, ribonucleótidos, nucleótidos modificados o bases, y/o sus análogos, o cualquier sustrato que se pueda incorporar a un polímero mediante ADN o ARN polimerasa o mediante una reacción sintética. Un polinucleótido puede incluir nucleótidos modificados tales como nucleótidos metilados y sus análogos. De estar presente, la modificación de la estructura del nucleótido se puede producir antes o después del ensamblaje del polímero. La secuencia de nucleótidos puede interrumpirse por componentes no nucleótidos. Un polinucleótido puede comprender una o más modificaciones realizadas tras síntesis, como conjugación a un marcador. Otros tipos de modificaciones incluyen, por ejemplo, “cofias”, sustitución de uno o más de los nucleótidos que se

producen de forma natural por un análogo; modificaciones de enlaces internucleótidos, como aquellas en las que intervienen enlaces no cargados (por ejemplo, fosfonatos de metilo, fosfotriésteres, fosfoamidatos, carbamatos, etc.) y enlaces cargados (por ejemplo, fosforotioatos, fosforoditioatos, etc.); las que contienen porciones colgantes, como, por ejemplo, proteínas (por ejemplo, nucleasas, toxinas, anticuerpos, péptidos de señal, poli-L-lisina, etc.); las que contienen intercaladores (por ejemplo, acridina, psoralen, etc.); las que contienen quelantes (por ejemplo, metales, metales radioactivos, boro, metales oxidativos, etc.); las que contienen alquilantes; las que contienen enlaces modificados (por ejemplo, ácidos nucleicos anoméricos alfa, etc.), así como formas no modificadas de polinucleótido(s). Asimismo, cualquiera de los grupos hidroxilo presentes habitualmente en los azúcares puede sustituirse, por ejemplo, por grupos de fosfonatos, grupos fosfatos, protegerse mediante grupos protectores estándar, o activarse para preparar enlaces adicionales a nucleótidos adicionales, o puede conjugarse a soportes sólidos o semisólidos. El OH terminal 5' y 3' puede fosforilarse y sustituirse por aminas o porciones de grupos orgánicos en casquete (capping) de 1 a 20 átomos de carbono. Otros hidroxilos también pueden derivatizarse a grupos protectores estándar. Los polinucleótidos también pueden contener formas análogas de azúcares ribosa o desoxirribosa que son generalmente conocidos en la materia; por ejemplo, 2'-O-metil-, 2'-O-allyl-, 2'-fluoro- o 2'-azido-ribosa, análogos de azúcares carbocíclicos, azúcares α -anoméricos, azúcares epiméricos como arabinosa, xilosas o lixosas, azúcares piranosas, azúcares furanosas, sedoheptulosas, análogos acíclicos y análogos nucleósidos básicos como metil ribosida. Uno o más enlaces de fosfodiéster pueden sustituirse por otros grupos de enlace alternativos. Estos grupos alternativos de enlace incluye formas de realización en las que el fosfato se sustituye por P(O)S ("tioato"), P(S)S ("ditioato"), "(O)NR₂" ("amidato"), P(O)R, P(O)OR', CO o CH₂ ("formacetal"), donde cada R o R' es independientemente H o alquilo sustituido o no sustituido (de 1 °C a 20 °C) que contiene opcionalmente un enlace a éter (-O-), arilo, alquenilo, cicloalquilo, cicloalquenilo o aradilo. No todos los enlaces en un polinucleótido tienen que ser idénticos. La descripción anterior se aplica a todos los polinucleótidos mencionados en la presente memoria descriptiva, incluyendo el ARN y el ADN.

En la presente memoria descriptiva, "oligonucleótido" se refiere por lo general a polinucleótidos cortos, habitualmente de cadena única y sintéticos que

suelen tener una longitud inferior a 200 nucleótidos, aunque no necesariamente. Los términos “oligonucleótido” y “polinucleótido” no se excluyen mutuamente. La descripción anteriormente incluida sobre polinucleótidos es aplicable igualmente y en su integridad a los oligonucleótidos.

“El “Porcentaje (%) de identificación de la secuencia de aminoácidos” con respecto a una secuencia de polipéptidos de referencia se define como el porcentaje de residuos de aminoácidos en una secuencia candidata que son idénticos a los residuos de aminoácidos en la secuencia polipeptídica de referencia, después de alinear las secuencias e introducir espacios, si fuera necesario, para lograr el máximo porcentaje de identificación de la secuencia y no considerar ninguna sustitución conservadora parte de la identificación de la secuencia. A efectos de determinar el porcentaje de identificación de la secuencia de aminoácidos, la alineación se puede conseguir de varias formas que son conocidas en la materia; por ejemplo, usar software comercializado como BLAST, BLAST-2, ALIGN o Megalign (DNASTAR). Los expertos en la materia pueden determinar parámetros apropiados para la alineación de secuencias, incluyendo los algoritmos necesarios para lograr la alineación máxima sobre la longitud completa de las secuencias que se comparan. Sin embargo, a efectos de la presente memoria descriptiva, los valores porcentuales de identificación de la secuencia de aminoácidos se generan utilizando el software de comparación de secuencias ALIGN-2. Dicho software fue creado por Genentech, Inc. y el código fuente ha sido presentado, junto con la documentación del usuario, en la Oficina de Derechos de Autor de Estados Unidos, Washington D.C., 20559, donde está inscrito con el n.º de Registro de Derechos de Autor de Estados Unidos TXU510087. El programa ALIGN-2 está comercializado por Genetech, Inc., South San Francisco, California, o se puede compilar a partir del código fuente. Este programa debe compilarse para su uso en un sistema operativo UNIX, preferentemente UNIX V4.0D digital. El programa ALIGN-2 define todos los parámetros de comparación de secuencias, que no varían.

En situaciones en las que se emplea ALIGN-2 para comparaciones de secuencias de aminoácidos, el porcentaje de identificación de la secuencia de aminoácidos de una determinada secuencia aminoacídica A con respecto a una determinada secuencia aminoacídica B (lo que también se puede expresar diciendo que una determinada secuencia aminoacídica A tiene o contiene un

porcentaje concreto de identificación de la secuencia aminoacídica con respecto a una determinada secuencia aminoacídica B) se calcula de la siguiente manera:

100 veces la fracción X/Y

en la que X es la cantidad de residuos de aminoácidos establecidos como coincidencia total por el programa de alineación de secuencias ALIGN-2 en la alineación hecha por ese programa de A y B, y en la que Y es la cantidad total de residuos de aminoácidos en B. Se detectará que, cuando la longitud de la secuencia de aminoácidos A no sea igual a la longitud de la secuencia de aminoácidos B, el porcentaje de identificación de la secuencia de aminoácidos de A con respecto a B no será igual al porcentaje de identificación de la secuencia de aminoácidos de B con respecto a A. A menos que se indique lo contrario, todos los valores del porcentaje de la identidad de la secuencia de aminoácidos usados en la presente memoria descriptiva se obtienen como se han descrito en el párrafo anterior, utilizando el programa informático ALIGN-2.

En la presente memoria descriptiva, un "marcador de la superficie de células B" o "antígeno de la superficie de células B" es un antígeno que se expresa en la superficie de una célula B que puede actuar con un antagonista que se une a él, incluyendo, entre otros, anticuerpos a un antígeno de la superficie de las células B o un antígeno de la superficie de las células B en forma soluble capaz de unir antagonistas de un ligando a un antígeno de las células B que se produzca naturalmente. Entre los marcadores ejemplares de la superficie de células B se encuentran los marcadores de la superficie de leucocitos CD10, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD24, CD37, CD40, CD53, CD72, CD73, CD74, CDw75, CDw76, CD77, CDw78, CD79a, CD79b, CD80, CD81, CD82, CD83, CDw84, CD85 y CD86 (para conocer sus descripciones, consulte *The Leukocyte Antigen Facts Book*, 2ª edición, 1997, ed. Barclay y col. Academic Press, Harcourt Brace & Co., New York). Otros marcadores de la superficie de células B incluyen el RP105, el FcRH2, el CR2 de células B, el CCR6, el P2X5, el HLA-DOB, el CXCR5, el FCER2, el BR3, el BAFF, el BLyS, el Btig, el NAG14, el SLGC16270, el FcRH1, el IRTA2, el ATWD578, el FcRH3, el IRTA1, el FcRH6, el BCMA y el 239287. El marcador de la superficie de células B de interés particular se expresa preferentemente en las células B en comparación con los otros tejidos del mamífero que no pertenecen a células B, y puede expresarse tanto en células B precursoras como maduras.

En la presente memoria descriptiva, "CD22" se refiere a cualquier CD22 nativo procedente de vertebrados, incluyendo mamíferos como primates (por ejemplo, humanos, monos cinomolgus) y roedores (por ejemplo, ratas y ratones), a menos que se especifique lo contrario. El término engloba CD22 no procesado de "longitud completa", así como cualquier forma de CD22 que derive del procesamiento en la célula. El término también engloba variantes de CD22 presentes naturalmente, por ejemplo, variantes de ajuste, variantes alélicas o isoformas. La isoforma principal del CD22 (CD22 beta) comprende los aminoácidos 847 y siete regiones de tipo inmunoglobulina en el dominio extracelular (véase Wilson, G.L. y col., *J. Exp. Med.* 173:137-146 (1991)). Una isoforma secundaria, CD22 alfa, comprende los aminoácidos 647 y carece de los dominios 3 y 4 de tipo inmunoglobulina en el dominio extracelular (véase Stamenkovic, I. y Seed, B., *Nature* 345:74-77 (1990)) y Wilson y col., (1991), mencionado anteriormente). La secuencia de aminoácidos del CD22 beta se describe en la Figura 1B, en la que la parte subrayada representa el dominio extracelular (ECD) y la parte en letra cursiva indica los aminoácidos ausentes en la secuencia del dominio extracelular del CD22 alfa. La Figura 1C muestra la secuencia de aminoácidos del CD22 alfa en el que se subraya el dominio extracelular. La secuencia de aminoácidos del aminoácido 1 al 21 representa la secuencia de señal escindida de la forma madura de la proteína. En una forma de realización, el CD22 se expresa en la superficie celular, como por ejemplo, en la superficie de una célula B normal o una célula B tumoral. La Figura 1D muestra la secuencia de aminoácidos del CD22 del mono cinomolgus.

Los "anticuerpos" (Ab) e "inmunoglobulinas" (Ig) son glicoproteínas que tienen características estructurales similares. Mientras que los anticuerpos presentan especificidad de unión a un antígeno específico, las inmunoglobulinas incluyen tanto anticuerpos como otras moléculas similares a anticuerpos que por lo general no presentan especificidad a antígenos. Por ejemplo, los polipéptidos de la última clase se producen a niveles bajos en el sistema linfático y a niveles mayores por los mielomas.

Los términos "anticuerpo" e "inmunoglobulina" se usan indistintamente en el sentido más amplio e incluyen anticuerpos monoclonales (por ejemplo, anticuerpos monoclonales intactos o de longitud completa), anticuerpos policlonales, anticuerpos monovalentes, anticuerpos polivalentes, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos en tanto en cuanto

presenten la actividad biológica deseada) y también pueden incluir determinados fragmentos de anticuerpos (tal como se describe en mayor detalle en la presente memoria descriptiva). Un anticuerpo puede ser quimérico, humano, humanizado o con afinidad madurada, o todos los anteriores.

Por “anticuerpo anti-CD22” o “anticuerpo que se une a CD22” se entenderá un anticuerpo con capacidad de unión a CD22, con suficiente afinidad para que dicho anticuerpo sea útil como agente diagnóstico o terapéutico, o ambos, para actuar contra CD22. Preferiblemente, el alcance de la unión de un anticuerpo anti-CD22 a una proteína no afín no relacionada con CD22 presenta menos de un 10% aproximadamente de unión del anticuerpo a CD22, según medición, por ejemplo, mediante radioinmunoensayo (RIA). En ciertas formas de realización, un anticuerpo que se une a CD22 tiene una constante de disociación (K_d) de $\leq 1\mu\text{M}$, $\leq 100\text{ nM}$, $\leq 10\text{ nM}$, $\leq 1\text{ nM}$ o $\leq 0,1\text{ nM}$. En ciertas formas de realización, un anticuerpo anti-CD22 se une a un epítipo de CD22 que se conserva entre los CD22 de distintas especies.

Por “región variable” o “dominio variable” de un anticuerpo se entienden los dominios amino terminales de la cadena pesada o ligera del anticuerpo. El dominio variable de la cadena pesada se puede referir como “VH”. El dominio variable de la cadena ligera se puede referir como “VL”. Estos dominios suelen ser las partes más variables de un anticuerpo y contienen los sitios de unión a antígeno.

El término “variable” se refiere al hecho de que ciertas porciones de los dominios variables difieren ampliamente en sus secuencias de un anticuerpo a otro y se utilizan para la unión y especificidad de cada anticuerpo en particular con relación a su antígeno particular. Sin embargo, la variabilidad no se distribuye uniformemente a través de los dominios variables de los anticuerpos. Se concentra en tres segmentos denominados regiones de determinación de complementariedad (CDR) o regiones hipervariables (HVR) de los dominios variables tanto de la cadena ligera como de la pesada. Las porciones más conservadas de los dominios variables se llaman regiones de estructura (FR). Cada dominio variable de las cadenas pesada y ligera nativas comprende cuatro FR que, en gran parte, adoptan una configuración de hoja- β , conectadas por tres CDR, que crean bucles que conectan la estructura de la hoja- β , y en algunos casos forman parte de ella. Las CDR de cada cadena se mantienen unidas y en estrecha proximidad mediante las regiones FR y, junto a las CDR de la otra

cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión a antígeno de los anticuerpos (véase Kabat y col., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Quinta Edición, National Institute of Health, Bethesda, MD (1991)). Los dominios constantes no participan directamente en la unión de un anticuerpo a un antígeno, pero desarrollan diversas funciones efectoras, como la participación del anticuerpo en la citotoxicidad dependiente de anticuerpos.

Las “cadenas ligeras” de anticuerpos (inmunoglobulinas) de cualquier vertebrado pueden asignarse a una de dos clases claramente diferenciadas, denominadas kappa (κ) y lambda (λ), en función de las secuencias de aminoácidos de sus dominios constantes.

Según las secuencias de aminoácidos de los dominios constantes de sus cadenas pesadas, los anticuerpos (inmunoglobulinas) pueden asignarse a distintas clases. Existen cinco clases principales de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y varias de éstas pueden seguir dividiéndose en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ e IgA₂. Los dominios constantes de la cadena pesada que corresponden a las distintas clases de inmunoglobulinas se denominan α , δ , ϵ , γ y μ , respectivamente. Las estructuras de las subunidades y las configuraciones tridimensionales de las distintas clases de inmunoglobulinas son bien conocidas y se describen de forma general, por ejemplo, en Abbas y col., *Cellular and Mol. Immunology*, 4.^a ed. (2000). Un anticuerpo puede formar parte de una molécula de fusión más amplia, formada por asociación covalente o no covalente del anticuerpo a una o más proteínas o péptidos.

En la presente memoria descriptiva, los términos “anticuerpo de longitud completa”, “anticuerpo intacto” y “anticuerpo entero” se usan indistintamente para hacer referencia a un anticuerpo en su forma sustancialmente intacta, no así a fragmentos de anticuerpo definidos a continuación. Estos términos hacen referencia en concreto a un anticuerpo con cadenas pesadas que contiene la región Fc.

Los “fragmentos de anticuerpos” contienen únicamente una porción de un anticuerpo intacto, en la que la porción conserva al menos una, aunque también puede conservar la totalidad o la mayoría, de las funciones normalmente asociadas a esa porción cuando está presente en un anticuerpo intacto. En una forma de realización, un fragmento de anticuerpo contiene un sitio de unión a antígeno del anticuerpo intacto y, de este modo, conserva la capacidad para

unirse al antígeno. En otra forma de realización, un fragmento de anticuerpo, por ejemplo uno que contiene la región Fc, conserva al menos una de las funciones biológicas habitualmente asociadas a la región Fc cuando está presente en un anticuerpo intacto, como la unión a FcRn, la modulación de la semivida del anticuerpo, la función de la ADCC y la unión a complemento. En una forma de realización, un fragmento de anticuerpo es un anticuerpo monovalente que *in vivo* tiene una semivida sustancialmente similar a la de un anticuerpo intacto. Por ejemplo, un fragmento de anticuerpo de este tipo puede contener un brazo de unión a antígeno enlazado a una secuencia Fc capaz de dar estabilidad *in vivo* al fragmento.

La digestión con papaína de anticuerpos produce dos fragmentos idénticos de unión a antígeno, llamados fragmentos "Fab", cada uno de ellos con un solo sitio de unión a antígeno, y un fragmento "Fc" residual, cuyo nombre refleja su capacidad para cristalizarse fácilmente. El tratamiento con pepsina produce un fragmento F(ab')₂ que tiene dos sitios de combinación a antígeno y aún es capaz de establecer un enlace cruzado con el antígeno.

El "Fv" es el fragmento de anticuerpo mínimo que contiene un sitio completo de unión a antígeno. En una forma de realización, una especie Fv de dos cadenas está compuesta por un dímero de un dominio variable de cadena pesada y otro de cadena ligera en una estrecha asociación no covalente. En una especie Fv de cadena única (scFv), un dominio variable de cadena pesada y otro de cadena ligera se pueden enlazar covalentemente mediante un enlazador peptídico flexible, de forma que las cadenas pesada y ligera se asocien en una estructura "dimérica" análoga a la presente en una especie Fv de dos cadenas. En esta configuración, las tres regiones CDR de cada dominio variable interactúan para definir un sitio de unión a antígeno en la superficie del dímero VH-VL. Colectivamente, las seis regiones CDR confieren al anticuerpo una especificidad de unión a antígeno. No obstante, incluso un dominio variable simple (o la mitad de un Fv que comprenda únicamente tres regiones CDR específicas para un antígeno) tiene la capacidad de reconocer un antígeno y unirse a él, aunque con una afinidad inferior a la del sitio de unión completo.

El fragmento Fab contiene los dominios variables de cadena pesada y ligera y también contiene el dominio constante de la cadena ligera y el primer dominio constante (CH1) de la cadena pesada. Los fragmentos Fab' se diferencian de los Fab por la adición de algunos residuos en el extremo carboxi

terminal del dominio CH1 de la cadena pesada, incluyendo una o más cisteínas de la región bisagra de un anticuerpo. Fab'-SH es la denominación que se da en la presente memoria descriptiva al Fab' en el que el(los) residuo(s) de cisteína de los dominios constantes presenta(n) un grupo tiol libre. Los fragmentos F(ab')₂ de anticuerpos se produjeron originalmente como pares de fragmentos Fab' con cisteínas bisagra entre ellos. También se conocen otros acoplamientos químicos de fragmentos de anticuerpos.

Los fragmentos "Fv de cadena única" o "scFv" de un anticuerpo comprenden los dominios VH y VL del anticuerpo presentes en una cadena simple de polipéptidos. Por lo general, el polipéptido scFv comprende también un enlazador de polipéptidos entre los dominios VH y VL que permite que el scFv forme la estructura deseada para la unión a antígeno. Para una revisión de los scFv, véase Pluckthun en *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg y Moore eds., Springer-Verlag, New York, págs. 269-315 (1994).

El término "diacuerpos" se refiere a pequeños fragmentos de anticuerpos con dos sitios de unión a antígeno que comprenden un dominio variable de cadena pesada (VH) conectado a un dominio variable de cadena ligera (VL) en la misma cadena de polipéptidos (VH-VL). Mediante el uso de un enlazador que sea demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios de la misma cadena, estos dominios se ven obligados a emparejarse con los dominios complementarios de otra cadena y crear dos sitios de unión a antígeno. Los diacuerpos pueden ser bivalentes o biespecíficos. Los diacuerpos se describen con más detalle, por ejemplo, en la patente europea EP 404.097; el documento WO93/1161; Hudson y col. (2003) *Nat. Med.* 9:129-134; y Hollinger y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 6444-6448 (1993). Los triacuerpos y tetracuerpos también se describen en Hudson y col. (2003) *Nat. Med.* 9:129-134.

En la presente memoria descriptiva, "anticuerpo monoclonal" se refiere a un anticuerpo obtenido a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, que los anticuerpos individuales que forman la población son idénticos, excepto en posibles mutaciones, por ejemplo, mutaciones de formación natural que podrían estar presentes en cantidades insignificantes. Por lo tanto, el modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo, que consiste en que no es una mezcla de anticuerpos discretos. En determinadas formas de realización, dicho anticuerpo monoclonal incluye típicamente un anticuerpo que comprende una secuencia polipeptídica que se une a una diana,

en la que la secuencia polipeptídica de unión a dicha diana se obtuvo mediante un procedimiento que incluye la selección de una sola secuencia polipeptídica de unión a la diana a partir de muchas secuencias polipeptídicas. Por ejemplo, el procedimiento de selección puede ser la selección de un solo clon a partir de muchos clones, como un conjunto de clones de hibridoma, clones fágicos o clones de ADN recombinante. Es conveniente saber que una secuencia seleccionada de unión a la diana puede alterarse adicionalmente, por ejemplo, para mejorar la afinidad para la diana, para humanizar la secuencia de unión a la diana, para mejorar su producción en cultivos celulares, para reducir su inmunogenia *in vivo*, para crear un anticuerpo multiespecífico, etc., y que un anticuerpo que comprenda la secuencia de unión a la diana alterada es, además, un anticuerpo monoclonal de esta invención. En contraste con las preparaciones de anticuerpos policlonales que incluyen típicamente diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítomos), cada anticuerpo monoclonal de una preparación de anticuerpos monoclonales está dirigido contra un solo determinante en un antígeno. Además de su especificidad, las preparaciones de anticuerpos monoclonales tienen la ventaja de que no suelen estar contaminadas por otras inmunoglobulinas.

El modificador “monoclonal” indica el carácter del anticuerpo, que consiste en que se ha obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogénea, y no debe interpretarse que sea necesario producir el anticuerpo por algún procedimiento en particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales que se utilicen de conformidad con la presente invención pueden obtenerse a partir de diversas técnicas, incluyendo, por ejemplo, el procedimiento del hibridoma (por ejemplo, Kohler y col., *Nature*, 256: 495 (1975); Harlow y col., *Antibodies: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2.^a ed. 1988); Hammerling y col., en: *Monoclonal Antibodies and T-Cell hybridomas* 563-681 (Elsevier, N.Y., 1981)), los métodos del ADN recombinante (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU: N.º 4.816.567), las tecnologías de reproducción de imágenes de fagos (véase, por ejemplo, Clackson y col., *Nature*, 352: 624-628 (1991); Marks y col., *J. Mol. Biol.* 222: 581-597 (1992); Sidhu y col., *J. Mol. Biol.* 338(2): 299-310 (2004); Lee y col., *J. Mol. Biol.* 340(5): 1073-1093 (2004); Fellouse, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101(34): 12467-12472 (2004); y Lee y col., *J. Immunol. Methods* 284(1-2): 119-132(2004), y técnicas para producir anticuerpos humanos o semejantes a los humanos en animales que tienen partes o la totalidad de los loci

de la inmunoglobulina humana o los genes que codifican las secuencias de la inmunoglobulina humana (véase, por ejemplo, el documento WO98/24893; el documento WO96/34096; el documento WO96/33735; el documento WO91/10741; Jakobovits y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 2551 (1993); Jakobovits y col., *Nature* 362: 255-258 (1993); Bruggemann y col., *Year in Immunol.* 7:33 (1993); las patentes de EE.UU. N.º 5,545,807; 5,545,806; 5,569,825; 5,625,126; 5,633,425; 5,661,016; Marks y col., *Bio.Technology* 10: 779-783 (1992); Lonberg y col., *Nature* 368: 856-859 (1994); Morrison, *Nature*, 368: 812-813 (1994); Fishwild y col., *Nature Biotechnol.* 14: 845-851 (1996); Neuberger, *Nature Biotechnol.* 14: 826 (1996) y Lonberg y Huszar, *Intern. Rev. Immunol.* 13: 65-93 (1995).

En la presente memoria descriptiva, los anticuerpos monoclonales incluyen específicamente los anticuerpos “quiméricos” en los que una parte de la cadena pesada o ligera, o ambas, es idéntica u homóloga a las secuencias correspondientes de anticuerpos obtenidos de una especie en particular o pertenecientes a una clase o subclase de anticuerpos en particular, mientras que el resto de la(s) cadena(s) son idénticas u homólogas a las secuencias correspondientes de anticuerpos obtenidos de otra especie o pertenecientes a otra clase o subclase de anticuerpos, así como fragmentos de dichos anticuerpos, siempre que exhiban la actividad biológica deseada (patente de EE.UU. N.º 4.816.567 y Morrison y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6851-6855 (1984)).

Las formas “humanizadas” de los anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) son anticuerpos quiméricos que contienen una secuencia mínima derivada de la inmunoglobulina no humana. En una forma de realización, un anticuerpo humanizado es una inmunoglobulina humana (anticuerpo receptor) en la que los residuos de una región hipervariable del receptor se sustituyen por residuos procedentes de una región hipervariable de una especie no humana (anticuerpo donante), como ratón, rata, conejo o primates no humanos, que tenga la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los residuos de la región de estructura (FR) de la inmunoglobulina humana se sustituyen por sus correspondientes residuos no humanos. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender residuos que no se encuentren en el anticuerpo receptor o donante. Estas modificaciones se pueden llevar a cabo para refinar aún más el rendimiento del anticuerpo. En general, un anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos los dominios variables, o al menos uno, y

típicamente dos, en los que todos, o sustancialmente todos, los bucles hipervariables correspondan a los de una inmunoglobulina no humana y todas, o sustancialmente todas, las FR sean las de una secuencia de inmunoglobulina humana. Opcionalmente, el anticuerpo humanizado también comprenderá al menos una porción de una región constante (Fc) de inmunoglobulina, típicamente humana. Para obtener más detalles, véase Jones y col., *Nature*, 321:522-525 (1986), Riechmann y col., *Nature*, 332:323-329 (1988) y Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.*, 2:593-596 (1992). Véanse también los siguientes artículos y las referencias citadas en éstos: Vaswani y Hamilton, *Ann. Allergy, Asthma & Immunol.* 1:105-115 (1998); Harris, *Biochem. Soc. Transactions* 23:1035-1038 (1995); Hurle y Gross, *Curr. Op. Biotech.* 5:428-433 (1994).

Un “anticuerpo humano” es aquel que contiene una secuencia de aminoácidos que corresponde a la de un anticuerpo producido por un humano y/o que se ha producido utilizando cualquiera de las técnicas para producción de anticuerpos humanos expuestas en la presente memoria descriptiva. Esta definición de un anticuerpo humano excluye específicamente un anticuerpo humanizado que contenga residuos de unión a antígeno no humanos.

En la presente memoria descriptiva, por “región hipervariable”, “HVR” o “HV” se entienden las regiones de un dominio variable de anticuerpo que son hipervariables en su secuencia y/o forman bucles estructuralmente definidos. Por lo general, los anticuerpos contienen seis regiones hipervariables: tres en la VH (H1, H2, H3) y tres en la VL (L1, L2, L3). En anticuerpos nativos, H3 y L3 muestran la máxima diversidad en las seis regiones hipervariables y se cree que H3 en concreto desempeña un papel único en otorgar una buena especificidad a los anticuerpos. Xu y col. (2000) *Immunity* 13:37-45; Johnson y Wu (2003) en *Methods in Molecular Biology* 248:1-25 (Lo, ed., Human Press, Totowa, NJ). De hecho, los anticuerpos de camélidos que se producen naturalmente y están formados por una cadena pesada son sólo funcionales y estables en ausencia de la cadena ligera. Hamers-Casterman y col. (1993) *Nature* 363:446-448; Sheriff y col. (1996) *Nature Struct. Biol.* 3:733-736.

En la presente memoria descriptiva se usan y engloban diversas delineaciones de regiones hipervariables. Las regiones de determinación de complementariedad (CDR) de Kabat están basadas en la variabilidad de las secuencias y son las más frecuentemente usadas (Kabat y col., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5.^a Ed. Public Health Service, National

Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)). Chothia, en cambio, se refiere a la ubicación de los bucles estructurales (Chothia y Lesk *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987)). Las regiones hipervariables de AbM representan una solución intermedia entre las CDR de Kabat y los bucles estructurales de Chothia y se utilizan en el software de modelado de anticuerpos AbM de Oxford Molecular. Las regiones hipervariables “de contacto” se basan en un análisis de las estructuras de cristales complejos disponibles. Los residuos procedentes de cada una de estas regiones hipervariables se indican a continuación.

	Bucle Kabat	AbM	Chothia	Contacto
	----	-----	---	-----
L1	L24-L34	L24-L34	L26-L32	L30-L36
L2	L50-L56	L50-L56	L50-L52	L46-L55
L3	L89-L97	L89-L97	L91-L96	L89-L96
H1	H31-H35B	H26-H35B	H26-H32	H30-H35B
(Numeración de Kabat)				
H1	H31-H35	H26-H35	H26-H32	H30-H35
(Numeración de Chothia)				
H2	H50-H65	H50-H58	H53-H55	H47-H58
H3	H95-H102	H95-H102	H96-H101	H93-H101

Las regiones hipervariables pueden comprender “regiones hipervariables ampliadas” como se indica a continuación: 24-36 ó 24-34 (L1), 46-56 ó 50-56 (L2) y 89-97 ó 89-96 (L3) en la VL y 26-35 (H1), 50-65 ó 49-65 (H2) y 93-102, 94-102 ó 95-102 (H3) en la VH. Los residuos de dominio variable se numeran según Kabat y col., mencionado anteriormente, para cada una de estas definiciones. Las regiones hipervariables HVR-H1 y HVR-H2 de los anticuerpos anti-CD22 10F4 de la invención son H26-H35 y H49-H65 según la numeración de Kabat.

Los residuos de una “estructura” o “FR” son aquellos residuos de un dominio variable distintos de los de una región hipervariable, tal como se define en la presente memoria descriptiva.

El término “numeración de residuos de dominio variable como en Kabat” o “numeración de la posición de los aminoácidos como en Kabat”, y las variaciones de éstos, se refiere al sistema de numeración utilizado para los dominios variables de cadena pesada o los dominios variables de cadena ligera de la compilación de anticuerpos en Kabat y col., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5^a Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991).

Utilizando este sistema de numeración, la secuencia lineal real de aminoácidos puede contener menos aminoácidos o aminoácidos adicionales que correspondan a un acortamiento de una FR o HVR del dominio variable o a una inserción en ellas, respectivamente. Por ejemplo, un dominio variable de cadena pesada puede incluir una única inserción de aminoácidos (residuo 52a según Kabat) después del residuo 52 de H2 y residuos insertados (por ejemplo, residuos 82a, 82b y 82c, etc., según Kabat) después de un residuo 82 de la FR de la cadena pesada. La numeración de Kabat de los residuos puede estar determinada para un anticuerpo dado por una alineación en regiones de homología de la secuencia del anticuerpo con una secuencia "estándar" numerada según Kabat.

Un "aminoácido sin cisteína" se refiere a un residuo de aminoácido sin cisteína que se ha diseñado en un anticuerpo parental y tiene un grupo tiol funcional (-SH), y no se empareja con un enlace disulfuro untramolecular o intermolecular, ni forma parte de éste.

El término "valor de reactividad del tiol" es una caracterización cuantitativa de la reactividad de aminoácidos sin cisteína. El valor de reactividad del tiol es el porcentaje de aminoácidos sin cisteína en un anticuerpo diseñado con cisteína que reacciona con un reactivo de tiol y se convierte en un valor máximo de 1. Por ejemplo, un aminoácido sin cisteína en un anticuerpo diseñado con cisteína que reacciona en el 100% y se produce con un reactivo de tiol, como por ejemplo un reactivo de biotina-maleimido, para formar un anticuerpo marcado con biotina tiene un valor de reactividad del tiol de 1,0. Otro aminoácido diseñado con cisteína en el mismo o en otro anticuerpo parental que reacciona en un 80% y se produce con un reactivo de tiol tiene un valor de reactividad del tiol de 0,8. Otro aminoácido diseñado con cisteína en el mismo o en otro anticuerpo parental que no reacciona con un reactivo de tiol tiene un valor de reactividad del tiol de 0. La determinación del valor de reactividad del tiol de una cisteína determinada puede realizarse mediante el ensayo ELISA, la espectroscopía de masas, la cromatografía líquida, la autorradiografía u otras pruebas analíticas cuantitativas. Los reactivos de tiol que permiten capturar el anticuerpo diseñado con cisteína y comparar y cuantificar la reactividad de la cisteína incluyen biotina-PEO-maleimido ((+)-biotinil-3-maleimidopropionamidil-3,6-dioxaoctainediamino, Oda y col., (2001) *Nature Biotechnology* 19:379-382, Pierce Biotechnology, Inc.) Biotina-BMCC, PEO-Iodoacetil Biotina, Iodoacetil-LC-Biotina y Biotina-HPDP (Pierce Biotechnology, Inc.) y N α -(3-maleimidilpropionilo)biocitina (MPB, Molecular

Probes, Eugene, OR). Otras fuentes comerciales para los reactivos enlazadores de biotinilación, bifuncionales y multifuncionales incluyen Molecular Probes, Eugene, OR, y Sigma, St. Louis, MO

Un "anticuerpo parental" es un anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos en la que se sustituyen uno o más residuos de aminoácidos por uno o más residuos de cisteínas. El anticuerpo parental puede comprender una secuencia de tipo natural o nativa. El anticuerpo parental puede contener cambios preexistentes en las secuencias de aminoácidos (como por ejemplo, adiciones, eliminaciones o sustituciones, o todas las anteriores) con respecto a otra secuencia de tipo natural o nativa, o formas modificadas de un anticuerpo. Un anticuerpo parental puede dirigirse contra un antígeno diana de interés, como por ejemplo, un polipéptido biológicamente importante. También se contemplan los anticuerpos dirigidos contra antígenos no polipéptidos (como los antígenos glicolípidos asociados al tumor; véase patente de EE.UU. N.º 5091178).

Las abreviaturas que se utilizan en la presente memoria descriptiva se definen de la siguiente manera: BME es beta-mercaptoetanol, Boc es N-(t-butoxicarbonil), cit es citrulina (ácido 2-amino-5-ureido pentanóico), dap es dolaproina, DCC es 1,3-diciclohexilcarbodiimida, DCM es diclorometano, DEA es dietilamina, DEAD es dietilazodicarboxilato, DEPC es dietilfosforilcianidato, DIAD es diisopropilazodicarboxilato, DIEA es N,N-diisopropiletilamina, dil es dolaisoleucina, DMA es dimetilacetamida, DMAP es 4-dimetilaminopiridina, DME es etilenglicol dimetil éter (o 1,2-dimetoxietano), DMF es N,N-dimetilformamida, DMSO es dimetilsulfoxido, doe es dolafenina, dov es N,N-dimetilvalina, DTNB es 5,5'-ditiobis(ácido 2-nitrobenzoico), DTPA es ácido dietilenetriaminepentaacético, DTT es ditioneitol, EDCI es hidrocloreuro de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida, EEDQ es 2-etoxi-1-etoxicarbonil-1,2-dihidroquinolina, ES-MS es espectrometría de masas por electrospray, EtOAc es acetato de etilo, Fmoc es N-(9-fluorenilmetoxicarbonil), gly es glicina, HATU es O-(7-azabenzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronium hexafluorofosfato, HOBt es 1-hidroxibenzotriazol, HPLC es cromatografía líquida de alta presión, ile es isoleucina, lys es lisina, MeCN (CH₃CN) es acetonitrilo, MeOH es metanol, Mtr es 4-anisildifenilmetil (o 4-metoxitritil), nor es (1S, 2R)-(+)-norefedrina, PAB es p-aminobenzilcarbamoil, PBS es solución salina fosfatada (pH 7), PEG es polietilenglicol, Ph es fenilo, Pnp es p-nitrofenilo, MC es 6-maleimidocaproil, phe es L-fenilalanina, PyBrop es bromo tris-pirrolidino fosfonium hexafluorofosfato, SEC es cromatografía por exclusión de

tamaño, Su es succinimida, TFA es ácido trifluoroacético, TLC es cromatografía de capa fina, UV es ultravioleta y val es valina.

Un anticuerpo con “maduración de afinidad” es aquél con una o más alteraciones en una o más HVR de éste que dan lugar a una mejora de la afinidad del anticuerpo por el antígeno, en comparación con un anticuerpo parental que no incluye dicha(s) alteración(es). En una forma de realización, un anticuerpo con maduración de afinidad presenta afinidades nanomolares e incluso picomolares para el antígeno diana. Los anticuerpos con maduración de afinidad se producen mediante procedimientos bien conocidos en la materia. En Marks y col., *Bio/Technology*, 10:779-783 (1992), se describe la maduración de afinidad mediante la transposición de los dominios VH y VL. La mutagénesis aleatoria de la HVR y/o los residuos estructurales se describen en: Barbas y col. *Proc Nat. Acad. Sci, USA*, 91:3809-3813 (1994), Schier y col., *Gene*, 169:147-155 (1995), Yelton y col., *J. Immunol.*, 155:1994-2004 (1995), Jackson y col., *J. Immunol.*, 154(7):3310-9 (1995) y Hawkins y col., *J. Mol. Biol.*, 226:889-896 (1992).

Un anticuerpo “de bloqueo” o un anticuerpo “antagonista” es aquel que inhibe o reduce la actividad biológica del antígeno al que se une. Algunos anticuerpos de bloqueo o anticuerpos antagonistas inhiben sustancial o completamente la actividad biológica del antígeno.

En la presente memoria descriptiva, un “anticuerpo agonista” es un anticuerpo que imita al menos una de las actividades funcionales de un polipéptido de interés.

Las “funciones efectoras” de un anticuerpo hacen referencia a aquellas actividades biológicas atribuibles a la región Fc (una región Fc de una secuencia nativa o una región Fc variable de una secuencia aminoacídica) de un anticuerpo y pueden variar con el isotipo del anticuerpo. Los ejemplos de funciones efectoras de un anticuerpo incluyen: La unión de C1q y la citotoxicidad dependiente de complemento, la unión de receptores de Fc, la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC), la fagocitosis, la regulación a la baja de los receptores en la superficie celular (por ejemplo, el receptor de células B) y la activación de las células B.

Los términos “receptor de Fc” o “FcR” describen un receptor que se une a la región Fc de un anticuerpo. En algunas formas de realización, un FcR es un FcR nativo humano. En algunas formas de realización, un FcR es aquel que se une a un anticuerpo IgG (un receptor gamma) e incluye las subclases de

receptores FcγRI, FcγRII y FcγRIII, incluidas las variantes alélicas y las formas con ayuste alternativo de estos receptores. Los receptores FcγRII incluyen el FcγRIIA (un “receptor activador”) y el FcγRIIB (un “receptor inhibidor”), los cuales tienen secuencias de aminoácidos similares que difieren principalmente en sus dominios citoplasmáticos. El receptor activador FcγRIIA contiene en su dominio citoplasmático un motivo activador inmunorreceptor basado en la tirosina (ITAM). El receptor promotor FcγRIIB contiene en su dominio citoplasmático un motivo inhibidor inmunorreceptor basado en la tirosina (ITIM). (Véase Daëron, *Annu. Rev. Immunol.* 15:203-234 (1997)). En Ravetch y Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-92 (1991), Capel y col., *Immunomethods*, 4:25-34 (1994) y de Haas y col., *J. Lab. Clin. Med.*, 126:330-41 (1995) también se revisan los FcRs. Otros FcR, incluidos aquellos que se identifiquen en el futuro, se engloban en el término “FcR” empleado en la presente memoria descriptiva.

El término “receptor Fc” o “FcR” también incluye el receptor neonatal, FcRn, responsable de la transferencia de las IgG maternas al feto (Guyer y col., *J. Immunol.*, 117:587 (1976) y Kim y col., *J. Immunol.*, 24:249 (1994)) y de la regulación de la homeostasis de las inmunoglobulinas. Se conocen los métodos de medición de la unión al FcRn (véase, por ejemplo, Ghetie 1997, Hinton 2004). La unión al FcRn humano *in vivo* y la semivida sérica de los polipéptidos de unión al FcRn humano de alta afinidad pueden analizarse, por ejemplo, en ratones transgénicos o líneas celulares humanas transfectadas que expresan el FcRn humano, o en primates a los que se administran polipéptidos de variante Fc.

El documento WO00/42072 (Presta) describe variantes de anticuerpos con capacidad de unión a los FcRs mejoradas o disminuidas. El contenido de esta publicación de patente se incorpora específicamente a la presente memoria descriptiva a modo de referencia. Véase, además, Shields y col., *J. Biol. Chem.*, 9(2): 6591-6604 (2001).

Las “células efectoras humanas” son leucocitos que expresan uno o más FcRs y realizan funciones efectoras. En determinadas formas de realización, las células expresan al menos el FcγRIII y realizan la función o funciones efectoras de ADCC. Ejemplos de leucocitos humanos que median en la ADCC serían las células mononucleares de la circulación periférica (PBMC), las células asesinas naturales (NK), los monocitos, las células T citotóxicas y los neutrófilos. Las células efectoras se pueden aislar de una fuente nativa, por ejemplo, de la sangre.

La "citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos" o "ADCC" se refiere a una forma de citotoxicidad en la cual una IgG secretada y unida a los receptores Fc (FcR) presentes en determinadas células citotóxicas (por ejemplo, células asesinas naturales (NK), neutrófilos y macrófagos) posibilita que estas células efectoras citotóxicas se unan específicamente a una célula diana que porte un antígeno y, posteriormente, destruyan dicha célula diana con citotoxinas. Las células primarias para mediar en la ADCC, células NK, expresan sólo FcγRIII, mientras que los monocitos expresan FcγRI, FcγRII y FcγRIII. La expresión del FcR en células hematopoyéticas se resume en la Tabla 3 de la página 464 de Ravetch y Kinet, *Annu. Rev. Immunol*, 9:457-92 (1991). A fin de evaluar la actividad de ADCC de una molécula de interés, se puede realizar un ensayo de ADCC *in vitro*, como el que se describe en las patentes de EE.UU. N.º 5.500.362 ó 5.821.337, o se puede realizar el ensayo de Presta que se describe en la patente de EE.UU. N.º 6.737.056. Entre las células efectoras útiles para estos ensayos se encontrarán las células sanguíneas mononucleares periféricas (PBMC) y las asesinas naturales (NK). Como alternativa, o adicionalmente, la actividad de ADCC de la molécula de interés se puede evaluar *in vivo*, por ejemplo, en un modelo animal como el que se desvela en Clynes y col., *PNAS (EE.UU.)* 95:652-656 (1998).

La "citotoxicidad dependiente de complemento" o "CDC" se refiere a la lisis de una célula diana en presencia del complemento. La vía clásica de activación del complemento se inicia por la unión del primer componente del sistema del complemento (C1q) a los anticuerpos (de la subclase apropiada) que están unidos a su antígeno cognado. A fin de evaluar la activación del complemento, se puede efectuar un ensayo de CDC, como por ejemplo, el que se describe en Gazzano-Santoro y col., *J. Immunol. Methods*, 202:163 (1996).

Las variantes polipeptídicas con secuencias aminoacídicas de la región Fc alteradas y capacidad aumentada o disminuida de unión a Cq1 se describen en la patente de EE.UU. N.º 6.194.551B1 y el documento WO99/51642. El contenido de dichas publicaciones de patentes se incorpora específicamente en la presente memoria descriptiva a modo de referencia. Véase, además, Idusogie y col., *J. Immunol.* 164: 4178-4184 (2000).

Por "polipéptido que comprende una región Fc" se entiende un polipéptido, como un anticuerpo o una inmunoadhesina, que comprende una región Fc. La lisina en el extremo C terminal (residuo 447 según el sistema de numeración de

EU) de la región Fc puede eliminarse, por ejemplo, durante la purificación del polipéptido o recombinando el ácido nucleico que codifica el polipéptido. Por lo tanto, una composición que contenga un polipéptido con una región Fc según esta invención puede comprender polipéptidos con el K447, con todos los K447 eliminados, o una mezcla de polipéptidos con el residuo K447 o sin él.

A efectos de la presente memoria descriptiva, una “estructura humana del aceptor” es una estructura que comprende la secuencia aminoacídica de una estructura de VL o VH derivada de una estructura de inmunoglobulinas humanas, o de una estructura de consenso humana. Una estructura humana del aceptor “derivada de” una estructura de inmunoglobulinas humanas o una estructura de consenso humana puede comprender la misma secuencia de aminoácidos de éstas o puede contener cambios preexistentes en la secuencia de aminoácidos. En algunas formas de realización, el número de cambios preexistentes en la secuencia de aminoácidos es 10 o menos, 9 o menos, 8 o menos, 7 o menos, 6 o menos, 5 o menos, 4 o menos, 3 o menos o 2 o menos. En el caso de que haya cambios preexistentes de aminoácidos en una VH, estos cambios, preferentemente, se dan sólo en tres, dos o una de las posiciones 71H, 73H y 78H; por ejemplo, los residuos de aminoácidos en estas posiciones pueden ser 71A, 73T y/o 78A. En una forma de realización, la estructura humana de VL del aceptor tiene una secuencia idéntica a la de la estructura de VL de la inmunoglobulina humana o a la estructura de consenso humana.

Una “estructura de consenso humana” es una estructura que representa los residuos de aminoácidos más frecuentes en una selección de secuencias de estructura de VL o VH de inmunoglobulina humana. Por lo general, la selección de secuencias de VL o VH de inmunoglobulina humana se realiza en un subgrupo de secuencias de dominio variable. Por lo general, el subgrupo de secuencias es un subgrupo como en Kabat y col., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5.^a Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991). En una forma de realización, para VL, el subgrupo es un subgrupo kappa I como en Kabat y col., mencionado anteriormente. En una forma de realización, para VH, el subgrupo es un subgrupo III como en Kabat y col., mencionado anteriormente.

Una “estructura de consenso del subgrupo III de VH” comprende la secuencia de consenso obtenida de las secuencias de aminoácidos en el subgrupo III variable pesado de Kabat y col., mencionado anteriormente. En una

54

forma de realización, la secuencia de aminoácidos de la estructura de consenso del subgrupo III de VH comprende al menos una parte, o la totalidad, de las siguientes secuencias: EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS (FR-H1, identificador de secuencia n.º: 1)-HVR-H1-WVRQAPGKGLEWV (FR-H2, identificador de secuencia n.º: 3)-HVR-H2-RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYC (FR-H3, identificador de secuencia n.º: 5)-HVR-H3-WGQGTLVTVSS (FR-H4, identificador de secuencia n.º: 7).

Una "estructura de consenso del subgrupo I de VL" comprende la secuencia de consenso obtenida de las secuencias de aminoácidos en el subgrupo I kappa variable ligero de Kabat y col., mencionado anteriormente. En una forma de realización, la secuencia de aminoácidos de la estructura de consenso del subgrupo I de VH comprende al menos una parte, o la totalidad, de las siguientes secuencias: DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC (FR-L1, identificador de secuencia n.º: 8)-HVR-L1-WYQQKPGKAPKLLIY (FR-L2, identificador de secuencia n.º: 11)-HVR-L2-GVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYC (FR-L3, identificador de secuencia n.º: 13)-HVR-L3-FGQGGTKVEIK (FR-L4, identificador de secuencia n.º: 15).

Una "secuencia de señal de la secreción" o "secuencia de señal" se refiere a la secuencia de ácido nucleico que codifica un péptido de señal corta que puede utilizarse para dirigir una proteína de interés recientemente sintetizada a través de una membrana celular, generalmente la membrana interna o ambas membranas, tanto la interna como la externa, de las procariotas. Como tal, la proteína de interés, como por ejemplo el polipéptido de cadena pesada o ligera de inmunoglobulina, se secreta en un periplasma de las células huésped procarióticas o en el medio de cultivo. El péptido de señal que se codifica mediante la secuencia de señal de la secreción puede ser endógeno o exógeno para las células huésped, incluyendo los péptidos de señal propios de los polipéptidos que se expresarán. Las secuencias de señal de la secreción generalmente se encuentran presentes en el extremo amino de un polipéptido que se expresará, y por lo general se eliminan enzimáticamente del citoplasma entre la biosíntesis y la secreción de un polipéptido. Por lo tanto, el péptido de señal normalmente no se encuentra presente en una proteína madura.

Por "afinidad de unión" generalmente se entiende la fuerza de la suma total de las interacciones no covalentes entre un único sitio de unión de una molécula (por ejemplo, un anticuerpo) y su molécula de enlace (por ejemplo, un antígeno).

89

A menos que se especifique lo contrario, tal como se usa en la presente memoria descriptiva, por "afinidad de unión" se entiende la afinidad de unión intrínseca que refleja una interacción 1:1 entre miembros de un par de unión (por ejemplo, anticuerpo y antígeno). La afinidad de una molécula X por su molécula de enlace Y se puede representar por lo general mediante la constante de disociación (K_d). La afinidad se puede medir mediante métodos habituales conocidos en la especialidad, incluidos los descritos en la presente memoria descriptiva. Los anticuerpos de baja afinidad suelen unirse al antígeno lentamente y suelen disociarse de inmediato, mientras que los anticuerpos de alta afinidad por lo general se unen al antígeno más rápidamente y suelen permanecer unidos durante más tiempo. Existen diversos métodos para medir la afinidad de unión conocidos en la especialidad y todos ellos se pueden utilizar para los fines de la presente invención. A continuación, se describen, a modo de ejemplo, formas de realización específicas.

En una forma de realización, el " K_d " o el "valor K_d " según esta invención se mide mediante un ensayo de unión a antígeno radiomarcado (RIA) realizado con la versión Fab de un anticuerpo de interés y su antígeno, como se describe en el siguiente ensayo. La afinidad de unión en solución de Fab a antígenos se mide equilibrando los Fab con una concentración mínima del antígeno marcado (^{125}I) en presencia de una serie de titulación de antígeno no marcado y, después, capturando el antígeno unido con una placa de anticuerpo de revestimiento anti-Fab (Chen, y col., (1999) *J. Mol Biol* 293:865-881). Para establecer las condiciones del ensayo, las placas de microtitulación (Dynex) se recubren durante toda la noche con 5 $\mu\text{g/ml}$ de un anticuerpo anti-Fab de captura (Cappel Labs) en 50 mM de carbonato sódico (pH 9,6) y, a continuación, se bloquean con 2% (p/v) de albúmina de suero bovino en PBS durante dos a cinco horas a temperatura ambiente (23 °C aproximadamente). En una placa no adsorbente (Nunc n.º 269620), 100 pM o 26 pM de antígeno marcado con [^{125}I] se mezclan con diluciones seriadas de un Fab de interés (por ejemplo, que concuerde con la evaluación del anticuerpo anti-VEGF, Fab-12, en Presta y col., (1997) *Cancer Res.* 57:4593-4599). A continuación, el Fab de interés se incuba durante toda la noche; no obstante, la incubación puede continuar durante más tiempo (por ejemplo, aproximadamente 65 horas) para garantizar que se alcance el equilibrio. Después, las mezclas se transfieren a la placa de captura para su incubación a temperatura ambiente (por ejemplo, durante una hora). A continuación, se extrae

la solución y se lava la placa ocho veces con Tween-20 al 0,1% en PBS. Una vez secas las placas, se añaden 150 µl/pocillo de centelleador (MicroScint-20; Packard) y las placas se cuentan en un contador gamma Topcount (Packard) durante diez minutos. Se eligen concentraciones de cada Fab que proporcionen menos o igual del 20% de unión máxima para utilizarlas en ensayos de unión competitivos.

Según otra forma de realización, el Kd o valor Kd se mide utilizando análisis de resonancia plasmón de superficie que usa BIAcoreTM-2000 o BIAcoreTM-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, New Jersey) a 25 °C con chips CM5 de antígeno inmovilizado a ~10 unidades de respuesta (RU). Los biosensores de dextrano carboximetilado (CM5, BIAcore Inc) se activan con clorhidrato de N-etil-N'- (3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC) y N-hidroxisuccinimida (NHS), según las instrucciones del proveedor. El antígeno se diluye con 10 mM de acetato sódico, pH 4,8, a 5 µg/ml (~0,2 µM) antes de la inyección a un caudal de 5 µl/minuto para lograr aproximadamente 10 unidades de respuesta (RU) de la proteína emparejada. Tras la inyección del antígeno, se inyecta 1 M de etanolamina para bloquear grupos no reaccionados. Para mediciones cinéticas, se inyecta el doble de diluciones seriadas de Fab (0,78 nM a 500 mM) en PBS con 0,05% de Tween 20 (PBST) a 25 °C a un caudal de 25 µl/min aproximadamente. Las tasas de asociación (k_{on}) y las tasas de disociación (k_{off}) se calculan utilizando un sencillo modelo de unión uno a uno de Langmuir (BIAcore Evaluation Software, versión 3.2) al encajar simultáneamente los sensogramas de asociación y disociación. La constante de disociación de equilibrio (Kd) se calcula como el cociente k_{off}/k_{on} . Véase, por ejemplo, Chen, Y., y col., (1999) *J. Mol Biol* 293:865-881. Si la tasa de asociación excede de $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ según el ensayo de resonancia plasmón de superficie mencionado anteriormente, la tasa de asociación se puede determinar utilizando una técnica de absorción fluorescente que mide el aumento o disminución de la intensidad de la emisión de fluorescencia (excitación = 295 nm; emisión = 340 nm, 16 nm de frecuencia) a 25 °C de 20 nM de un anticuerpo anti-antígeno (forma Fab) en PBS, pH 7,2, en presencia de concentraciones cada vez más elevadas de antígeno según medición en un espectrómetro, como un espectrómetro equipado con módulo "stop-flow" (interruptor de flujo) (Aviv Instruments) o un espectrómetro SLM-Aminco serie 8000 (ThermoSpectronic) con una cubeta con agitador.

También se puede determinar una “tasa de asociación” o “ k_{on} ” según esta invención como se describe anteriormente, utilizando un sistema BIAcoreTM-2000 o un sistema BIAcoreTM-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ).

Un “trastorno” es un proceso o enfermedad que se beneficiaría del tratamiento con una sustancia/molécula o método de la invención. Esto implica trastornos crónicos y agudos, incluidos los procesos patológicos que predisponen al mamífero al trastorno en cuestión. Algunos ejemplos, entre otros, de los trastornos que se tratarán en la presente memoria descriptiva incluyen condiciones cancerosas tales como los trastornos proliferativos de células B o los tumores de las células B, o ambos, por ejemplo, linfoma, linfoma no Hodgkins (LNH), LNH refractario, LNH indolente refractario, leucemia linfocítica crónica (LLC), linfoma linfocítico de células pequeñas, leucemia, leucemia de células pilosas (LCP), leucemia linfocítica aguda (LLA) y linfoma de células del manto.

Los términos “trastorno de la proliferación celular” y “trastorno de la proliferación” se refieren a trastornos asociados a algún grado de proliferación celular anómala. En una forma de realización, el trastorno de la proliferación celular es un cáncer.

En la presente memoria descriptiva, por “tumor” se entiende todo crecimiento y proliferación celular neoplásica, tanto benigna como maligna, así como todas las células y tejidos cancerosos y precancerosos. Tal y como se usan en la presente memoria descriptiva, los términos “cáncer”, “cancerígeno”, “trastorno de proliferación celular”, “trastorno de proliferación” y “tumor” no se excluyen mutuamente.

Los términos “cáncer” y “cancerígeno” describen o se refieren al estado fisiológico de los mamíferos típicamente caracterizado por un crecimiento/proliferación celular no regulado. Los ejemplos de cáncer incluyen, entre otros, trastornos proliferativos de células B que se seleccionan a partir del linfoma, linfoma no Hodgkins (LNH), LNH agresivo, LNH agresivo recurrente, LNH indolente recurrente, LNH refractario, LNH indolente refractario, leucemia linfocítica crónica (LLC), linfoma linfocítico de células pequeñas, leucemia, leucemia de células pilosas (LCP), leucemia linfocítica aguda (LLA) y linfoma de células del manto. Otros ejemplos de cáncer son carcinoma, linfoma (por ejemplo, linfoma de Hodgkin y linfoma no Hodgkin), blastoma, sarcoma y leucemia. Ejemplos más concretos de estas clases de cáncer son el cáncer de células escamosas, el cáncer de células pulmonares pequeñas, el

adenocarcinoma pulmonar, el carcinoma pulmonar escamoso, el cáncer de peritoneo, el cáncer hepatocelular, el cáncer gastrointestinal, el cáncer pancreático, el glioma, el cáncer de cuello uterino, el cáncer de ovario, el cáncer de hígado, el cáncer de vejiga, el hepatoma, el cáncer de mama, el cáncer de colon, el cáncer colorrectal, el carcinoma endometrial o uterino, el carcinoma de las glándulas salivales, el cáncer de riñón, el cáncer de hígado, el cáncer de próstata, el cáncer vulval, el cáncer de tiroides, el carcinoma hepático, la leucemia y otros trastornos linfoproliferativos y diversos tipos de cáncer de cabeza y cuello.

En la presente memoria descriptiva, una "neoplasia maligna de las células B" incluye el linfoma no Hodgkin (LNH), incluyendo LNH folicular de bajo grado, LNH linfocítico de célula pequeña (SL), LNH folicular de grado intermedio, LNH difuso de grado intermedio, LNH inmunoblástico de grado alto, LNH linfoblástico de grado alto, LNH de células pequeñas no divididas de alto grado, LNH voluminoso, linfoma de células del manto, linfoma relacionado con el SIDA, macroglobulinemia de Waldenstrom, linfoma no Hodgkin (LNH), enfermedad de Hodgkin con predominio linfocítico (EHPL), linfoma linfocítico de células pequeñas (LLCP), leucemia linfocítica crónica (LLC), LNH indolente, incluyendo LNH indolente recurrente y LNH indolente resistente a rituximab, leucemia, incluyendo leucemia linfoblástica aguda (LLA), leucemia linfocítica crónica (LLC), leucemia de células pielosas, leucemia mieloblástica crónica, linfoma de células del manto y otros tumores hematológicos. Dichos tumores pueden tratarse con anticuerpos dirigidos contra los marcadores de la superficie de células B, como los CD22. Estas enfermedades que se consideran en la presente memoria descriptiva se tratan mediante la administración de un anticuerpo dirigido contra un marcador de la superficie de células B, tal como el CD22 e incluye la administración de un anticuerpo no conjugado ("desnudo") o un anticuerpo conjugado con un agente citotóxico, tal como se describe en la presente memoria descriptiva. Las enfermedades que se consideran en la presente memoria descriptiva también se tratan mediante una terapia combinada que incluye un anticuerpo anti-CD22 o un conjugado de anticuerpo anti-CD22 con fármacos de la invención combinado con otro anticuerpo o conjugado de anticuerpo con fármaco, otro agente citotóxico, radiación u otro tratamiento administrado simultáneamente o en serie. Un método de tratamiento ejemplar de la invención es un anticuerpo anti-CD22 de la invención que se administra en combinación con un anticuerpo anti-CD20, una inmunoglobulina o un fragmento de unión a CD20 del anticuerpo, ya sea en

conjunto o de manera secuencial. El anticuerpo anti-CD20 puede ser un anticuerpo desnudo o un conjugado de anticuerpo con fármacos. En una forma de realización de la terapia combinada, el anticuerpo anti-CD22 es un anticuerpo de la presente invención y el anticuerpo anti-CD20 es Rituxan® (rituximab).

El término "linfoma no Hodgkin" o "LNH", como se emplea en la presente memoria descriptiva, se refiere a un cáncer del sistema linfático que no son linfomas de Hodgkin. Los linfomas de Hodgkin se pueden diferenciar generalmente de los linfomas no Hodgkin por la presencia de células de Reed-Sternberg en los linfomas de Hodgkin y por la ausencia de dichas células en los linfomas no Hodgkin. Los ejemplos de linfomas no Hodgkin englobados por este término según se utiliza en la presente memoria descriptiva incluyen cualquiera que un experto en la materia pudiera identificar como tal (por ejemplo un oncólogo o un patólogo) según los esquemas de clasificación conocidos en la materia, como el esquema REAL (siglas en inglés de Revised European-American Lymphoma [Linfoma revisado europeo-americano]) según se describe en el *Atlas en Color de Hematología Clínica* (3.^a edición), A. Victor Hoffbrand y John E. Pettit (eds.) (Harcourt Publishers Ltd., 2000). Véanse, en particular, las listas en las figuras 11.57, 11.58 y 11.59. Otros ejemplos más específicos incluyen, entre otros, LNH refractario o recurrente, LNH de bajo grado con tratamiento de primera línea, LNH en fase III/IV, LNH resistente a quimioterapia, leucemia y/o linfoma linfoblástico de células B precursoras, linfoma linfocítico de células pequeñas, leucemia linfocítica crónica de células B y/o leucemia prolinfocítica y/o linfoma linfocítico de células pequeñas, linfoma prolinfocítico de células B, inmunocitoma y/o linfoma linfoplasmacítico, linfoma linfoplasmacítico, linfoma de células B de zona marginal, linfoma esplénico de zona marginal, linfoma de zona marginal extranodal (MALT), linfoma de zona marginal nodal, leucemia de células pilosas, plasmacitoma y/o mieloma de células plasmáticas, linfoma folicular de bajo grado, LNH folicular de grado intermedio, linfoma de células del manto, linfoma del centro de los folículos (folicular), LNH difuso de grado intermedio, linfoma difuso de células B de gran tamaño, LNH agresivo (incluido LNH agresivo con tratamiento de primera línea y LNH agresivo recurrente), LNH recurrente después o refractario al autotrasplante de células madre, linfoma primario mediastinal de células B de gran tamaño, linfoma primario con derrame, LNH inmunoblástico de grado alto, LNH linfoblástico de grado alto, LNH de células pequeñas no divididas de grado alto, LNH voluminoso, linfoma de Burkitt, leucemia linfocítica granular amplia

precursora (periférica), micosis fungoide y/o síndrome de Sezary, linfomas cutáneos, linfoma de células pequeñas anaplásicas, linfoma angiocéntrico.

En la presente memoria descriptiva, una "enfermedad autoinmune" es una enfermedad o un trastorno que se genera en, y se dirige contra, los propios tejidos u órganos de un individuo, un cosegregado o una manifestación de éste o un estado resultante de todo ello. En muchos de estos trastornos autoinmunes e inflamatorios pueden existir una serie de marcadores de laboratorio y clínicos, incluyendo, entre otros, hipergamaglobulinemia, altos niveles de autoanticuerpos, depósitos de complejos de antígeno-anticuerpo en los tejidos, beneficios de los tratamientos con corticosteroides o inmunosupresores y agregados de células linfoides en tejidos afectados. Sin limitarse a ninguna teoría relacionada con las enfermedades autoinmunes mediadas por células B, se cree que las células B demuestran un efecto patogénico en las enfermedades autoinmunes humanas mediante diversos mecanismos, incluyendo la producción de autoanticuerpos, la formación de complejos inmunes, la activación dendrítica y de células T, la síntesis de citoquinas, la eliminación directa de quimioquinas; también se cree que estas células proporcionan un nido para la neolinfogénesis ectópica. Cada uno de estos mecanismos puede participar en diferentes grados en la patología de las enfermedades autoinmunes.

La "enfermedad autoinmune" puede ser una enfermedad de un órgano específico (es decir, la respuesta inmune se dirige específicamente contra un sistema orgánico tal como el sistema endocrino, el sistema hematopoyético, la piel, el sistema cardiopulmonar, los sistemas gastrointestinales y hepáticos, el sistema renal, las tiroides, los oídos, el sistema neuromuscular, el sistema nervioso central, etc.) o una enfermedad sistémica que puede afectar muchos sistemas orgánicos (por ejemplo, lupus sistémico eritematoso (LSE), artritis reumatoide, polimiositis, etc.). Dichas enfermedades preferentes incluyen trastornos reumatológicos autoinmunes (como por ejemplo, artritis reumatoide, síndrome de Sjögren, escleroderma, lupus tal como el LSE y el lupus nefrítico, polimiositis/dermatomiositis, crioglobulinemia, síndrome de anticuerpos antifosfolípidos y artritis psoriásica), trastornos gastrointestinales y hepáticos autoinmunes (como por ejemplo, enfermedad intestinal inflamatoria (por ejemplo, la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa), gastritis autoinmune y anemia perniciosa, hepatitis autoinmune, cirrosis biliar primaria, colangitis esclerosante primaria y enfermedad celíaca), vasculitis (como por ejemplo, vasculitis ANCA

91.

negativa y vasculitis asociada a ANCA, incluyendo vasculitis de Churg-Strauss, granulomatosis de Wegener y poliangéitis microscópica), trastornos neurológicos autoinmunes (como por ejemplo, esclerosis múltiple, síndrome opsoclonomioclono, síndrome de mioclono, miastenia gravis, neuromielitis óptica, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer y polineuropatías autoinmunes), trastornos renales (como por ejemplo, glomerulonefritis, síndrome de Goodpasture y enfermedad de Berger), trastornos dermatológicos autoinmunes (como por ejemplo, psoriasis, urticaria, pénfigo vulgar, pénfigoide buloso y lupus eritematoso cutáneo), trastornos hematológicos (como por ejemplo, púrpura trombocitopénica, púrpura trombocitopénica trombótica, púrpura postransfusional y anemia hemolítica autoinmune), aterosclerosis, uveítis, enfermedades hipoacúsicas autoinmunes (como por ejemplo, enfermedad del oído interno y pérdida auditiva), enfermedad de Behcet, síndrome de Raynaud, trasplante de órganos, y enfermedades endocrinas autoinmunes (como por ejemplo, enfermedades autoinmunes relacionadas con la diabetes tales como la diabetes mellitus dependiente de la insulina (IDDM), enfermedad de Addison y enfermedad tiroidea autoinmune (por ejemplo, enfermedad de Graves y tiroiditis)). Las enfermedades más preferentes incluyen, por ejemplo, artritis reumatoide, colitis ulcerosa, vasculitis asociada a ANCA, lupus, esclerosis múltiple, síndrome de Sjögren, enfermedad de Graves, IDDM, anemia perniciosa, tiroiditis y glomerulonefritis.

Los ejemplos específicos de otras enfermedades autoinmunes, tal y como se definen en la presente memoria descriptiva que, en algunos casos, abarcan aquellas que se mencionaron anteriormente, incluyen, entre otras, artritis (aguda y crónica, artritis reumatoide incluyendo artritis reumatoide de inicio juvenil y etapas tales como sinovitis reumatoide, gota o artritis gotosa, artritis inmunológica aguda, artritis inflamatoria crónica, artritis degenerativa, artritis inducida por colágeno tipo II, artritis infecciosa, artritis de Lyme, artritis proliferativa, artritis psoriásica, enfermedad de Still, artritis vertebral, osteoartritis, artritis crónica progrediente, artritis deformante, poliartritis crónica primaria, artritis reactiva, artritis menopáusica, artritis que reduce los estrógenos y espondilitis anquilosante/reumatoide), enfermedad linfoproliferativa autoinmune, enfermedades de la piel hiperproliferativas e inflamatorias, psoriasis tal como psoriasis en placa, psoriasis gutatta, psoriasis pustular y psoriasis de las uñas, atopía, incluyendo enfermedades atópicas como la fiebre del heno y el síndrome

de Job, dermatitis, incluyendo dermatitis por contacto, dermatitis por contacto crónica, dermatitis exfoliativa, dermatitis alérgica, dermatitis por contacto alérgica, urticaria, dermatitis herpetiforme, dermatitis numular, dermatitis seborreica, dermatitis no específica, dermatitis por contacto irritante primaria, y dermatitis atópica, síndrome de hiper IgM ligado al x, enfermedades intraoculares alérgicas e inflamatorias, urticaria tal como urticaria alérgica crónica y urticaria idiopática crónica, incluyendo urticaria crónica autoinmune, miositis, polimiositis/dermatomiositis, dermatomiositis juvenil, necrosis epidérmica tóxica, escleroderma (incluyendo escleroderma sistémica), esclerosis tal como esclerosis sistémica, esclerosis múltiple (EM) tal como EM espino-óptica, EM progresiva primaria (EMPP) y EM recurrente remitente (EMRR), esclerosis sistémica progresiva, aterosclerosis, arteriosclerosis, esclerosis diseminada, esclerosis atáxica, neuromielitis óptica (NMO), enfermedad intestinal inflamatoria (EII) (por ejemplo, enfermedad de Crohn, enfermedades intestinales de origen autoinmune, inflamación gastrointestinal, colitis como colitis ulcerativa, colitis ulcerosa, colitis microscópica, colitis colagenosa, colitis poliposa, enterocolitis necrotizante y colitis transmural, y enfermedad intestinal inflamatoria autoinmune), inflamación intestinal, pioderma gangrenoso, eritema nodoso, colangitis esclerosante primaria, síndrome de trastorno respiratorio, incluyendo síndrome de trastorno respiratorio adulto o agudo (STRAA), meningitis, inflamación de toda o parte de la úvea, iritis, coroiditis, un trastorno hematológico autoinmune, enfermedades de injerto contra huésped, angioedema tal como angioedema hereditario, daño del nervio craneal como en el caso de la meningitis, herpes gestationis, penfigoide gestationis, prurito de escroto, insuficiencia ovárica prematura autoinmune, hipoacusia súbita debido a una afección autoinmune, enfermedades mediadas por IgE tales como anafilaxia y rinitis alérgica y atópica, encefalitis como encefalitis de Rasmussen, encefalitis límbica y/o encefálica, uveítis, como uveítis anterior, uveítis anterior aguda, uveítis granulomatosa, uveítis no granulomatosa, uveítis facoantigénica, uveítis posterior o uveítis autoinmune, glomerulonefritis (GN) con y sin síndrome nefrótico como glomerulonefritis crónica o aguda tal como GN primaria, GN de origen inmune, GN membranosa (nefropatía membranosa), GN membranosa idiopática o nefropatía membranosa idiopática, GN de membrana o membranosa proliferativa (GNMP), incluyendo Tipo I y Tipo II, y GN progresiva rápida (GNPR), nefritis proliferativa, insuficiencia poliglandular endocrina autoinmune, balanitis incluyendo balanitis circunscrita plasmocelular, balanopostitis, eritema anular



centrífuga, eritema discrómico perstans, eritema multiforme, granuloma anular, liquen nitidus, liquen escleroso y atrófico, liquen simple crónico, liquen espinuloso, liquen plano, ictiosis laminar, hiperqueratosis epidermolítica, queratosis premaligna, pioderma gangrenosa, afecciones y respuestas alérgicas, alergias a los alimentos, alergias a los fármacos, alergias a los insectos, enfermedades alérgicas poco frecuentes tales como mastocitosis, reacción alérgica, eccema, incluyendo eccema alérgico o atópico, eccema asteatótico, eccema dishidrótico y eccema vesicular palmoplantar, asma tal como asma bronquial y asma autoinmune, afecciones que implican infiltración de células T y respuestas inflamatorias crónicas, reacciones inmunes contra antígenos extraños tales como grupos sanguíneos fetales A-B-O durante el embarazo, enfermedad inflamatoria pulmonar crónica, miocarditis autoinmune, deficiencia de adhesión leucocitaria, lupus, incluyendo nefritis, cerebritis, lupus pediátrico, lupus no renal, lupus extra renal, lupus discoide y lupus discoide eritematoso, alopecia, LSE tal como LSE cutáneo o LSE cutáneo subagudo, síndrome de lupus neonatal (SLN) y lupus eritematoso diseminado, diabetes mellitus de inicio juvenil (Tipo I), incluyendo IDDM pediátrico, diabetes mellitus de inicio adulto (diabetes Tipo II), diabetes autoinmune, diabetes insípida idiopática, retinopatía diabética, nefropatía diabética, colitis diabética, alteración de las grandes arterias diabética, respuestas inmunes asociadas a hipersensibilidad aguda y retardada mediada por citocinas y linfocitos T, tuberculosis, sarcoidosis, granulomatosis incluyendo granulomatosis linfomatoide, agranulocitosis, vasculitis (incluyendo vasculitis de grandes vasos tal como polimialgia reumática y células gigantes (artritis de Takayasu arteritis), vasculitis de vasos medianos tal como enfermedad de Kawasaki y poliarteritis nodosa/periarteritis nodosa, ovasculitis inmune, vasculitis del SNC, vasculitis cutánea, vasculitis por hipersensibilidad, vasculitis necrotizante tal como vasculitis necrotizante fibrinoide y vasculitis necrotizante sistémica, vasculitis ANCA negativa y vasculitis asociada a ANCA tal como el síndrome de Churg-Strauss (SCS), granulomatosis de Wegener y poliangiitis microscópica), arteritis temporal, anemia aplásica, anemia aplásica autoinmune, anemia positiva de Coombs, anemia de Diamond Blackfan, anemia hemolítica o anemia hemolítica inmune, incluyendo anemia hemolítica autoinmune (AIHA), anemia perniciosa, enfermedad de Addison, la aplasia de glóbulos rojos puros (PRCA), deficiencia del factor VIII, hemofilia A, neutropenia autoinmune, citopenias tales como pancitopenia, leucopenia, enfermedades relacionadas con diapédesis leucocitaria, trastorno

inflamatorio del SNC, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, síndrome de lesiones de múltiples órganos como los secundarios a septicemias, traumas o hemorragias, enfermedades mediadas por complejos antígeno-anticuerpo, enfermedad de membrana basal antiglomerular, síndrome de anticuerpos antifosfolípidos, motoneuritis, neuritis alérgica, síndrome/enfermedad de Behçet, síndrome de Castleman, síndrome de Goodpasture, síndrome de Reynaud, síndrome de Sjögren, síndrome de Stevens-Johnson, penfigoide tal como penfigoide buloso, penfigoide cicatricial (membrana mucosa), penfigoide dérmico, penfigoide vulgar, penfigoide paraneoplásico, penfigoide foliáceo, pénfigo de membrana mucosa penfigoide y pénfigo eritematoso, epidermólisis bulosa adquirida, inflamación ocular, inflamación ocular preferentemente alérgica tal como conjuntivitis alérgica, enfermedad bulosa IgA linear, inflamación conjuntival inducida y autoinmune, poliendocrinopatías autoinmunes, enfermedad o síndrome de Reiter, lesión térmica debido a una afección autoinmune, preclampsia, trastorno por inmunocomplejos tal como nefritis por inmunocomplejo, nefritis mediada por anticuerpos, trastornos neuroinflamatorios, polineuropatías, neuropatía crónica tal como polineuropatías IgM o neuropatías con mediación de IgM, trombocitopenia (tal como la desarrollan los pacientes con infarto de miocardio, por ejemplo), incluyendo púrpura trombótica trombocitopánica (TTP), púrpura postransfusional (PTF), trombocitopenia inducida por heparina y trombocitopenias inmunes y autoinmunes incluyendo, por ejemplo, púrpura trombocitopánica idiopática (PTI) incluida PTI crónica o aguda, escleritis tal como queratoescleritis idiopática, episcleritis, enfermedad autoinmune de los testículos y ovarios, incluyendo orquitis y ooforitis autoinmunes, hipotiroidismo primario, hipoparatiroidismo, enfermedades endocrinas autoinmunes, incluyendo tiroiditis tal como tiroiditis autoinmune, enfermedad de Hashimoto, tiroiditis crónica (tiroiditis de Hashimoto) o tiroiditis subaguda, enfermedad de tiroides autoinmune, hipotiroidismo idiopático, enfermedad de Grave, enfermedad ocular de Grave (oftalmopatía u oftalmopatía asociada a las tiroides), síndromes poliglandulares tales como síndromes poliglandulares autoinmunes, por ejemplo, tipo I (o síndromes poliglandulares endocrinopáticos), síndromes paraneoplásicos, incluyendo síndromes paraneoplásicos neurológicos tales como síndrome miasténico de Lambert-Eaton o síndrome de Eaton-Lambert, síndrome de rigidez muscular, encefalomiелitis tal como encefalomiелitis alérgica o encefalomiелitis alérgica experimental (EAE), miastenia gravis tal como miastenia gravis asociada

99

a timoma, degeneración cerebelar, neuromiotonía, opsoclono o síndrome de opsoclono mioclono (SOM) y neuropatía sensorial, neuropatía motora multifocal, síndrome de Sheehan, hepatitis autoinmune, hepatitis crónica, hepatitis lupoide, hepatitis de células gigantes, hepatitis activa crónica o hepatitis activa crónica autoinmune, neumonitis tal como neumonitis intersticial linfoide (NIL), bronquiolitis obliterante (sin transplante) frente a NSIP, síndrome de Guillain-Barré, enfermedad de Berger (nefropatía por IgA), nefropatía por IgA idiopática, dermatosis por IgA linear, dermatosis neutrofílica febril aguda, dermatosis pustular subcorneal, dermatosis acantolítica transitoria, cirrosis tal como cirrosis biliar primaria y neumonocirrosis, síndrome enteropático autoinmune, enfermedad celíaca o coeliaca, esprue celíaco (enteropatía por gluten), esprue refractario, esprue idiopático, crioglobulinemia tal como crioglobulinemia mixta, esclerosis lateral amiotrófica (ELA; enfermedad de Lou Gehrig), enfermedad arterial coronaria, enfermedad del oído autoinmune tal como enfermedad del oído interno autoinmune (EOIA), pérdida auditiva autoinmune, policondritis como policondritis refractaria o recurrente, proteinosis alveolar pulmonar, queratitis tal como síndrome de Cogan/queratitis intersticial no sifilítica, parálisis de Bell, enfermedad/síndrome de Sweet, rosácea autoinmune, dolor asociado al zóster, amiloidosis, linfocitosis no cancerígena, linfocitosis primaria, que incluye linfocitosis de las células B monoclonales (por ejemplo, gamapatía monoclonal benigna y gamapatía monoclonal de significancia indeterminada, MGUS), neuropatía periférica, síndrome paraneoplásico, canelopatías tales como epilepsia, migraña, arritmia, trastornos musculares, sordera, ceguera, parálisis periódica y canelopatías del SNC, autismo, miopatía inflamatoria, focal o segmental, o glomeruloesclerosis focal segmental (GEFS), oftalmopatía endocrina, uveorretinitis, coriorretinitis, trastorno hepatológico autoinmune, fibromialgia, insuficiencia endocrina múltiple, síndrome de Schmidt, adrenalitis, atrofia gástrica, demencia presenil, enfermedades de desmielinización tales como enfermedades desmielinizantes y autoinmunes y polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica, síndrome de Dressler, alopecia areata, alopecia total, síndrome de CREST (calcinosis, fenómeno de Raynaud, dismotilidad esofágica, esclerodactilia y telangiectasia), esterilidad masculina y femenina autoinmune debido a, por ejemplo, anticuerpos antiespermatozoides, enfermedad mixta del tejido conjuntivo, enfermedad de Chagas, fiebre reumática, aborto recurrente, pulmón del granjero, eritema multiforme, síndrome de poscardiotomía, síndrome

de Cushing, pulmón del cuidador de aves, angeítis granulomatosa alérgica, angeítis linfocítica benigna, síndrome de Alport, alveolitis como alveolitis alérgica y alveolitis fibrosa, enfermedad pulmonar intersticial, reacciones de transfusión, lepra, malaria, enfermedades parásiticas tales como leishmaniasis, quipanosomiasis, esquistosomiasis, ascariasis, aspergilosis, síndrome de Sampter, síndrome de Caplan, dengue, endocarditis, fibrosis endomiocárdica, fibrosis pulmonar intersticial difusa, fibrosis pulmonar intersticial, mediastinitis fibrosa, fibrosis pulmonar, fibrosis pulmonar idiopática, fibrosis cística, endoftalmitis, eritema elevado diutinum, eritroblastosis fetal, fascitis eosinófila, síndrome de Shulman, síndrome de Felty, flariasis, ciclitis, como la ciclitis crónica, la ciclitis heterocrónica, iridociclitis (aguda o crónica) o ciclitis de Fuch, púrpura de Henoch-Schonlein, infección por el virus de inmunodeficiencia humana (VIH), SCID, síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), infección por ecovirus, sepsis (síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SRIS)), endotoxemia, pancreatitis, tiroxicosis, infección por parvovirus, infección por el virus de la rubéola, síndromes de posvacunación, infección por rubéola congénita, infección por el virus de Epstein-Barr, paperas, síndrome de Evan, disfunción gonadal autoinmune, corea de Sydenham, nefritis posestreptocócica, tromboangitis obliterante, tirotoxicosis, tabes dorsal, corioiditis, polimialgia de células gigantes, neumonitis hipersensible crónica, conjuntivitis, tal como catarro vernal, queratoconjuntivitis seca y queratoconjuntivitis epidémica, síndrome nefrítico idiopático, nefropatía de cambio mínimo, lesión por reperfusión isquémica benigna familiar, reperfusión de órganos transplantados, autoinmunidad retiniana, inflamación de las articulaciones, bronquitis, enfermedad respiratoria obstructiva crónica, silicosis, afta, estomatitis aftosa, trastornos arterioescleróticos (insuficiencia cerebrovascular) tal como encefalopatía arteriosclerótica y retinopatía arteriosclerótica, aspermiogénesis, hemolisis autoinmune, enfermedad de Boeck, crioglobulinemia, contractura de Dupuytren, endoftalmia facoanafiláctica, enteritis alérgica, eritema nodoso leproso, parálisis facial idiopática, síndrome de fatiga crónica, fiebre reumática, enfermedad de Hamman-Rich, pérdida auditiva sensorial, hemoglobinuria paroxismática, hipogonadismo, ileítis regional, leucopenia, mononucleosis infecciosa, mielitis transversa, mixedema idiopático primario, nefrosis, oftalmia simpática, oftalmitis neonatal, neuritis óptica, orquitis granulomatosa, pancreatitis, polirradiculitis aguda, pioderma gangrenoso, tiroiditis de Quervain, atrofia esplénica adquirida,

timoma no maligno, tinitis linfololular, vitiligo, índrome de choque tóxico, intoxicación alimentaria, afecciones que implican infiltración de células T, deficiencia de adhesión leucocitaria, respuestas inmunes asociadas con hipersensibilidad aguda y recurrente mediada por citoquinas y linfocitos T, enfermedades que implican diapédesis leucocitaria, síndrome de lesión orgánica múltiple, enfermedades mediadas por complejos antígeno-anticuerpo, enfermedad de la membrana basal antiglomerular, poliendocrinopatías autoinmunes, ooforitis, mixedema primario, gastritis atrófica autoinmune, enfermedades reumáticas, enfermedad del tejido conectivo mixta, síndrome nefrótico, insulitis, insuficiencia poliendocrina, síndrome poliglandular autoinmune, incluyendo síndrome poliglandular tipo I, hipoparatiroidismo de inicio en adultos idiopático (HIAI), cardiomiopatía como cardiomiopatía dilatada, epidermolisis bullosa adquirida (EBA), hemocromatosis, miocarditis, síndrome nefrótico, colangitis esclerosante primaria, sinusitis purulenta o no purulenta, sinusitis aguda o crónica, sinusitis etmoidea, frontal, maxilar o esenoidea, sinusitis alérgica, trastorno relacionado con los eosinófilos como eosinofilia, eosinofilia por infiltración pulmonar, síndrome de eosinofilia-mialgia, síndrome de Loffler, neumonía eosinofílica crónica, eosinofilia pulmonar tropical, aspergilosis bronconeumónica, aspergiloma o granulomas con eosinófilos, anafilaxis, espondiloartropatía, espondiloartritis seronegativa, enfermedad autoinmune poliendocrina, colangitis esclerosante, esclera, episclera, candidiasis mucocutánea crónica, síndrome de Bruton, hipogammaglobulinemia temporal de la infancia, síndrome de Wiskott-Aldrich, ataxia telangiectasia, angiectasias, trastornos autoinmunes asociados con enfermedades del colágeno, reumatismo como artroreumatismo crónico, linfadenitis, reducción de la respuesta a la presión sanguínea, disfunción vascular, daño tisular, isquemia cardiovascular, hiperalgesia, isquemia renal, isquemia cerebral y enfermedad que acompaña a la vascularización, trastornos por hipersensibilidad alérgica, glomerulonefritis, lesión por reperfusión, trastorno por reperfusión siquémica, lesión por reperfusión del miocardio u otros tejidos, traqueobronquitis linfomatosa, dermatosis inflamatoria, dermatosis con componentes inflamatorios agudos, fallo multiorgánico, enfermedades bulosas, necrosis cortical renal, meningitis purulenta aguda u otros trastornos inflamatorios del sistema nervioso central, trastornos inflamatorios oculares y orbitales, síndromes granulocíticos asociados a la transfusión, toxicidad inducida por citoquinas, narcolepsia, inflamación grave aguda, inflamación crónica sin

tratamiento, pielitis, hiperplasia endarterial, úlcera péptica, valvulitis y endometriosis. Estas enfermedades que se consideran en la presente memoria descriptiva se tratan mediante la administración de un anticuerpo que se une a un marcador de la superficie de células B tal como el CD22 e incluye la administración de un anticuerpo no conjugado (“desnudo”) o un anticuerpo conjugado con un agente citotóxico, tal como se describe en la presente memoria descriptiva. Las enfermedades que se consideran en la presente memoria descriptiva también se tratan mediante una terapia combinada que incluye un anticuerpo anti-CD22 o un conjugado de anticuerpo anti-CD22 con fármacos de la invención combinado con otro anticuerpo o conjugado de anticuerpo con fármaco, otro agente citotóxico, radiación u otro tratamiento administrado simultáneamente o en serie.

En la presente memoria descriptiva, “tratamiento” (y variaciones de dicho término, como “tratar” o “tratados”) se refiere una intervención clínica en un intento de alterar el proceso natural del individuo o célula tratada y se puede realizar como prevención o durante la evolución de la enfermedad. Son efectos deseables del tratamiento la prevención de la enfermedad o de su recidiva, el alivio de los síntomas, la disminución de cualquier consecuencia patológica directa o indirecta de la enfermedad, la prevención de la metástasis, la disminución del ritmo de progresión de la enfermedad, la mejora o los cuidados paliativos del estado de la enfermedad y la remisión o un pronóstico de mejoría. En algunas formas de realización, los anticuerpos de la invención se utilizan para retrasar el desarrollo de una enfermedad o trastorno o para ralentizar la progresión de una enfermedad o trastorno.

Un “sujeto” es un vertebrado. En algunas formas de realización, el vertebrado es un mamífero. Los mamíferos incluyen animales de granja (como vacas), animales utilizados en actividades deportivas, animales de compañía (como gatos, perros y caballos), primates, ratones y ratas. En algunas formas de realización, el mamífero es un humano.

Una “cantidad eficaz” es una cantidad eficaz, a las dosis y durante el tiempo necesarios para lograr el efecto terapéutico o profiláctico deseado.

Una “cantidad terapéuticamente eficaz” de una sustancia/molécula de la invención puede variar según factores como el estado de la enfermedad, la edad, el sexo y el peso del individuo y la capacidad de la sustancia/molécula para dar lugar a una respuesta deseada en el individuo. Una cantidad terapéuticamente

eficaz comprende aquella cantidad a la que los efectos tóxicos o perjudiciales de la sustancia/molécula son contrarrestados por los efectos terapéuticamente beneficiosos. Una "cantidad eficaz desde el punto de vista profiláctico" es una cantidad eficaz, a las dosis y durante el tiempo necesarios, para lograr el efecto terapéutico o profiláctico deseado. Habitualmente, aunque no necesariamente, dado que una dosis profiláctica se utiliza en sujetos antes de la enfermedad o en una etapa temprana, la cantidad profilácticamente eficaz sería inferior a la cantidad terapéuticamente eficaz.

El término "agente citotóxico", en el contexto de la presente memoria descriptiva, se refiere a una sustancia que inhibe o impide la función de las células y/o causa muerte o destrucción celular. El término pretende incluir isótopos radioactivos (por ejemplo, At^{211} , I^{131} , I^{125} , Y^{90} , Re^{186} , Re^{188} , Sm^{153} , Bi^{212} , P^{32} , Pb^{212} e isótopos radiactivos de Lu), agentes quimioterapéuticos (por ejemplo, metotrexato, adriamicina, alcaloides de la vinca (vincristina, vinblastina, etoposido), doxorubicina, melfalan, mitomicina C, clorambucil, daunorubicina u otros agentes intercaladores, enzimas y fragmentos de éstas como enzimas nucleolíticas, antibióticos y toxinas como toxinas de molécula pequeña o toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, incluidos fragmentos y/o variantes de éstos, toxinas, agentes inhibidores del crecimiento, fracciones de fármacos, y los diversos agentes antineoplásicos o antitumorales divulgados más adelante. Otros agentes citotóxicos se describen más adelante. Un agente tumoricida ocasiona la destrucción de las células tumorales.

Una "toxina" es una sustancia con capacidad para tener un efecto perjudicial en el crecimiento o proliferación de una célula.

Un "agente quimioterapéutico" es un compuesto químico útil en el tratamiento del cáncer. Ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluyen agentes alquilantes como la tiotepa y la ciclofosfamida (CYTOXAN®); los sulfonatos de alquilo como el busulfán, el improsulfán y el piposulfán; las aziridinas como la benzodopa, la carboquona, la meturedopa y la uredopa; las etiloniminas y metilamelaminas incluyendo la altretamina, la trietilenomelamina, la trietilenofosforamida, la trietilenotiofosforamida y la trimetilolomelamina; los acetogeninos (en especial, el bullatacín y la bullatacinona); el delta-9-tetrahidrocannabinol (dronabinol, MARINOL®); la beta-lapachona; el lapachol; las colchicinas; el ácido betulínico, una camptotecina (incluyendo el topotecán análogo sintético (HYCAMTIN®), el CPT-11 (irinotecán, CAMPTOSAR®), la

acetilcamptotecina, la escopolectina y la 9-aminocamptotecina); la briostatina; la callistatina; el CC-1065 (incluyendo sus análogos sintéticos adoclesina, carcelesina y bicelesina); la podofilotoxina; el ácido podofilínico; la teniposida; las criptoficinas (particularmente la criptoficina 1 y la 8); la dolastatina; la duocarmicina (incluyendo los análogos sintéticos KW-2189 y CB1-TM1); la eleuterobina; la pancratistatina; una sarcodictina; la espongiostatina; los gases nitrógeno como el clorambucil, la clornafacina, la colofosfamida, la estramustina, la ifosfamida, la mecloretamina, el clorhidrato de óxido de mecloretamina, el melfalán, la novembichina, la fenesterina, la prednimustina, la trofosfamida y la uramustina; las nitrosureas como la carmustina, la clorozotocina, la fotemustina, la lomustina, la nimustina y la ranimustina; los antibióticos como los de enedina (por ejemplo, la caliqueamicina, especialmente la caliqueamicina gamma 1I y la omega 1I (véase, por ejemplo, Agnew, *Chem Intl. Ed. Engl.*, 33: 183-186 (1994))); la dinemicina, incluyendo la dinemicina A; una esperamicina; el cromóforo de neocarcinostatina y los cromóforos de antibióticos de enedina cromoproteína relacionados) las aclacinomisinas, la actinomicina, la autramicina, la azaserina, las bleomicinas, la cactinomicina, la carabicina, la carminomicina, la carcinofilina, las cromomicinas, la dactinomicina, la daunorrubicina, la detorrubicina, la 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, la doxorubicina (incluyendo ADRIAMYCIN®, la morfolino-doxorrubicina, la cianomorfolino-doxorrubicina, la 2-pirrolino-doxorrubicina y la desoxidoxorrubicina), la epirubicina, la esorubicina, la idarrubicina, la marcelomicina, las mitomicinas como la mitomicina C, el ácido micofenólico, la nogalamicina, las olivomicinas, la peplomicina, la porfiromicina, la puromicina, la quelamicina, la rodorrubicina, la estreptonigrina, la estreptozocina, la tubercidina, el ubenimex, la cinostatina y la zorrubicina); los antimetabolitos como el metotrexato y el 5-fluorouracilo (5-FU); los análogos del ácido fólico como la denopterina, el metotrexato, la teropterina y el trimetrexato; los análogos de la purina como la fludarabina, la 6-mercaptopurina, la tiamiprina y la tioguanina; los análogos de la pirimidina como la ancitabina, la azacitidina, la 6-azauridina, el carmofur, la citarabina, la didesoxiuridina, la doxifluridina, la enocitabina y la floxuridina; los andrógenos como la calusterona, el propionato de dromostanolona, el epitioestanol, el mepitiostano, la testolactona los antiadrenérgicos como la aminoglutetimida, el mitotano y el trilostano; un reabastecedor del ácido fólico como el ácido folínico; la aceglatona; el glucósido aldofosfamida; el ácido aminolevulínico; el eniluracilo; la amsacrina; el bestrabucil; el bisantreno; el

edatraxato; la defofamina; la demecolcina; la diaziquona; la elfornitina; el acetato de eliptinio; una epotilona; el etoglúcido; el nitrato de galio; la hidroxurea; el lentinan; la lonidainina; los maitansinoides como la maitansina y las ansamitocinas; la mitoguazona; la mitoxantrona; el mopidanmol; la nitraerina; la pentostatina; el fenamet; la pirarrubicina; la losoxantrona; la 2-etilhidracida; la procarbacin; el complejo polisacárido PSK® (JHS Natural Products, Eugene, OR); el razoxano; la rizoxina; el sizofiran; el espirogermanio; el ácido tenuazónico; la triaciquona; la 2,2',2"-triclorotrietilamina; los tricotecenos (especialmente la toxina T-2, el verracurín A, el roridín A y la anguidina); el uretano; la vindesina (ELDISINE®, FILDESIN®); la dacarbacin; la manomustina; el mitobronitol; el mitolactol; el pipobromán; la gacitosina; la arabinosida ("Ara-C"); la tiotepa; los taxoides, por ejemplo, el paclitaxel (TAXOL®) (Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.), la formulación de nanopartículas de paclitaxel mediante ingeniería de albúmina libre de Cremofor (ABRAXANE™) (American Pharmaceutical Partners, Schaumburg, Illinois) y el docetaxel (TAXOTERE®) (Rhône-Poulenc Rorer, Antony, Francia); el clorambucil; la gemcitabina (GEMZAR®); la 6-tioguanina; la mercaptopurina; el metatrexato; los análogos de platino como el cisplatino y el carboplatino; la vinblastina (VELBAN®); el platino; el etopóido (VP-16); la ifosfamida; la mitoxantrona; la vincristina (ONCOVIN®); el oxaliplatino; la leucovovina; la vinorelbina (NAVELBINE®); la novantrona; el edatrexato; la daunomicina; la aminopterina; el ibandronato; el inhibidor RFS 2000 de la topoisomerasa; la difluorometilornitina (DMFO); los retinoides como el ácido retinoico; capecitabina (XELODA®); las sales, los ácidos o los derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de las sustancias anteriores, así como las combinaciones de una o más de las sustancias anteriores como la CHOP, la abreviatura de una terapia combinada de ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina y prednisolona, y la FOLFOX, la abreviatura de un régimen de tratamiento con oxaliplatino (ELOXATINTM) combinado con 5-FU y leucovovina.

También se incluyen en esta definición los agentes antihormonales que regulan, reducen, bloquean o inhiben los efectos de las hormonas que pueden fomentar el crecimiento del cáncer y se presentan a menudo en la forma de un tratamiento sistémico o que afecta a todo el cuerpo. Estos agentes podrán ser hormonas. Como ejemplos se incluyen los antiestrógenos y los moduladores selectivos de receptores de estrógenos (SERM), incluyendo, por ejemplo, el tamoxifeno (también el tamoxifeno NOLVADEX®), el raloxifeno (EVISTA®), el

droloxifeno, el 4-hidroxitamoxifeno, el trioxifeno, el keoxifeno, el LY117018, la onapristona y el toremifeno (FARESTON®); las antiprogesteronas; los reguladores a la baja de los receptores de estrógenos (ERD); los agentes que oprimen o cierran los ovarios, por ejemplo, los agonistas de la hormona liberadora de la hormona luteinizante (LHRH) como el acetato de leuprolida (LUPRON® y ELIGARD®), el acetato de goserelina, el acetato de buserelina y la tripterelina; otros antiandrógenos como la flutamida, la nilutamida y la bicalutamida y los inhibidores de la aromatasa que inhiben la enzima aromatasa, encargada de regular la producción de estrógenos en las glándulas suprarrenales, como, por ejemplo, las 4(5)-imidazolas, la aminoglutetimida, el acetato de megesterol (MEGASE®), el exemestano (AROMASIN®), la formestania, la fadrozola, la vorozola (RIVISOR®), el letrozol (FEMARA®) y la anastrozola (ARIMIDEX®). Además, esta definición de los agentes quimioterapéuticos incluye los bisfosfonatos como el clodronato (por ejemplo, BONEFOS® o OSTAC®), el etidronato (DIDROCAL®), el NE-58095, el ácido zoledrónico/zoledronato (ZOMETA®), el alendronato (FOSAMAX®), el pamidronato (AREDIA®), el tiludronato (SKELID®) o el risedronato (ACTONEL®), así como la troxacitabina (un análogo de la citosina nucleósida 1,3-dioxolano); los oligonucleótidos antisentido, en particular los que inhiben la expresión génica en las rutas de señalización implicadas en la proliferación celular aberrante, como, por ejemplo, el PKC-alfa, el Raf, el H-Ras y el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF-R); las vacunas como THERATOPE® y las que se aplican para terapias génicas, por ejemplo, la ALLOVECTIN®, la LEUVECTIN® y la VAXID®; el inhibidor de la topoisomerasa 1 (por ejemplo, LURTOTECAN®); el rmRH (por ejemplo, ABARELIX®); el ditosilato de lapatinib (un inhibidor de molécula pequeña doble tirosincinasa del ErbB-2 y el EGFR conocido también como GW572016) y las sales, los ácidos o los derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de las sustancias anteriores.

En la presente memoria descriptiva, "agente inhibidor del crecimiento" se refiere, a un compuesto o composición que inhibe el crecimiento de una célula (como una célula que exprese CD22) tanto *in vitro* como *in vivo*. Así, el agente inhibidor del crecimiento puede reducir significativamente el porcentaje de células que expresen (como una célula que exprese CD22) en la fase S. Ejemplos de agentes inhibidores del crecimiento serían los agentes que bloquean la progresión del ciclo celular (en un punto distinto de la fase S), como los agentes que inducen

la detención de la G1 y la fase M. Entre los bloqueadores clásicos de la fase M se incluyen las vincas (vincristina y vinblastina), los taxanos y los inhibidores de la topoisomerasa II como la doxorubicina, la epirubicina, la daunorrubicina, el etopósido y la bleomicina. Esos agentes que detienen la G1 también se desbordan en la detención de la fase S, por ejemplo, los agentes de alquilación del ADN como el tamoxifeno, la prednisona, la dacarbacina, la mecloretamina, el cisplatino, el metotrexato, el 5-fluorouracilo y el ara-C. Puede encontrarse más información al respecto en *The Molecular Basis of Cancer*, Mendelsohn e Israel, eds., Capítulo 1, titulado “Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs” por Murakami y col., (WB Saunders: Philadelphia, 1995), especialmente en la pág. 13. Los taxanos (paclitaxel y docetaxel) son antineoplásicos derivados ambos del tejo del Pacífico. El docetaxel (TAXOTERE®, Rhone-Poulenc Rorer), derivado del tejo europeo, es un análogo semisintético del paclitaxel (TAXOL®, Bristol-Myers Squibb). El paclitaxel y el docetaxel promueven la unión de microtúbulos a partir de dímeros de tubulina y estabilizan los microtúbulos al evitar la despolimerización, que ocasiona la inhibición de mitosis en células.

Por “metabolito intracelular” se entiende un compuesto que se deriva de un proceso o reacción metabólicos que se produce en el interior de una célula en un conjugado de anticuerpos con fármacos (ADC). El proceso o reacción metabólico puede ser un proceso enzimático, como escisión proteolítica de un enlazador peptídico del ADC, o hidrolisis de un grupo funcional, como una hidrazona, un éster o una amida. Los metabolitos intracelulares incluyen anticuerpos y fármacos libres que han sufrido escisión intracelular tras entrada, difusión, absorción o transporte a una célula.

Por “escindido intracelularmente” y “escisión intracelular” se entiende un proceso o reacción metabólicos en el interior de una célula de un conjugado de anticuerpos con fármacos (ADC) donde se rompe el enlace covalente, es decir, el enlazador, entre el fragmento del fármaco (D) y el anticuerpo (Ab), lo que da lugar a que el fármaco libre se disocie del anticuerpo en el interior de la célula. Los fragmentos escindidos del ADC son, por lo tanto, metabolitos intracelulares.

Por “biodisponibilidad” se entiende la disponibilidad sistémica (es decir, concentración en sangre/plasma) de una cantidad determinada de fármaco administrada a un paciente. El término biodisponibilidad tiene un carácter absoluto e indica medición tanto del tiempo (velocidad) como de la cantidad total

204

(alcance) del fármaco que alcanza la circulación general a partir de una dosis administrada.

Por “actividad citotóxica” se entenderá un efecto inhibidor del crecimiento, citostático o de destrucción celular de un conjugado de anticuerpos con fármacos o un metabolito intracelular de un conjugado de anticuerpos con fármacos. La actividad citotóxica se puede expresar como el valor de IC₅₀ que es la concentración (molar o masa) por unidad de volumen a la que sobreviven la mitad de las células.

“Alquilo” es hidrocarbano C₁-C₁₈ que contiene átomos de carbono normales, secundarios, terciarios o cíclicos. Los ejemplos incluyen metilo (Me, -CH₃), etilo (Et, -CH₂CH₃), 1-propilo (n-Pr, n-propilo, -CH₂CH₂CH₃), 2-propilo (i-Pr, i-propilo, -CH(CH₃)₂), 1-butilo (n-Bu, n-butilo, -CH₂CH₂CH₂CH₃), 2-metil-1-propilo (i-Bu, i-butilo, -CH₂CH(CH₃)₂), 2-butilo (s-Bu, s-butilo, -CH(CH₃)CH₂CH₃), 2-metil-2-propilo (t-Bu, t-butilo, -C(CH₃)₃), 1-pentil (n-pentil, -CH₂CH₂CH₂CH₂CH₃), 2-pentil (-CH(CH₃)CH₂CH₂CH₃), 3-pentil (-CH(CH₂CH₃)₂), 2-metil-2-butilo (-C(CH₃)₂CH₂CH₃), 3-metil-2-butilo (-CH(CH₃)CH(CH₃)₂), 3-metil-1-butilo (-CH₂CH₂CH(CH₃)₂), 2-metil-1-butilo (-CH₂CH(CH₃)CH₂CH₃), 1-hexilo (-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₃), 2-hexilo (-CH(CH₃)CH₂CH₂CH₂CH₃), 3-hexilo (-CH(CH₂CH₃)(CH₂CH₂CH₃)), 2-metil-2-pentilo (-C(CH₃)₂CH₂CH₂CH₃), 3-metil-2-pentilo (-CH(CH₃)CH(CH₃)CH₂CH₃), 4-metil-2-pentilo (-CH(CH₃)CH₂CH(CH₃)₂), 3-metil-3-pentilo (-C(CH₃)(CH₂CH₃)₂), 2-metil-3-pentilo (-CH(CH₂CH₃)CH(CH₃)₂), 2,3-dimetil-2-butilo (-C(CH₃)₂CH(CH₃)₂), 3,3-dimetil-2-butilo (-CH(CH₃)C(CH₃)₃).

En la presente memoria descriptiva, “C₁-C₈ alquilo” se refiere a un hidrocarbano de cadena recta o ramificada, saturado o no saturado, con 1 a 8 átomos de carbono. Entre los grupos “C₁-C₈ alquilo” representativos se incluyen -metilo, -etilo, -n-propilo, -n-butilo, -n-pentilo, -n-hexilo, -n-heptilo, -n-octilo, -n-nonilo y -n-decilo; mientras que los grupos C₁-C₈ alquilo incluyen -isopropilo, -sec-butilo, -isobutilo, -*tert*-butilo, -isopentilo, 2-metilbutilo; los grupos no saturados C₁-C₈ alquilo incluyen -vinilo, -alilo, -1-butenilo, -2-butenilo, -isobutilenilo, -1-pentenilo, -2-pentenilo, -3-metilo-1-butenilo, -2-metilo-2-butenilo, -2,3-dimetil-2-butenilo, 1-hexilo, 2-hexilo, 3-hexilo, -acetilenilo, -propinilo, -1-butinilo, -2-butinilo, -1-pentinilo, -2-pentinilo, -3-metil-1 butinilo, metilo, etilo, propilo, isopropilo, *n*-butilo, isobutilo, sec-butilo, *tert*-butilo, *n*-pentilo, isopentilo, neopentilo, *n*-hexilo, isohexilo, 2-metilpentilo, 3-metilpentilo, 2,2-dimetilbutilo, 2,3-dimetilbutilo,

105

2,2-dimetilpentilo, 2,3-dimetilpentilo, 3,3-dimetilpentilo, 2,3,4-trimetilpentilo, 3-metilhexilo, 2,2-dimetilhexilo, 2,4-dimetilhexilo, 2,5-dimetilhexilo, 3,5-dimetilhexilo, 2,4-dimetilpentilo, 2-metilheptilo, 3-metilheptilo, *n*-heptilo, isoheptilo, *n*-octilo, e isooctilo. Un grupo C₁-C₈ alquilo se puede sustituir o no con uno o más grupos, incluidos, -C₁-C₈ alquilo, -O-(C₁-C₈ alquilo), -arilo, -C(O)R', -OC(O)R', -C(O)OR', -C(O)NH₂, -C(O)NHR', -C(O)N(R')₂, -NHC(O)R', -SO₃R', -S(O)₂R', -S(O)R', -OH, -halógeno, -N₃, -NH₂, -NH(R'), -N(R')₂ y -CN; donde cada R' se selecciona independientemente entre H, -C₁-C₈ alquilo y arilo.

“Alquenil” es hidrocarbano C₂-C₁₈ que contiene átomos de carbono normales, secundarios, terciarios o cíclicos con al menos un sitio de insaturación, es decir, un enlace doble sp² carbono-carbono. Entre los ejemplos, están: etileno o vinilo (-CH=CH₂), alil (-CH₂CH=CH₂), ciclopentenil (-C₅H₇) y 5-hexenil (-CH₂CH₂CH₂CH=CH₂)

“Alquinil” es hidrocarbano C₂-C₁₈ que contiene átomos de carbono normales, secundarios, terciarios o cíclicos con al menos un sitio de insaturación, es decir, un enlace triple sp carbono-carbono. Entre los ejemplos, están: acetilénico (-C≡CH) y propargil (-CH₂C≡CH),

Por “alquilenos” se entiende un radical hidrocarbano saturado, cíclico o de cadena recta o ramificada de 1 a 18 átomos de carbono, con dos centros radicales monovalentes derivados mediante la eliminación de dos átomos de hidrógeno del mismo átomo o de dos átomos de carbono distintos de un alcano padre. Entre los radicales alquilenos típicos, están: metileno (-CH₂-), 1,2-etil (-CH₂CH₂-), 1,3-propil (-CH₂CH₂CH₂-), 1,4-butilo (-CH₂CH₂CH₂CH₂-), etc.

Un “C₁-C₁₀ alquilenos” es un grupo hidrocarbano saturado de cadena recta de la fórmula -(CH₂)₁₋₁₀-. Ejemplos de un C₁-C₁₀ alquilenos son metileno, etileno, propileno, butileno, pentileno, hexileno, heptileno, octileno, nonileno y decaleno.

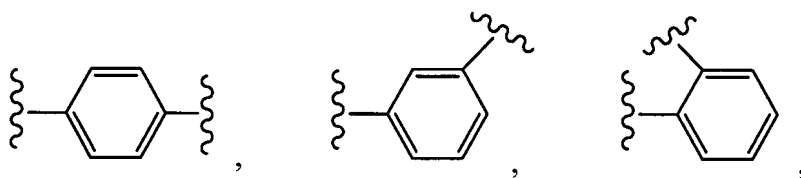
Por “alquilenos” se entiende un radical hidrocarbano insaturado, cíclico o de cadena recta o ramificada de 2 a 18 átomos de carbono, con dos centros radicales monovalentes derivados mediante la eliminación de dos átomos de hidrógeno del mismo átomo o de dos átomos de carbono distintos de un alqueno padre. Entre los radicales alquilenos típicos, están: 1,2-etileno (-CH=CH-).

Por “alquinileno” se entiende un radical hidrocarbano insaturado, cíclico o de cadena recta o ramificada de 2 a 18 átomos de carbono, con dos centros radicales monovalentes derivados mediante la eliminación de dos átomos de hidrógeno del mismo átomo o de dos átomos de carbono distintos de un alquino

padre. Entre los radicales alquinilenos típicos, están: acetileno ($-\text{C}\equiv\text{C}-$), propargil ($-\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{C}-$) y 4-pentinil ($-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{C}-$).

Por “arilo” se entiende un grupo aromático carbocíclico. Ejemplos de grupos arilo se incluyen, entre otros, fenilo, naftilo y antracenilo, entre otros. Un grupo aromático carbocíclico o un grupo aromático heterocíclico se puede sustituir o no con uno o más grupos, incluidos, $-\text{C}_1\text{-C}_8$ alquilo, $-\text{O}(\text{C}_1\text{-C}_8 \text{ alquilo})$, -arilo, $-\text{C}(\text{O})\text{R}'$, $-\text{OC}(\text{O})\text{R}'$, $-\text{C}(\text{O})\text{OR}'$, $-\text{C}(\text{O})\text{NH}_2$, $-\text{C}(\text{O})\text{NHR}'$, $-\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{R}')_2$, $-\text{NHC}(\text{O})\text{R}'$, $-\text{SO}_3\text{R}'$, $-\text{S}(\text{O})_2\text{R}'$, $-\text{S}(\text{O})\text{R}'$, $-\text{OH}$, -halógeno, $-\text{N}_3$, $-\text{NH}_2$, $-\text{NH}(\text{R}')$, $-\text{N}(\text{R}')_2$ y $-\text{CN}$; donde cada R' se selecciona independientemente entre H , $-\text{C}_1\text{-C}_8$ alquilo y arilo.

Un “amileno” es un grupo arilo que tiene dos enlaces covalentes y puede estar en configuraciones orto, meta o para, como se muestra en las estructuras siguientes:



en el que el grupo fenilo se puede sustituir o no con hasta cuatro grupos, incluidos, $-\text{C}_1\text{-C}_8$ alquilo, $-\text{O}(\text{C}_1\text{-C}_8 \text{ alquilo})$, -arilo, $-\text{C}(\text{O})\text{R}'$, $-\text{OC}(\text{O})\text{R}'$, $-\text{C}(\text{O})\text{OR}'$, $-\text{C}(\text{O})\text{NH}_2$, $-\text{C}(\text{O})\text{NHR}'$, $-\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{R}')_2$, $-\text{NHC}(\text{O})\text{R}'$, $-\text{SO}_3\text{R}'$, $-\text{S}(\text{O})_2\text{R}'$, $-\text{S}(\text{O})\text{R}'$, $-\text{OH}$, -halógeno, $-\text{N}_3$, $-\text{NH}_2$, $-\text{NH}(\text{R}')$, $-\text{N}(\text{R}')_2$ y $-\text{CN}$; donde cada R' se selecciona independientemente entre H , $-\text{C}_1\text{-C}_8$ alquilo y arilo.

Por “arilalquilo” se entiende un radical alquilo acíclico en el que uno de los átomos de hidrógeno unido a un átomo de carbono, por lo general un átomo de carbono sp^3 o terminal, se sustituye por un radical arilo. Habitualmente, los grupos arilalquil incluyen benzil, 2-feniletan-1-il, 2-feniletan-1-il, naftilmetil, 2-naftiletan-1-il, 2-naftiletan-1-il, naftobenzil, 2-naftofeniletan-1-il y similares. El grupo arilalquil comprende de 6 a 20 átomos de carbono, por ejemplo, la fracción alquilo, incluidos los grupos alcanil, alquenil o alquinil, del grupo arilalquil está formada por 1 a 6 átomos de carbono y la porción arilo tiene de 5 a 14 átomos de carbono.

Por “heteroarilalquil” se entiende un radical alquilo acíclico en el que uno de los átomos de hidrógeno unido a un átomo de carbono, por lo general un átomo de carbono sp^3 o terminal, se sustituye por un radical heteroaril. Los grupos heteroarilalquil típicos incluyen 2-benzimidazolilmetil, 2-furiletal y similares, entre otros. El grupo heteroarilalquil comprende de 6 a 20 átomos de carbono, por ejemplo, la fracción alquilo, incluidos los grupos alcanil, alquenil o alquinil, del grupo heteroarilalquil contiene de 1 a 6 átomos de carbono y la fracción heteroaril

37

tiene de 5 a 14 átomos de carbono y de 1 a 3 heteroátomos seleccionados entre N, O, P y S. La fracción heteroaril del grupo hetroarilalquil puede ser un monociclo que tenga de 3 a 7 anillos (2 a 6 átomos de carbono o un biciclo con 7 a 10 anillos (4 a 9 átomos de carbono y 1 a 3 heteroátomos seleccionados entre N, O, P y S), por ejemplo: un sistema biciclo [4,5], [5,5], [5,6] o [6,6].

Por "alquilo sustituido", "arilo sustituido" y "arilalquilo osustituido" se entienden alquilo, arilo y arilalquilo respectivamente, en los que uno o más átomos de hidrógeno son sustituidos independientemente por un sustituto. Entre los sustitutos típicos están, -X, -R, -O⁻, -OR, -SR, -S⁻, -NR₂, -NR₃, =NR, -CX₃, -CN, -OCN, -SCN, -N=C=O, -NCS, -NO, -NO₂, =N₂, -N₃, NC(=O)R, -C(=O)R, -C(=O)NR₂, -SO₃⁻, -SO₃H, -S(=O)₂R, -OS(=O)₂OR, -S(=O)₂NR, -S(=O)R, -OP(=O)(OR)₂, -P(=O)(OR)₂, -PO₃⁻, -PO₃H₂, -C(=O)R, -C(=O)X, -C(=S)R, -C(=S)OR, -C(=O)SR, -C(=S)SR, -C(=O)NR₂, -C(=S)NR₂, -C(=NR)NR₂, entre otros, donde cada X es independientemente un halógeno: F, Cl, Br o I; y cada R es independientemente -H, C₂-C₁₈ alquilo, C₆-C₂₀ arilo, C₃-C₁₄ heterociclo, grupo protector o fracción de profármaco. Los grupos alquilenos, alquenileno y alquinileno descritos anteriormente también se pueden sustituir de forma similar.

Por "heteroaril" y "heterociclo" se entiende un sistema de anillos en el que uno o más átomos en anillo es un heteroátomo, por ejemplo, nitrógeno, oxígeno y sulfuro. El radical heterociclo comprende de 1 a 20 átomos de carbono y de 1 a 3 heteroátomos seleccionados entre N, O, P y S. Un heterociclo puede ser un monociclo con 3 a 7 anillos (de 2 a 6 átomos de carbono y de 1 a 3 heteroátomos seleccionados entre N, O, P y S) o un biciclo con 7 a 10 anillos (de 4 a 9 átomos de carbono y de 1 a 3 heteroátomos seleccionados entre N, O, P y S), por ejemplo: un sistema biciclo [4,5], [5,5], [5,6] o [6,6].

Los heterociclos se describen en Paquette, Leo A.; *Principles of Modern Heterocyclic Chemistry* (W.A. Benjamin, New York, 1968), especialmente en los Capítulos 1, 3, 4, 6, 7 y 9; "The Chemistry of Heterocyclic Compounds, A series of Monographs" (John Wiley y Sons, New York, 1950 hasta hoy), en concreto en los Volúmenes 13, 14, 16, 19 y 28; y *J. Am. Chem. Soc.* (1960) 82:5566.

Ejemplos non-limitantes de heterociclos son piridil, dihidroipiridil, tetrahidropiridil (piperidil), tiazolil, tetrahidrotiofeno, tetrahidrotiofeno de azufre oxidado, pirimidinil, furanil, tienil, pirrolil, pirazolil, imidazolil, tetrazolil, benzofuranil,

tianaftalenil, indolil, indolenil, quinolinil, isoquinolinil, benzimidazolil, piperidinil, 4-piperidonil, pirrolidinil, 2-pirrolidonil, pirrolinil, tetrahidrofuranil, bis-tetrahidrofuranil, tetrahidropiranil, bis-tetrahidropiranil, tetrahidroquinolinil, tetrahidroisoquinolinil, decahidroquinolinil, octahidroisoquinolinil, azocinil, triazinil, 6H-1,2,5-tiadiazinil, 2H,6H-1,5,2-ditiazinil, tienil, tiantrenil, piranil, isobenzofuranil, chromenil, xantenil, fenoxatinil, 2H-pirrolil, isotiazolil, isoxazolil, pirazinil, piridazinil, indolizinil, isoindolil, 3H-indolil, 1H-indazolil, purinil, 4H-quinolizinil, ftalazinil, naftiridinil, quinoxalinil, quinazolinil, cinnolinil, pteridinil, 4aH-carbazolil, carbazolil, β -carbolinil, fenantridinil, acridinil, pirimidinil, fenantrolinil, fenazinil, fenotiazinil, furazanil, fenoxazinil, isochromanil, chromanil, imidazolidinil, imidazolinil, pirazolidinil, pirazolinil, piperazinil, indolinil, isoindolinil, quinuclidinil, morfolinil, oxazolidinil, benzotriazolil, benzisoxazolil, oxindolil, benzoxazolinil e isatinoil.

A modo de ejemplo non-limitante, los heterociclos con enlace a carbono se enlazan en la posición 2, 3, 4, 5 ó 6 de una piridina, posición 3, 4, 5 ó 6 de una piridazina, posición 2, 4, 5 ó 6 de una pirimidina, posición 2, 3, 5 ó 6 de una pirazina, posición 2, 3, 4 ó 5 de un furano, tetrahidrofurano, tiofurano, tiofeno, pirrol o tetrahidropirrol, posición 2, 4 ó 5 de una oxazola, imidazola o tiazola, posición 3, 4 ó 5 de una isoxazola, pirazola o isotiazola, posición 2 ó 3 de una aziridina, posición 2, 3 ó 4 de una azetidina, posición 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 de una quinolina o posición 1, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 de una isoquinolina. Aún es más habitual que los heterociclos con enlace a carbono incluyan 2-piridil, 3-piridil, 4-piridil, 5-piridil, 6-piridil, 3-piridazinil, 4-piridazinil, 5-piridazinil, 6-piridazinil, 2-pirimidinil, 4-pirimidinil, 5-pirimidinil, 6-pirimidinil, 2-pirazinil, 3-pirazinil, 5-pirazinil, 6-pirazinil, 2-tiazolil, 4-tiazolil o 5-tiazolil.

A modo de ejemplo non-limitante, los heterociclos con enlace a nitrógenos están enlazados en la posición 1 de una aziridina, azetidina, pirrol, pirrolidina, 2-pirrolina, 3-pirrolina, imidazol, imidazolidina, 2-imidazolina, 3-imidazolina, pirazol, pirazolina, 2-pirazolina, 3-pirazolina, piperidina, piperazina, indol, indolina, 1H-indazol, posición 2 de un isoindol o isoindolina, posición 4 de una morfolina, y posición 9 de un carbazol o β -carbolina, entre otros. Aún es más típico que los heterociclos con enlace a nitrógeno incluyan 1-aziridil, 1-azeteditil, 1-pirrolil, 1-imidazolil, 1-pirazolil, y 1-piperidinil.

Por "C₃-C₈ heterociclo" se entiende un C₃-C₈ carbociclo aromático o no aromático en el que de uno a cuatro de los átomos de carbono en anillo son sustituidos independientemente por un heteroátomo del grupo formado por O, S y

N. Ejemplos representativos de un C₃-C₈ heterociclo incluyen benzofuranil, benzotiofeno, indolil, benzopirazolil, coumarinil, isoquinolinil, pirrolil, tiofenil, furanil, tiazolil, imidazolil, pirazolil, triazolil, quinolinil, pirimidinil, piridinil, piridonil, pirazinil, piridazinil, isotiazolil, isoxazolil y tetrazolil. Un C₃-C₈ heterociclo se puede sustituir o no con hasta siete grupos, incluidos, -C₁-C₈ alquilo, -O-(C₁-C₈ alquilo), -arilo, -C(O)R', -OC(O)R', -C(O)OR', -C(O)NH₂, -C(O)NHR', -C(O)N(R')₂ -NHC(O)R', -SO₃R', -S(O)₂R', -S(O)R', -OH, -halógeno, -N₃, -NH₂, -NH(R'), -N(R')₂ y -CN; donde cada R' se selecciona independientemente entre H, -C₁-C₈ alquilo y arilo.

Por "C₃-C₈ heterociclo" se entiende un grupo C₃-C₈ heterociclo como se define anteriormente, donde uno de los átomos de hidrógeno del grupo heterociclo es sustituido por un enlace. Un C₃-C₈ heterociclo se puede sustituir o no con hasta seis grupos, incluidos, -C₁-C₈ alquilo, -O-(C₁-C₈ alquilo), -arilo, -C(O)R', -OC(O)R', -C(O)OR', -C(O)NH₂, -C(O)NHR', -C(O)N(R')₂ -NHC(O)R', -SO₃R', -S(O)₂R', -S(O)R', -OH, -halógeno, -N₃, -NH₂, -NH(R'), -N(R')₂ y -CN; donde cada R' se selecciona independientemente entre H, -C₁-C₈ alquilo y arilo.

Por "carbociclo" se entiende un anillo saturado o insaturado con 3 a 7 átomos de carbono como monociclo o 7 a 12 átomos de carbono como biciclo. Los carbociclos monocíclicos tienen de 3 a 6 átomos en anillo y aún con más frecuencia 5 ó 6 átomos en anillo. Los carbociclos bicíclicos tienen de 7 a 12 átomos en anillo, por ejemplo, dispuestos como un sistema biciclo [4,5], [5,5], [5,6] o [6,6] o de 9 a 10 átomos en anillo dispuestos como un sistema biciclo [5,6] o [6,6]. Ejemplos de carbociclos monocíclicos incluyen ciclopropil, ciclobutil, ciclopentil, 1-ciclopent-1-enil, 1-ciclopent-2-enil, 1-ciclopent-3-enil, ciclohexil, 1-ciclohex-1-enil, 1-ciclohex-2-enil, 1-ciclohex-3-enil, cicloheptil y ciclooctil.

Un "C₃-C₈ carbociclo" es un anillo carbocíclico no aromático, saturado o insaturado, de 3-, 4-, 5-, 6-, 7- u 8- átomos. Entre los C₃-C₈ carbociclos representativos están -ciclopropil, -ciclobutil, -ciclopentil, -ciclopentadienil, -ciclohexil, -ciclohexenil, -1,3-ciclohexadienil, -1,4-ciclohexadienil, -cicloheptil, -1,3-cicloheptadienil, -1,3,5-cicloheptatrienil, -ciclooctil y -ciclooctadienil. Un grupo C₃-C₈ carbociclo se puede sustituir o no con uno o más grupos, incluidos, -C₁-C₈ alquilo, -O-(C₁-C₈ alquilo), -arilo, -C(O)R', -OC(O)R', -C(O)OR', -C(O)NH₂, -C(O)NHR', -C(O)N(R')₂ -NHC(O)R', -SO₃R', -S(O)₂R', -S(O)R', -OH, -halógeno, -N₃, -NH₂, -NH(R'), -N(R')₂ y -CN; donde cada R' se selecciona independientemente entre H, -C₁-C₈ alquilo y arilo.

Por "C₃-C₈ carbociclo" se entiende un grupo C₃-C₈ carbociclo como se define anteriormente, donde uno de los átomos de hidrógeno del grupo carbociclo es sustituido por un enlace.

Por "enlazador" se entiende una fracción química que comprende un enlace covalente o una cadena de átomos que unen covalentemente un anticuerpo a una fracción de un fármaco. En varias formas de realización, los enlazadores incluyen un radical divalente, como un alquildiil, un arildiil, un heteroarildiil, fracciones como: $-(CR_2)_nO(CR_2)_n-$, unidades repetidoras de alquiloxi (por ejemplo, polietilenoxi, PEG, polimetileneoxi) y alquilamino (por ejemplo, polietileneamino, Jeffamine™); y éster diácido y amidas como succinato, succinamida, diglicolato, malonato y caproamida.

Por "quiral" se entiende moléculas que tienen la propiedad de no superimposición de la molécula de enlace que constituye la contraimagen, mientras que por "aquiral" se entiende las moléculas que son superponibles a su contraimagen.

Por "estereoisómeros" se entienden los compuestos que tienen idéntica constitución química pero difieren en la disposición de los átomos o grupos en el espacio.

Por "diastereómero" se entiende un estereoisómero con dos o más centros de quiralidad y con moléculas que no son contraímagenes la una de la otra. Los diastereómeros tienen propiedades físicas distintas, por ejemplo, puntos de fusión, puntos de ebullición, propiedades espectrales y reactividades. Las mezclas de diastereómeros se pueden separar mediante procedimientos analíticos de alta resolución, como electroforesis y cromatografía.

Por "enantiómeros" se entiende dos estereoisómeros de un compuesto que no se superponen como contraimagen el uno del otro.

Las definiciones y convenciones estereoquímicas usadas en la presente memoria descriptiva siguen, por lo general, a S. P. Parker, Ed., *McGraw-Hill Dictionary of Chemical Terms* (1984) McGraw-Hill Book Company, New York; y Eliel, E. y Wilen, S., *Stereochemistry of Organic Compounds* (1994) John Wiley & Sons, Inc., New York. Existen muchos compuestos orgánicos en formas ópticamente activas, es decir, con capacidad para rotar el plano a luz polarizada en el plano. Al describir un compuesto ópticamente activo, se utilizan los prefijos D y L, o R y S, para denotar la configuración absoluta de la molécula sobre su centro o sus centros quirales. Los prefijos d y l o (+) y (-) se emplean para designar el

signo de rotación de luz polarizada/plano por el compuesto, donde (-) o 1 significan que el compuesto es levorotatorio. Un compuesto con prefijo (+) o d es dextrorotatorio. Para una estructura química dada, estos estereoisómeros son idénticos, excepto que sean contraimagen el uno del otro. Un estereoisómero específico también se puede considerar un enantiómero y una mezcla de dichos isómeros se denomina con frecuencia una mezcla enantiomérica. Una mezcla de enantiómeros en una proporción 50:50 se considera una mezcla racémica o un racemato, que puede ocurrir cuando no ha habido estereoselección o estereoespecificidad en una reacción o proceso químico. Por “mezcla racémica” o “racemato” se entiende una mezcla equimolar de dos especies enantioméricas, desprovista de actividad óptica.

Por “grupo saliente” se entiende un grupo funcional que se puede sustituir por otro grupo funcional. Determinados grupos salientes son bien conocidos en el sector y entre los ejemplos están un halido (por ejemplo, cloruro, bromuro, yoduro), metanesulfonil (mesil), p-toluenesulfonil (tosil), trifluorometilsulfonil (triflato) y trifluorometilsulfonato.

Abreviaturas

COMPONENTES DEL ENLAZADOR:

MC = 6-maleimidocaproil

Val-Cit o “vc” = valina-citrulina (un dipéptido ejemplar en un enlazador escindible por una proteasa)

Citrulina = ácido 2-amino-5-ureido pentanóico

PAB = p-aminobenziloxycarbonilo (un ejemplo de un componente enlazador “autoinmolador”)

Me-Val-Cit = N-metil-valina-citrulina (donde el enlace peptídico del enlazador se ha modificado para prevenir su escisión mediante catepsina B)

MC(PEG)6-OH = maleimidocaproil- polietilenglicol (se puede unir a cisteínas del anticuerpo).

SPP = N-succinimidil-4-(2-piridiltio)pentanoato

SPDP = N-succinimidil-3-(2-piridilditio) propionato

SMCC = succinimidil-4-(N-maleimidometil) ciclohexano-1-carboxilato

IT = iminotiolano

FÁRMACOS CITOTÓXICOS:

MMAE = mono-metil auristatina E (MW 718)

12

MMAF = variante de la auristatina E (MMAE) con una fenilalanina en el extremo C-terminal del fármaco (MW 731.5)

MMAF-DMAEA = MMAF con DMAEA (dimetilaminoetilamina) en un enlace de amida a la fenilalanina en el extremo C-terminal (MW 801.5)

MMAF-TEG = MMAF con tetraetilenglicol esterificado a la fenilalanina

MMAF-NtBu = N-t-butilo, unido como una amida al extremo C-terminal de MMAF

DM1 = N(2')-deacetil-N(2')-(3-mercapto-1-oxopropil)-maitansina

DM3 = N(2')-deacetil-N2-(4-mercapto-1-oxopentil)-maitansina

DM4 = N(2')-deacetil-N2-(4-mercapto-4-metil-1-oxopentil)-maitansina

Otras abreviaturas son: AE es auristatina E, Boc es *N*-(*t*-butoxicarbonil), cit es citrullina, dap is dolaproina, DCC es 1,3-diciclohexilcarbodiimida, DCM es diclorometano, DEA es dietilamina, DEAD es dietilazodicarboxilato, DEPC es dietilfosforilcianidato, DIAD es diisopropilazodicarboxilato, DIEA es *N,N*-diisopropiletilamina, dil es dolaisoleucina, DMA es dimetilacetamida, DMAP es 4-dimetilaminopiridina, DME es etileneglicol dimetil éter (o 1,2-dimetoxietano), DMF es *N,N*-dimetilformamida, DMSO es dimetilsulfoxido, doe es dolafenina, dov es *N,N*-dimetilvalina, DTNB es 5,5'-ditiobis(2-ácido nitrobenzoico), DTPA es ácido dietilenetriaminepentaacético, DTT es ditioneitol, EDCI es hidrocloreuro de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida, EEDQ es 2-etoxi-1-etoxicarbonil-1,2-dihidroquinolina, ES-MS es espectrometría de masas por electrospray, EtOAc es acetato de etilo, Fmoc es *N*-(9-fluorenilmetoxicarbonil), gly es glicina, HATU es *O*-(7-azabenzotriazol-1-il)-*N,N,N',N'*-tetrametiluronium hexafluorofosfato, HOBt es 1-hidroxibenzotriazol, HPLC es cromatografía líquida de alta presión, ile es isoleucina, lys es lisina, MeCN (CH₃CN) es acetonitrilo, MeOH es metanol, Mtr es 4-anisildifenilmetil (o 4-metoxitritil), nor es (1*S*, 2*R*)-(+)-norefedrina, PBS es solución salina fosfatada (pH 7,4), PEG es polietilenglicol, Ph es fenilo, Pnp es p-nitrofenilo, MC es 6-maleimidocaproil, phe es L-fenilalanina, PyBrop es bromo *tris*-pirrolidino fosfonium hexafluorofosfato, SEC es cromatografía por exclusión de tamaño, Su es succinimida, TFA es ácido trifluoroacético, TLC es cromatografía de capa fina, UV es ultravioleta y val es valina.

COMPOSICIONES Y MÉTODOS DE FABRICACIÓN DE LAS MISMAS

Se proporcionan anticuerpos que se unen a CD22. Se proporcionan inmunoconjugados que comprenden anticuerpos anti-CD22. Los anticuerpos e inmunoconjugados de la invención son útiles, como por ejemplo, para el

diagnóstico o tratamiento de trastornos asociados a una expresión alterada, como por ejemplo, una expresión aumentada, de CD22. En determinadas formas de realización, los anticuerpos o inmunoconjugados de la invención son útiles para el diagnóstico o tratamiento de un trastorno de proliferación celular, como un cáncer.

Anticuerpos anti-CD22

En un aspecto, la invención proporciona anticuerpos que se unen a CD22. En algunas formas de realización, se proporcionan anticuerpos que se unen a una forma madura del CD22 de humanos y monos cinomolgus. En una de estas formas de realización, una forma madura del CD22 humano tiene una secuencia de aminoácidos de identificador de secuencia n.º: 27. La isoforma humana madura principal tiene un dominio extracelular que comprende siete dominios de tipo Ig y una secuencia de aminoácidos de identificador de secuencia n.º: 28. En otra forma de realización, una isoforma secundaria de CD22 humana que carece de los dominios extracelulares 3 y 4 tiene una secuencia de aminoácidos de identificador de secuencia n.º: 29. La secuencia de aminoácidos del dominio extracelular de la isoforma secundaria es el identificador de secuencia n.º: 30. El CD22 cinomolgus tiene una secuencia de aminoácidos de identificador de secuencia n.º: 31. En algunas formas de realización, un anticuerpo de CD22 se une a una forma madura de CD22 expresado en una superficie celular. En algunas formas de realización, un anticuerpo que se une a una forma madura de CD22 expresada en la superficie celular inhibe el crecimiento de la célula. En algunas formas de realización, un anticuerpo anti-CD22 se une a una forma madura de CD22 expresada en la superficie celular e inhibe la proliferación celular. En algunas formas de realización, un anticuerpo anti-CD22 se une a una forma madura de CD22 expresada en la superficie celular e induce la muerte celular. En algunas formas de realización, un anticuerpo anti-CD22 se une a una forma madura de CD22 expresada en la superficie de células cancerosas. En algunas formas de realización, un anticuerpo anti-CD22 se une a una forma madura de CD22 que está sobreexpresada en la superficie de células cancerosas con respecto a células normales del mismo origen tisular. En algunas formas de realización, el anticuerpo anti-CD22 se conjuga a una citotoxina o a una marca detectable y se une al CD22 en una superficie celular. En algunas formas de realización, el conjugado de anticuerpo con toxina inhibe el crecimiento de la célula. En algunas formas de realización, el conjugado de anticuerpo con una

11K

marca detectable produce una célula que expresa CD22 en su superficie para que sea detectable *in vitro* o *in vivo*.

En un aspecto, un anticuerpo anti-CD22 es un anticuerpo monoclonal. En un aspecto, un anticuerpo anti-CD22 es un fragmento de anticuerpo, por ejemplo, un fragmento Fab, Fab' -SH, Fv, scFv o (Fab')₂. En un aspecto, un anticuerpo anti-CD22 es un anticuerpo quimérico, humanizado o humano. En un aspecto, cualquiera de los anticuerpos anti-CD22 descritos en la presente memoria descriptiva está purificado.

En la presente memoria descriptiva se proporcionan anticuerpos monoclonales ejemplares derivados de una biblioteca de fagos. El antígeno que se utilizó para la detección de la biblioteca era un polipéptido con la secuencia de aminoácidos de identificador de secuencia n.º: 28 o identificador de secuencia n.º: 30, que correspondía a los dominios extracelulares (ECD) del CD22 beta y alfa. Los anticuerpos que se obtienen de la detección de la biblioteca tienen una maduración de afinidad.

En un aspecto, se proporcionan anticuerpos monoclonales que compiten con el anticuerpo murino 10F4.4.1, el humanizado 10F4v1 y v3, y el murino 5E8.1.8 para que se unan al CD22. También se proporcionan anticuerpos monoclonales que se unen al mismo epítipo como el anticuerpo murino 10F4.4.1, el humanizado 10F4v1 y v3, y el murino 5E8.1.8.

En un aspecto de la invención, se proporcionan polinucleótidos que codifican anticuerpos anti-CD22. En ciertas formas de realización, se proporcionan vectores que comprenden polinucleótidos que codifican anticuerpos anti-CD22. En ciertas formas de realización, se proporcionan células huésped que comprenden estos vectores. En otro aspecto de la invención, se proporcionan composiciones que comprenden anticuerpos anti-CD22 o polinucleótidos que codifican anticuerpos anti-CD22. En determinadas formas de realización, una composición de la invención es una formulación farmacéutica para el tratamiento de un trastorno de proliferación celular, como los enumerados en la presente memoria descriptiva.

Administración y formulación de los anticuerpos

En una forma de realización, el anticuerpo anti-CD22 o el conjugado de anticuerpo anti-CD22 con fármacos (incluyendo, entre otros, el conjugado de thiomab anti-CD22 de la invención con fármacos) de la invención se administra en combinación con un antagonista de un antígeno de la superficie de células B. La

administración “en combinación con” uno o más agentes terapéuticos incluye la administración simultánea (concurrente) y consecutiva en cualquier orden. En una forma de realización, la administración es consecutiva o secuencial. En otra forma de realización, la administración es simultánea, concurrente o conjunta en la misma formulación. En una forma de realización, el antagonista del antígeno de la superficie de células B es un anticuerpo o un antígeno que une fragmentos de éstos. En una forma de realización, el antagonista de la superficie de células B es un conjugado de anticuerpo con fármacos.

Las formulaciones de la presente memoria descriptiva pueden contener más de un compuesto activo tal como sea necesario para la indicación particular que se esté tratando, preferentemente aquellas con actividades complementarias que no se afectan de manera adversa entre sí. Por ejemplo, además de un anticuerpo anti-CD22, un conjugado de anticuerpo anti-CD22 con fármacos o un oligopéptido de unión CD22, puede que sea deseable incluir en la formulación un anticuerpo adicional, como por ejemplo, un segundo anticuerpo anti-CD22 que une un epítipo diferente en el polipéptido CD22, un segundo anticuerpo que une un antígeno diferente de la superficie de células B o un anticuerpo de alguna otra diana tal como un factor de crecimiento que afecta el crecimiento de un cáncer determinado. Alternativa o adicionalmente, la composición puede comprender un agente quimioterapéutico, un agente citotóxico, una citoquina, un agente inhibidor del crecimiento, un agente antihormonal o un cardioprotector, o todos los anteriores. Dichas moléculas están presentes en combinación en cantidades que son eficaces para el fin que se pretende.

Actualmente, según la fase del cáncer, el tratamiento contra el cáncer implica uno o una combinación de las siguientes terapias: cirugía para eliminar el tejido canceroso, radioterapia y quimioterapia. El anticuerpo anti-CD22, el conjugado de anticuerpo anti-CD22 con fármacos o la terapia oligopéptida pueden aplicarse especialmente en pacientes ancianos que no toleran bien la toxicidad ni los efectos secundarios de la quimioterapia, y en los pacientes que padecen enfermedades metastáticas en las que la radioterapia tiene poca utilidad. Los anticuerpos anti-CD22, los conjugados de anticuerpo anti-CD22 con fármacos o los oligopéptidos de la invención que actúan sobre el tumor son útiles para aliviar los cánceres que expresan CD22 tras el diagnóstico inicial de la enfermedad o durante la recidiva. Para las aplicaciones terapéuticas, el anticuerpo anti-CD22, el conjugado de anticuerpo anti-CD22 con fármacos o el oligopéptido pueden

11/10

utilizarse por separado o en una terapia combinada con, por ejemplo, hormonas, antiangiógenes o compuestos radiomarcados, o con cirugía, crioterapia o radioterapia, o todas las anteriores. El tratamiento con anticuerpos anti-CD22, conjugados de anticuerpo anti-CD22 con fármacos o oligopéptidos puede administrarse en combinación con otras formas de terapia convencional, de manera consecutiva ya sea con la terapia preconventional o la posconventional. En el presente método de la invención para tratar o aliviar el cáncer, se le puede administrar al paciente con cáncer un anticuerpo anti-CD22, un conjugado de anticuerpo anti-CD22 con fármacos o un oligopéptido en combinación con un tratamiento con uno o más de los siguientes agentes quimioterapéuticos. El anticuerpo anti-CD22, el conjugado de anticuerpo anti-CD22 con fármacos o el oligopéptido se administrarán con una dosis terapéuticamente eficaz de un agente quimioterapéutico. En otra forma de realización, el anticuerpo anti-CD22, el conjugado de anticuerpo anti-CD22 con fármacos o el oligopéptido se administran en combinación con la quimioterapia para mejorar la actividad y eficacia del agente quimioterapéutico. Las dosis detalladas en la Referencia de escritorio de los médicos (PDR, por sus siglas en inglés) de estos agentes se han utilizado en el tratamiento de diversos cánceres. La pauta posológica de estos fármacos quimioterapéuticos mencionados anteriormente que son terapéuticamente eficaces dependerá del cáncer en particular que deba tratarse, el grado de la enfermedad y otros factores conocidos por los médicos expertos en la materia, y el médico puede determinar dicho régimen.

En una forma de realización, se administra al paciente un conjugado que comprende un anticuerpo anti-CD22, un conjugado de anticuerpo anti-CD22 con fármacos o un oligopéptido conjugados con un agente citotóxico. Preferentemente, la célula internaliza el inmunoconjugado unido a la proteína CD22 lo que incrementa la eficacia terapéutica del inmunoconjugado para matar célula cancerosa a la que dicho inmunoconjugado se une. En una forma de realización, el agente citotóxico actúa o interfiere con el ácido nucleico en la célula cancerosa. Los ejemplos de agentes citotóxicos se describen anteriormente e incluyen auristatinas, maitansinoides, caliqueamicinas, ribonucleasas y ADN con endonucleasas, o sus derivados biológicamente activos.

Los anticuerpos anti-CD22, los conjugados de anticuerpo anti-CD22 con fármacos, los oligopéptido o sus conjugados con toxinas se administran al paciente humano de acuerdo con los procedimientos conocidos, como por

117

ejemplo, la administración intravenosa, como un bolo o una infusión continua durante un período de tiempo, mediante vías intramusculares, intraperitoneales, cefalorraquídeas, subcutáneas, intraarticulares, intrasinoviales, intratecales, orales, tópicas o por inhalación. Se prefiere la administración intravenosa o subcutánea de un anticuerpo, un conjugado de anticuerpo anti-CD22 con fármacos o un oligopéptido.

La administración de un anticuerpo, un conjugado de anticuerpo anti-CD22 con fármacos o un oligopéptido puede combinarse con otros regímenes terapéuticos. La administración combinada incluye la coadministración, utilizando formulaciones separadas o una única formulación farmacéutica, y la administración consecutiva en cualquier orden, en el que preferentemente exista un período en el cual ambos (o todos los) agentes activos ejerzan simultáneamente sus actividades biológicas. Preferiblemente, este tratamiento combinado desencadena un efecto terapéutico sinérgico.

También puede combinarse, según se desee, la administración de un anticuerpo o anticuerpos anti-CD22, conjugados de anticuerpo anti-CD22 con fármacos u oligopéptidos con la administración de un anticuerpo dirigido contra otro antígeno tumoral o antígeno de la superficie de células B asociado a un cáncer determinado.

En otra forma de realización, los métodos de tratamiento terapéutico de la presente invención incluyen la administración combinada de anticuerpo/s anti-CD22, conjugado/s de anticuerpo anti-CD22 con fármacos o oligopéptido/s y uno o más agentes quimioterapéuticos o agentes inhibidores del crecimiento, incluyendo la coadministración de un cóctel de diferentes agentes quimioterapéuticos. Los agentes quimioterapéuticos incluyen fosfato de estramustina, prednimustina, cisplatino, 5-fluorouracilo, melfalán, ciclofosfamida, hidroxiurea e hidroxiureataxanos (como por ejemplo, paclitaxel y doxetaxel) o antibióticos a base de antraciclina, o todos los anteriores, así como combinaciones de agentes tales como CHOP o FOLFOX, entre otros. Los calendarios de preparación y dosificación para dichos agentes quimioterapéuticos se pueden utilizar de acuerdo a las instrucciones del fabricante y tal y como lo determine empíricamente el médico cualificado. Los calendarios de preparación y dosificación para esta quimioterapia se describen también en *Chemotherapy Service* Ed., M.C. Perry, Williams y Wilkins, Baltimore, MD (1992).

El anticuerpo se administra por cualquier medio apto, incluyendo las vías parenteral, tópica, subcutánea, intraperitoneal, intrapulmonar, intranasal o intralesional, o todas las anteriores. Las infusiones parentales incluyen la administración intramuscular, intravenosa, intraarterial, intraperitoneal y subcutánea. La administración intratecal también se contempla (véase, por ejemplo, la solicitud de patente de EE.UU. N.º 2002/0009444, Grillo-López, A., referente a la introducción intratecal de un anticuerpo CD20). Preferentemente, la dosis se administra por vía intravenosa o subcutánea.

Un segundo medicamento puede administrarse con la exposición inicial o las exposiciones posteriores, o ambas, del anticuerpo terapéutico o la inmunoadhesina, dicha administración combinada incluye la coadministración, utilizando formulaciones separadas o una única formulación farmacéutica, y la administración consecutiva en cualquier orden, en que preferentemente existe un período en el cual ambos (o todos los) agentes activos ejercen simultáneamente sus actividades biológicas.

Si bien el anticuerpo anti-CD22 terapéutico, el conjugado de anticuerpo anti-CD22 con fármacos, la inmunoadhesina u otro fármaco biológico pueden administrarse como un único agente para tratar la enfermedad autoinmune, por lo general, el anticuerpo terapéutico o la inmunoadhesina se combinarán con uno o más medicamentos secundarios. Por ejemplo, en el caso de la artritis reumatoide y otras enfermedades autoinmunes, el anticuerpo, la inmunoadhesina u otro fármaco biológico se combinan preferentemente con uno o más de los agentes inmunosupresores, los agentes quimioterapéuticos, los antagonistas del BAFF, los antagonistas o anticuerpos integrina o las citoquinas, o todos los anteriores, que se enumeran en la sección de definiciones mencionada anteriormente; uno o más de los fármacos antirreumáticos moduladores de la enfermedad (DMARD), como por ejemplo, hidroxiclороquina, sulfasalazina, metotrexato, leflunomida, azatioprina, D-penicilamina, Gold (oral), Gold (intramuscular), minociclina, ciclosporina; inmunoabsorción con proteína A estafilocócica; inmunoglobulina intravenosa (IGIV); medicamentos antiinflamatorios no esteroides (NSAID); glucocorticoide (por ejemplo, a través de una inyección en la articulación); corticosteroide (por ejemplo, metilprednisolona o prednisona); folato; antagonista del factor de necrosis tumoral (TNF), por ejemplo, etanercept/ENBREL™, infliximab/REMICADE™, D2E7 (Knoll) o CDP-870 (Celltech); un antagonista IL-1R (por ejemplo, Kineret); un antagonista IL-10 (por ejemplo, llodecakin); un

modulador de coagulación sanguínea (por ejemplo, WinRho); un antagonista IL-6/anti-TNF (CBP 1011); un antagonista CD40 (por ejemplo, IDEC 131); antagonista del receptor de Ig-Fc (MDX33); inmunomodulador (por ejemplo, talidomida o ImmuDyn); un anticuerpo anti-CD5 (por ejemplo, H5g1.1); un inhibidor de macrófagos (por ejemplo, MDX 33); un bloqueante coestimulador (por ejemplo, BMS 188667 o Tolerimab); un inhibidor del complemento (por ejemplo, h5G1.1, 3E10 o un anticuerpo del factor de aceleración del decaimiento (DAF)); un antagonista IL-2 (zxSMART); un inhibidor de EGFR (véase la definición anterior); un inhibidor de tirosina quinas (véase definición anterior); un agente anti-angiogénico (por ejemplo, anticuerpo VEGF tal como bevacizumab); anticuerpos CD22 tales como LL2 o epratuzumab (LYMPHOCIDE®; Immunomedics), incluyendo epratuzumab Y-90 (Juweid y col., *Cancer Res* 55(23 Suppl):5899s-5907s (1995)), un anticuerpo CD22 de Abiogen (Abiogen, Italia), CMC 544 (Wyeth/Celltech), combotox (UT Southwestern), BL22 (NIH) y LymphoScan Tc99 (Immunomedics); anticuerpo EpCAM tal como 17-1A (PANOREX®); anticuerpo $\nabla v \nabla 3$ (por ejemplo, VITAXIN®; Medimmune); anticuerpo CD37 tal como TRU 016 (Trubion); anticuerpo IL-21 (Zymogenetics/Novo Nordisk); anticuerpo anti-células B (Impheron); MAb que actúa sobre las células B (Immunogen/Aventis); 1D09C3 (Morphosys/GPC); LymphoRad 131 (HGS); anticuerpo Y-90 Lym-1 (USC); LIF 226 (Enhanced Lifesci); anticuerpo BAFF (por ejemplo, documento WO 03/33658); anticuerpo del receptor de BAFF (por ejemplo, documento WO 02/24909); anticuerpo BR3; anticuerpo Blys tal como belimumab; LYMPHOSCD22 -B™; Oncolym anti-Lym-1 (USC/Peregrine); ISF 154 (UCSD/Roche/Tragen); gomilixima (Idec 152; Biogen Idec); anticuerpo del receptor de IL-6 tal como atlizumab (ACTEMRA™; Chugai/Roche); anticuerpo IL-15 tal como HuMax-IL-15 (Genmab/Amgen); anticuerpo del receptor de la quimioquina tal como un anticuerpo CCR2 (por ejemplo, MLN1202; Millienneum); anticuerpo anticomplemento tal como el anticuerpo C5 (por ejemplo, eculizumab, 5G1.1; Alexion); formulación oral de inmunoglobulina humana (por ejemplo, IgPO; Protein Therapeutics); anticuerpo IL-12 tal como ABT-874 (CAT/Abbott); Teneliximab (BMS-224818); vacuna de células B; DN-BAFF (Xencor); CRx-119 (CombinatoRx); antagonista del BAFF de Amgen; pentostatina (Pfizer); IC-485 (ICOS); antagonista de la quimioquina tal como T-487 (Tularik) o reticulosa (AVR-118); SCO-323 (SCIOS); antagonista de la integrina 683699, Tanabe, NGD-2001-1 (Neurogen); SCIO-469 (SCIOS); BIRB-796 (Boehringer Ingelheim); VX702,

VX850 (Vertex); antagonista de leucotrieno B-4 (tal como amelubunt, BIL-284; BI); modulador de microtúbulos (Paxceed; Angiotech); inhibidor de la proteasa (MBS561392; BMS); AGIX-4207 (Atherogenics); ISIS-104838 (ISIS/Elan); MFG-IRAP (Univ. Pitt.); IL-1 Trap (RGN-303; Regeneron/Novartis); oprelvequin (Wyeth); everolimo (Certican; Novartis); Amevive (Biogen Idec); ORG-39141 (Organon); FK-506 (Fujisawa); y un antagonista de IL-2 (tacrolimo; Fujisawa).

A continuación se incluye una descripción detallada de anticuerpos anti-CD22 ejemplares:

1. Formas de realización específicas de anticuerpos anti-CD22

En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo que comprende al menos una, dos, tres, cuatro, cinco o seis regiones hipervariables seleccionadas de (a) una HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos del identificador de secuencia n.º 2; (b) una HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos del identificador de secuencia n.º 4; (c) una HVR-H3 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del identificador de secuencia n.º 6; (d) una HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de cualquiera de los identificadores de secuencia n.º 9, 10, 19, 20, 21, 22, 23; (e) una HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos del identificador de secuencia n.º 12 y (f) una HVR-L3 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del identificador de secuencia n.º 14.

En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo anti-CD22 que comprende al menos una, dos o las tres secuencias de la HVR de VH seleccionadas de (a) una HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos del identificador de secuencia n.º 2; (b) una HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos del identificador de secuencia n.º 4; (c) una HVR-H3 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del identificador de secuencia n.º 6. En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo anti-CD22 que comprende una HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos del identificador de secuencia n.º 2. En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo anti-CD22 que comprende una HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos del identificador de secuencia n.º 4. En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo anti-CD22 que comprende una HVR-H3 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del identificador de secuencia n.º 6.

En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo anti-CD22 que comprende una HVR-H3 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del identificador de secuencia n.º: 6 y una HVR-H1 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del identificador de secuencia n.º: 2.

En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo anti-CD22 que comprende una HVR-H3 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del identificador de secuencia n.º: 6 y una HVR-H2 que comprende una secuencia de aminoácidos del identificador de secuencia n.º: 4.

En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo anti-CD22 que comprende una HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos del identificador de secuencia n.º: 2 y una HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos del identificador de secuencia n.º: 4.

En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo anti-CD22 que comprende una HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos del identificador de secuencia n.º: 2 y una HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos del identificador de secuencia n.º: 4 y una HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos del identificador de secuencia n.º: 6.

En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo anti-CD22 que comprende al menos una, al menos dos o todas las tres secuencias HVR de VL seleccionadas de (a) una HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos del identificador de secuencia n.º: 9 o del identificador de secuencia n.º: 10; (b) una HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos del identificador de secuencia n.º: 12 y (c) una HVR-L3 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del identificador de secuencia n.º: 14. En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo anti-CD22 que comprende una HVR-L1 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del identificador de secuencia n.º 9. En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo anti-CD22 que comprende una HVR-L1 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del identificador de secuencia n.º: 10. En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo anti-CD22 que comprende una HVR-L1 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del identificador de secuencia n.º: 19-23. En un aspecto, la HVR-L1 comprende la secuencia de aminoácidos del identificador de secuencia n.º: 9 en la que V sustituye a N28 (cambio del aminoácido N28V, que genera el identificador de secuencia n.º: 10). En un aspecto, la HVR-L1 comprende la secuencia de aminoácidos del identificador de

secuencia n.º: 9 en la que A sustituye a N28 (cambio del aminoácido N28A, que genera el identificador de secuencia n.º: 19). En un aspecto, la HVR-L1 comprende la secuencia de aminoácidos del identificador de secuencia n.º: 9 en la que Q sustituye a N28 (cambio del aminoácido N28Q, que genera el identificador de secuencia n.º: 20). En un aspecto, la HVR-L1 comprende la secuencia de aminoácidos del identificador de secuencia n.º: 9 en la que S sustituye a N28 (cambio del aminoácido N28S, que genera el identificador de secuencia n.º: 21). En un aspecto, la HVR-L1 comprende la secuencia de aminoácidos del identificador de secuencia n.º: 9 en la que D sustituye a N28 (cambio del aminoácido N28D, que genera el identificador de secuencia n.º: 22). En un aspecto, la HVR-L1 comprende la secuencia de aminoácidos del identificador de secuencia n.º: 9 en la que I sustituye a N28 (cambio del aminoácido N28I, que genera el identificador de secuencia n.º: 23). En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo anti-CD22 que comprende una HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de cualquiera de los identificadores de secuencia n.º 9, 10, 19, 20, 21, 22, 23. En un aspecto, la HVR-L1 es cualquiera de los identificadores de secuencia n.º 9, 10, 19, 20, 21, 22 ó 23 y A sustituye al aminoácido en la posición N30 (asparagina en posición 30) (cambio del aminoácido N30A). En un aspecto, la HVR-L1 es cualquiera de los identificadores de secuencia n.º 9, 10, 19, 20, 21, 22 ó 23 y Q sustituye al aminoácido en la posición N30 (asparagina en posición 30) (cambio del aminoácido N30Q).

En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo anti-CD22 que comprende (a) una HVR-H3 que comprende una secuencia de aminoácidos del identificador de secuencia n.º: 6 y (b) una HVR-L3 que comprende una secuencia de aminoácidos del identificador de secuencia n.º: 14. En ciertas formas de realización, el anticuerpo CD22 además comprende (a) una HVR-H1 que comprende un identificador de secuencia n.º: 2 y una HVR-H2 que comprende un identificador de secuencia n.º: 4.

En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo anti-CD22 que comprende (a) una HVR-H3 que comprende una secuencia de aminoácidos del identificador de secuencia n.º: 6 y (b) una HVR-L2 que comprende una secuencia de aminoácidos del identificador de secuencia n.º: 12. En ciertas formas de realización, el anticuerpo CD22 además comprende (a) una HVR-H1 que comprende un identificador de secuencia n.º: 2 y una HVR-H2 que comprende un identificador de secuencia n.º: 4.

127

En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo anti-CD22 que comprende (a) una HVR-H3 que comprende una secuencia de aminoácidos del identificador de secuencia n.º: 6 y (b) una HVR-L1 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del identificador de secuencia n.º: 9, 10, 19, 20, 21, 22 y 23. En ciertas formas de realización, el anticuerpo CD22 además comprende (a) una HVR-H1 que comprende un identificador de secuencia n.º: 2 y una HVR-H2 que comprende un identificador de secuencia n.º: 4. En ciertas formas de realización, la secuencia de aminoácidos del identificador de secuencia n.º: 9, 10, 19, 20, 21, 22 ó 23 comprende un cambio del aminoácido N30Q o N30A. En ciertas formas de realización, el anticuerpo CD22 además comprende la HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos del identificador de secuencia n.º: 12. En ciertas formas de realización, el anticuerpo CD22 además comprende la HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos del identificador de secuencia n.º: 14.

En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo anti-CD22 que comprende (a) una HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos del identificador de secuencia n.º: 2; (b) una HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos del identificador de secuencia n.º: 4; (c) una HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos del identificador de secuencia n.º: 6; (d) una HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada del identificador de secuencia n.º: 9, 10, 19, 20, 21, 22, 23; (e) una HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos del identificador de secuencia n.º: 12 y una HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos del identificador de secuencia n.º: 14. En ciertas formas de realización, la invención además proporciona la secuencia de aminoácidos del identificador de secuencia n.º: 9, 10, 19, 20, 21, 22 ó 23 seleccionada cuando HVR-L1 se ve modificada por un cambio del aminoácido N30A o N30Q.

En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo anti-CD22 que comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende un identificador de secuencia n.º: 16 (véase la Figura 2A, h10F4v1). En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo anti-CD22 que comprende un dominio variable de cadena ligera que comprende un identificador de secuencia n.º: 17 (véase la Figura 2B, h10F4v1). En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo anti-CD22 que comprende un dominio variable de cadena ligera que comprende un identificador de secuencia n.º: 18 (véase la Figura 2B, h10F4v3).

124

En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo anti-CD22 que comprende una cadena pesada que comprende un identificador de secuencia n.º: 34 (véase la Figura 2A, m10F4). En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo anti-CD22 que comprende una cadena ligera que comprende un identificador de secuencia n.º: 35 (véase la Figura 2B, m10F4).

En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo anti-CD22 que comprende 1, 2, 3, 4, 5 ó 6 de las secuencias de la HVR del anticuerpo 10F4.4.1 producido por el hibridoma depositado con la ATCC y con entrada número PTA-7621.

En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo anti-CD22 que comprende 1, 2, 3, 4, 5 ó 6 de las secuencias de la HVR del anticuerpo 5E8.1.8 producido por el hibridoma depositado con la ATCC y con entrada número PTA-7620.

Un anticuerpo anti-CD22 puede comprender cualquier secuencia de dominio variable de la estructura adecuada, siempre que el anticuerpo conserve la capacidad de unirse a CD22. Por ejemplo, en ciertas formas de realización, los anticuerpos anti-CD22 de la invención comprenden una secuencia de consenso de la estructura de la cadena pesada del subgrupo III humano. En una forma de realización de estos anticuerpos, la secuencia de consenso de la estructura de la cadena pesada involucra sustituciones en la posición 71, 73 ó 78. En una forma de realización de estos anticuerpos, la posición 71 corresponde a A, la posición 73 corresponde a T o la posición 78 corresponde a A. En una forma de realización, estos anticuerpos comprenden una secuencia de estructura de dominio variable de la cadena pesada de huMAb4D5-8, por ejemplo, el identificador de secuencia n.º: 1, 3, 5, 7 (FR-H1, FR-H2, FR-H3, FR-H4, respectivamente). huMAb4D5-8 se conoce comercialmente como el anticuerpo anti-HER2 HERCEPTIN[®], Genentech, Inc., South San Francisco, CA, Estados Unidos; también mencionado en las patentes de EE.UU N.º 6,407,213 y 5,821,337; y en Lee y col., *J. Mol. Biol.* (2004), 340(5):1073-93. En dicha forma de realización, estos anticuerpos además comprenden una secuencia de consenso de la estructura de cadena ligera I humana. En una de esas formas de realización, estos anticuerpos comprenden una secuencia de la estructura de dominio variable de la cadena ligera de huMAb4D5-8, por ejemplo, el identificador de secuencia n.º: 8, 1, 13, 15 (FR-L1, FR-L2, FR-L3, FR-L4, respectivamente).

En una forma de realización, un anticuerpo anti-CD22 comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende una secuencia de estructura y regiones hipervariables, en las que la secuencia de estructura comprende las secuencias FR-H1-FR-H4 del identificador de secuencia n.º: 1, 3, 5 y 7 respectivamente; la HVR-H1 comprende la secuencia de aminoácidos del identificador de secuencia n.º: 2; la HVR-H2 comprende la secuencia de aminoácidos del identificador de secuencia n.º: 4 y la HVR-H3 comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del identificador de secuencia n.º: 6. En una forma de realización, un anticuerpo anti-CD22 comprende un dominio variable de cadena ligera que comprende una secuencia de estructura y regiones hipervariables, en las que la secuencia de estructura comprende las secuencias FR-L1-FR-L4 de los identificadores de frecuencia n.º. 8, 11, 13 y 15 respectivamente; la HVR-L1 comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada del identificador de secuencia n.º: 9, 10, 19, 20, 21, 22 y 23, en las que cualquiera de los identificadores de secuencia n.º 9-10 ó 19-23 puede comprender un cambio del aminoácido N30A o N30Q; la HVR-L2 comprende la secuencia de aminoácidos del identificador de secuencia n.º: 12 y la HVR-L3 comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del identificador de secuencia n.º: 14. En una forma de realización de estos anticuerpos, el dominio variable de cadena pesada comprende un identificador de secuencia n.º: 16 y el dominio variable de cadena ligera comprende el identificador de secuencia n.º: 17 ó 18.

En ciertas formas de realización, la invención proporciona un anticuerpo anti-CD22 que comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos con al menos un 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identificación de secuencia con respecto a una secuencia de aminoácidos del identificador de secuencia n.º: 16. En ciertas formas de realización, una secuencia de aminoácidos con al menos un 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identificación de secuencia contiene sustituciones, inserciones o eliminaciones relativas a la secuencia de referencia; sin embargo, un anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos conserva la capacidad de unirse a CD22. En ciertas formas de realización, un total de entre 1 y 10 aminoácidos se han sustituido, insertado o eliminado en una secuencia del identificador de secuencia n.º: 16. En ciertas formas de realización, las sustituciones, inserciones o eliminaciones se producen

en las regiones externas a las HVR (es decir, en las FR). En ciertas formas de realización, un anticuerpo anti-CD22 comprende un dominio variable de cadena pesada que contiene una secuencia de aminoácidos del identificador de secuencia n.º: 16.

En ciertas formas de realización, la invención proporciona un anticuerpo anti-CD22 que comprende un dominio variable de cadena pesada, tal como se describe a continuación.

1 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Glu Phe Ser Arg Ser
Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly
Arg Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr Ser Gly Lys Phe Lys Gly
 Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Leu Gln
 Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
Asp Gly Ser Ser Trp Asp Trp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 Leu Val Thr Val Ser Ser 113 (Identificador de secuencia n.º: 16) (Los
 residuos de la HVR aparecen subrayados).

En ciertas formas de realización, las secuencias de la HVR y FR de cadena pesada comprenden los siguientes elementos:

- HVR-H1 (Gly Tyr Glu Phe Ser Arg Ser Trp Met Asn, identificador de secuencia n.º: 2)
- HVR-H2 (Gly Arg Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr Ser Gly Lys Phe Lys Gly, identificador de secuencia n.º: 4)
- HVR-H3 (Asp Gly Ser Ser Trp Asp Try Tyr Phe Asp Tyr, identificador de secuencia n.º: 6)
- FR-H1 (Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser, identificador de secuencia n.º: 1)
- FR-H2 (Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val, identificador de secuencia n.º: 3)
- FR-H3 (Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg, identificador de secuencia n.º: 5)
- FR-H4 (Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser, identificador de secuencia n.º: 7)

127

En ciertas formas de realización, la invención proporciona un anticuerpo anti-CD22 que comprende un dominio variable de cadena ligera, tal como se describe a continuación.

1 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Asn
Gly Asn Thr Phe Leu Glu Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro Ser Arg
Phe Ser Gly Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser
Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser Gln
Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg 108
(Identificador de secuencia n.º: 17) (Los residuos de la HVR
aparecen subrayados y la posición N28 aparece en negrita.)

o
1 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser
Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile
Val His Ser Val Gly Asn Thr Phe Leu Glu Trp Tyr Gln Gln Lys
Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg
Phe Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Arg Ser Gly Thr
Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala
Thr Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser Gln Phe Pro Tyr Thr Phe Gly
Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg 108 (Identificador de
secuencia n.º: 18) (Los residuos de la HVR aparecen
subrayados y la posición N28V aparece en negrita.)

En ciertas formas de realización, las secuencias de la HVR de cadena ligera comprenden los siguientes elementos:

HVR-L1 (Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Asn Gly Asn Thr Phe Leu Glu, identificador de secuencia n.º: 9)

HVR-L1 (Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Val Gly Asn Thr Phe Leu Glu, identificador de secuencia n.º: 10)

HVR-L1 (Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Ala Gly Asn Thr Phe Leu Glu, identificador de secuencia n.º: 19)

HVR-L1 (Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Gln Gly Asn Thr Phe Leu Glu, identificador de secuencia n.º: 20)

HVR-L1 (Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Ser Gly Asn Thr Phe Leu Glu, identificador de secuencia n.º: 21)

HVR-L1 (Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Asp Gly Asn Thr Phe Leu Glu, identificador de secuencia n.º: 22)

HVR-L1 (Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Ile Gly Asn Thr Phe Leu Glu, identificador de secuencia n.º: 23)

HVR-L1 (Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Ile Gly Ala Thr Phe Leu Glu, identificador de secuencia n.º: 32)

HVR-L1 (Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Ile Gly Gln Thr Phe Leu Glu, identificador de secuencia n.º: 33)

HVR-L2 (Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser, identificador de secuencia n.º:12)

HVR-L3 (Phe Gln Gly Ser Gln Phe Pro Tyr Thr, identificador de secuencia n.º: 14).

En ciertas formas de realización, las secuencias de la FR de cadena ligera comprenden los siguientes elementos:

FR-L1 (Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys, identificador de secuencia n.º: 8);

FR-L2 (Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr, identificador de secuencia n.º: 11);

FR-L3 (Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys, identificador de secuencia n.º: 13)

FR-L4 (Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg, identificador de secuencia n.º: 15).

En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo anti-CD22 que comprende un dominio variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos con al menos un 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identificación de secuencia con respecto a una secuencia de aminoácidos seleccionada del identificador de secuencia n.º: 17 ó 18. En ciertas formas de realización, una secuencia de aminoácidos con al menos un 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identificación de secuencia contiene sustituciones, adiciones o eliminaciones relativas a la secuencia de referencia; sin embargo, un anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos conserva la capacidad de unirse a CD22. En ciertas formas de realización, un total de entre 1 y 10 aminoácidos se han sustituido, insertado o eliminado en una secuencia seleccionada del identificador de secuencia n.º: 17 ó 18. En ciertas formas de realización, las sustituciones, inserciones o eliminaciones

se producen las regiones externas a las HVR (es decir, en las FR). En ciertas formas de realización, un anticuerpo anti-CD22 comprende un dominio variable de cadena ligera que contiene una secuencia de aminoácidos seleccionada a partir del identificador de secuencia n.º: 17 ó 18.

En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo anti-CD22 que comprende (a) un dominio variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos con al menos un 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identificación de secuencia con respecto a una secuencia de aminoácidos seleccionada del identificador de secuencia n.º: 16 y (b) un dominio variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos con al menos un 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identificación de secuencia con respecto a una secuencia de aminoácidos seleccionada del identificador de secuencia n.º: 17 ó 18. En ciertas formas de realización, una secuencia de aminoácidos con al menos un 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identificación de secuencia contiene sustituciones, adiciones o eliminaciones relativas a la secuencia de referencia; sin embargo, un anticuerpo que comprende esa secuencia de aminoácidos conserva la capacidad de unirse a CD22. En ciertas formas de realización, un total de entre 1 y 10 aminoácidos se han sustituido, insertado o eliminado en la secuencia de referencia. En ciertas formas de realización, las sustituciones, inserciones o eliminaciones se producen en regiones externas a las HVR (es decir, en las FR). En ciertas formas de realización, un anticuerpo anti-CD22 comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos del identificador de secuencia n.º: 16 y un dominio variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del identificador de secuencia n.º: 18.

En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo anti-CD22 que comprende (a) una, dos o tres HVR de VH seleccionadas de las que se muestran en la Figura 2A o (b) una, dos o tres HVR de VL seleccionadas de las que se muestran en la Figura 2B. En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo anti-CD22 que comprende un dominio variable de cadena pesada seleccionado entre los que se muestran en la Figura 2A y un dominio variable de cadena ligera seleccionado entre los que se muestran en la Figura 2B.

En un aspecto, el anticuerpo anti-CD22 de la invención comprende 1, 2, 3, 4, 5 ó 6 de las regiones hipervariables del anticuerpo 5E8.1.8 producido por el hibridoma depositado con la ATCC y con entrada número PTA-7620.

2. Fragmentos de anticuerpos

La presente invención comprende fragmentos de anticuerpos. Los fragmentos de anticuerpos se pueden generar por métodos tradicionales, como digestión enzimática, o mediante técnicas recombinantes. En determinadas circunstancias, resulta útil utilizar fragmentos de anticuerpos en vez de anticuerpos completos. El menor tamaño de los fragmentos permite una rápida eliminación y puede brindar un mejor acceso a los tumores sólidos. Para obtener una revisión de determinados fragmentos de anticuerpos, véase Hudson y col. (2003) *Nat. Med.* 9:129-134.

Se han desarrollado varias técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpos. Tradicionalmente, estos fragmentos se obtenían mediante digestión proteolítica de anticuerpos intactos (véase, por ejemplo, Morimoto y col., *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 24:107-117 (1992) y Brennan y col., *Science*, 229:81 (1985)). Sin embargo, estos fragmentos ahora pueden producirse directamente mediante células huésped recombinantes. Los fragmentos de anticuerpos Fab, Fv y ScFv pueden expresarse todos en *E. coli* y secretarse a partir de *E. coli*, lo que permite la fácil producción de grandes cantidades de estos fragmentos. Los fragmentos de anticuerpos se pueden aislar de las bibliotecas de fagos descritas anteriormente. De manera alternativa, los fragmentos Fab'-SH pueden recuperarse directamente de *E. coli* y unirse químicamente para formar fragmentos F(ab')₂ (Carter y col., *Bio/Technology* 10:163-167 (1992)). Según otro método, los fragmentos F(ab')₂ se pueden aislar directamente desde cultivos de células huésped recombinantes. El Fab y el fragmento F(ab')₂ con mayor semivida *in vivo* que comprende residuos de un epítipo de unión a receptor de rescate se describe en la patente de EE.UU. N.º 5.869.046. Otras técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpos serán conocidas por los expertos en la materia. En ciertas formas de realización, un anticuerpo es un fragmento Fv de cadena única (scFv). Véase el documento WO 93/16185; la patente de EE.UU. N.º 5.571.894 y la patente de EE.UU. N.º 5.587.458. Fv y scFv son las únicas especies con puntos de combinación intactos que están privados de regiones constantes; por ello, pueden ser aptos para una unión no específica reducida durante el uso *in vivo*. Las proteínas de fusión scFv se pueden construir para obtener la fusión de una

(3)

proteína efectora en el extremo carboxi terminal o amino terminal de un scFv. Véase *Antibody Engineering*, ed. Borrebaeck, mencionado anteriormente. El fragmento de anticuerpo puede ser también un “anticuerpo lineal”, por ejemplo, tal y como se describe en la patente de EE.UU. N.º 5.641.870. Estos anticuerpos lineales pueden ser monoespecíficos o biespecíficos.

3. Anticuerpos humanizados

La presente invención comprende anticuerpos humanizados. En la materia se conocen diversos métodos para humanizar anticuerpos no humanos. Por ejemplo, un anticuerpo humanizado puede tener uno o más residuos de aminoácidos introducidos en él desde una fuente que sea no humana. Estos residuos de aminoácidos no humanos se conocen a menudo como residuos “importados”, que generalmente se toman de un dominio variable de “importación”. La humanización se puede realizar esencialmente siguiendo el método de Winter y sus colaboradores (Jones y col., (1986) *Nature* 321:522-525; Riechmann y col. (1988) *Nature* 332:323-327; Verhoeyen y col. (1988) *Science* 239:1534-1536), sustituyendo las secuencias de la región hipervariable por las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano. Por consiguiente, dichos anticuerpos “humanizados” son anticuerpos quiméricos (patente de EE.UU. N.º 4.816.567) en donde se ha sustituido sustancialmente menos de un dominio variable humano intacto por la secuencia correspondiente de especies no humanas. En la práctica, los anticuerpos humanizados son generalmente anticuerpos humanos en los que los residuos de la región hipervariable y posiblemente algunos residuos de la FR se sustituyen por residuos de sitios análogos en los anticuerpos de roedores.

La elección de los dominios variables humanos, tanto ligeros como pesados, para realizar los anticuerpos humanizados puede ser muy importante para disminuir la antigenicidad. De acuerdo con el llamado método del “más apto”, la secuencia del dominio variable de un anticuerpo de un roedor se compara con toda la biblioteca conocida de secuencias de dominio variable de humanos. Entonces, se acepta la secuencia humana más parecida a la de los roedores como estructura humana para el anticuerpo humanizado (Sims y col. (1993) *J. Immunol.* 151:2296; Chothia y col. (1987) *J. Mol. Biol.* 196:901). Otro método utiliza una estructura concreta derivada de la secuencia de consenso de todos los anticuerpos humanos de un subgrupo en particular de cadenas ligeras o pesadas. Esta misma estructura se puede usar para varios anticuerpos

378

humanizados diferentes (Carter y col. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4285; Presta y col. (1993) *J. Immunol.*, 151:2623).

Es deseable también, por lo general, que los anticuerpos se humanicen con retención de alta afinidad para el antígeno y otras propiedades biológicas favorables. Para lograr este objetivo, siguiendo uno de los métodos, los anticuerpos humanizados se preparan mediante un proceso de análisis de las secuencias parentales y varios productos humanizados conceptuales por medio de modelos tridimensionales de las secuencias parentales y humanizadas. Generalmente se dispone de modelos de inmunoglobina tridimensional conocidos por los expertos en la materia. Existen programas informáticos que ilustran y muestran estructuras conformacionales tridimensionales probables de secuencias de inmunoglobulina candidata. La inspección de estas visualizaciones posibilita el análisis de la función probable de los residuos en el funcionamiento de la secuencia de inmunoglobulina candidata, es decir, el análisis de aquellos residuos que influyen en la capacidad de la inmunoglobulina candidata para unirse a su antígeno. De esta manera, los residuos de la FR se pueden seleccionar y combinar a partir de las secuencias receptoras y de importación para lograr la característica deseada del anticuerpo, como por ejemplo, una mayor afinidad para el/los antígeno/s diana. En general, los residuos de la región hipervariable están directamente y más considerablemente involucrados en la influencia que se ejerce sobre la unión a antígeno.

4. Anticuerpos humanos

Los anticuerpos humanos anti-CD22 de la invención se pueden construir combinando una o más secuencias de dominio variable Fv de clones seleccionadas de bibliotecas de representación en imágenes de fagos derivados de humanos con una o más secuencias de dominio constante humanas, como se ha descrito anteriormente. Alternativamente, los anticuerpos anti-CD22 monoclonales humanos de la invención se pueden producir mediante el método del hibridoma. Las líneas celulares del mieloma humano y heteromieloma humano-murino también se han descrito para la producción de anticuerpos monoclonales humanos, por ejemplo, Kozbor, *J. Immunol.*, 133: 3001 (1984); Brodeur y col., *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, págs. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987) y Boerner y col, *J. Immunol.*, 147: 86 (1991).

Actualmente es posible producir animales transgénicos (por ejemplo, ratones) que sean capaces, una vez inmunizados, de generar un repertorio completo de anticuerpos humanos cuando no exista producción de inmunoglobulina endógena. Por ejemplo, se ha descrito que la eliminación homocigótica del gen de la región de unión (JH) de la cadena pesada del anticuerpo en ratones quiméricos y mutantes de línea germinal ocasiona la inhibición total de la producción de anticuerpos endógenos. La transferencia de la matriz de genes humanos de la inmunoglobulina de línea germinal en uno de estos ratones mutantes de línea germinal ocasionará la producción de anticuerpos humanos al actuar sobre el antígeno. Véase, por ejemplo, Jakobovits y col., *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 90: 2551 (1993); Jakobovits y col., *Nature*, 362: 255 (1993); Bruggermann y col., *Year in Immunol.*, 7: 33 (1993).

También se puede utilizar la combinación de genes para derivar anticuerpos humanos de no humanos, por ejemplo, anticuerpos de roedores, en los que el anticuerpo humano tiene afinidades y especificidades similares a las del anticuerpo no humano de partida. Según este método, que también se denomina "impronta de epítomos", la región variable de cadena pesada o ligera de un fragmento de anticuerpo no humano obtenido mediante técnicas de representación en imágenes de fagos, como las descritas anteriormente, se sustituye por un repertorio de genes de dominio V humanos, lo que crea una población de quimeras Fab o scFv de cadena humana/cadena no humana. La selección con el antígeno da lugar al aislamiento de un Fab o scFV quimérico de cadena humana/cadena no humana, en el que la cadena humana restaura el sitio de unión a antígeno destruido al eliminar la cadena no humana correspondiente del clon de representación de fagos primario; es decir, el epítipo rige (impregna) la elección de la molécula de la cadena humana. Cuando se repite el proceso para sustituir la cadena no humana restante, se obtiene un anticuerpo humano (véase el documento PCT WO 93/06213 publicado el 1 de abril de 1993). A diferencia de la tradicional humanización de anticuerpos no humanos mediante transplante de CDR, esta técnica proporciona anticuerpos completamente humanos que no tienen residuos de la FR o CDR de origen no humano.

5. Anticuerpos biespecíficos

Los anticuerpos biespecíficos son anticuerpos monoclonales que tienen especificidades de unión con al menos dos antígenos diferentes. En ciertas formas de realización, los anticuerpos biespecíficos son anticuerpos humanos o

humanizados. En ciertas formas de realización, una de las especificidades de unión corresponde a CD22 y la otra, a cualquier otro antígeno. En ciertas formas de realización, los anticuerpos biespecíficos se pueden unir a dos epítopos diferentes de CD22. Los anticuerpos biespecíficos también se pueden utilizar para localizar agentes citotóxicos de las células que expresan el CD22. Estos anticuerpos poseen un brazo de unión a CD22 y un brazo que se une a un agente citotóxico, como por ejemplo, saporina, anti-interferón- α , alcaloide de la vinca, cadena de ricina A, metotrexato o hapteno con un isótopo radiactivo. Los anticuerpos biespecíficos se pueden preparar como anticuerpos de longitud completa o fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos $F(ab')_2$).

Los procedimientos para realizar anticuerpos biespecíficos son conocidos en la materia. La producción recombinante tradicional de anticuerpos biespecíficos se basa en la coexpresión de dos pares de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina, en donde las dos cadenas tienen distintas especificidades (Milstein y Cuello, *Nature*, 305: 537 (1983)). Debido a la variedad aleatoria de las cadenas pesadas y ligeras de la inmunoglobulina, estos hibridomas (células híbridas) producen una posible mezcla de 10 moléculas diferentes de anticuerpos, de las cuales sólo una tiene la estructura biespecífica correcta. La purificación de la molécula correcta, que generalmente se realiza mediante etapas de cromatografía de afinidad, es bastante complicada, y la cantidad de producto que se obtiene es baja. Se describen procedimientos similares en el documento WO 93/08829 publicado el 13 de mayo de 1993 y en Traunecker y col., *EMBO J.*, 10: 3655 (1991).

Según un método distinto, los dominios variables de anticuerpos con las especificidades de unión deseadas (puntos de combinación anticuerpo-antígeno) se fusionan con las secuencias de dominio constante de inmunoglobulina. La fusión se realiza, por ejemplo, con un dominio constante de la cadena pesada de la inmunoglobulina, que comprende al menos parte de las regiones bisagra, CH2 y CH3. En ciertas formas de realización, la primera región constante de la cadena pesada (CH1), que contiene el lugar necesario para la unión de la cadena ligera, está presente en al menos una de las fusiones. Los ADN que codifican las fusiones de la cadena pesada de la inmunoglobulina y, si se desea, de la cadena ligera de la inmunoglobulina, se insertan en vectores de expresión separados y se cotransfectan a un organismo huésped adecuado. Esto proporciona mayor

flexibilidad al ajustar las proporciones mutuas de los tres fragmentos de polipéptidos en formas de realización en donde las proporciones desiguales de las tres cadenas de polipéptidos utilizados en la construcción proporcionan rendimientos óptimos. Sin embargo, es posible insertar las secuencias de codificación de dos o de las tres cadenas de polipéptidos en un vector de expresión cuando la expresión de al menos dos cadenas de polipéptidos con proporciones iguales genera rendimientos altos o cuando las proporciones no tienen particular importancia.

En una forma de realización de este método, los anticuerpos biespecíficos se componen de una cadena pesada de inmunoglobulina híbrida con una primera especificidad de unión en un brazo y un par de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina híbrida (que proporciona una segunda especificidad de unión) en el otro brazo. Se descubrió que esta estructura asimétrica facilita la separación del compuesto biespecífico deseado de las combinaciones de cadenas de inmunoglobulina no deseadas, ya que la presencia de una cadena ligera de inmunoglobulina en sólo una de las mitades de la molécula biespecífica proporciona una forma sencilla de separación. Este método se desveló en el documento WO 94/04690. Para obtener mayores detalles sobre la generación de anticuerpos biespecíficos, véase, por ejemplo, Suresh y col., *Methods in Enzymology*, 121:210 (1986).

Según otro método, la interfaz entre un par de moléculas de anticuerpos se puede modificar para maximizar el porcentaje de heterodímeros que se recuperan de un cultivo de células recombinantes. La interfaz comprende al menos una parte del dominio C_H3 de un dominio constante de anticuerpos. En este método, una o más cadenas laterales cortas de aminoácidos de la interfaz de la primera molécula del anticuerpo se reemplazan con cadenas laterales más largas (por ejemplo, tirosina o triptofano). Las "cavidades" compensatorias de tamaño idéntico o similar a la(s) cadena(s) lateral(es) larga(s) se crean en la interfaz de la segunda molécula del anticuerpo al reemplazar las cadenas laterales largas de aminoácidos por cadenas más cortas (por ejemplo alanina o treonina). Esto proporciona un mecanismo para incrementar la producción del heterodímero con relación a otros productos finales no deseados como los homodímeros.

Los anticuerpos biespecíficos incluyen anticuerpos reticulantes o "heteroconjugados". Por ejemplo, uno de los anticuerpos en el heteroconjugado se puede unir a la avidina y el otro a la biotina. Estos anticuerpos se han

propuesto, por ejemplo, para conseguir que las células del sistema inmunitario actúen sobre células no deseadas (patente de EE. UU. N.º 4.676.980) y para el tratamiento de la infección de VIH (documentos WO 91/00360 y WO 92/00373, y la patente europea EP 03089). Los anticuerpos heteroconjugados pueden obtenerse utilizando cualquier método reticulante conveniente. Los agentes reticulantes adecuados se conocen bien en la materia y se desvelan en la patente de EE. UU. N.º 4.676.980, junto con una serie de técnicas de reticulación.

Las técnicas para generar anticuerpos biespecíficos a partir de fragmentos de anticuerpos también se han descrito en la bibliografía. Por ejemplo, los anticuerpos biespecíficos se pueden preparar mediante un enlace químico. Brennan y col., *Science*, 229: 81 (1985) describe un procedimiento en el que los anticuerpos intactos se separan proteolíticamente para generar fragmentos F(ab')₂. Estos fragmentos se reducen en presencia de arsenito de sodio del agente que forma complejos con el ditiol para estabilizar los ditiolos vecinales y evitar la formación de disulfuros intermoleculares. Los fragmentos Fab' generados posteriormente se convierten en derivados del tionitrobenzoato (TNB). Uno de los derivados del Fab'-TNB posteriormente se reconvierte en Fab'-tiol por reducción con mercaptoetilamina y se mezcla con una cantidad equimolar de otro derivado del Fab'-TNB para formar el anticuerpo biespecífico. Los anticuerpos biespecíficos producidos se pueden utilizar como agentes para la inmovilización selectiva de enzimas.

Descubrimientos actuales han facilitado la recuperación directa de fragmentos Fab'-SH de *E. coli*, que se pueden unir químicamente para formar anticuerpos biespecíficos. Shalaby y col., *J. Exp. Med.*, 175: 217-225 (1992) describe la producción de una molécula F(ab')₂ de anticuerpo biespecífico completamente humanizado. Cada fragmento Fab' se secretó por separado a partir de *E. coli* y se sometió a un emparejamiento químico dirigido *in vitro* para formar el anticuerpo biespecífico. Por lo tanto, el anticuerpo biespecífico formado era capaz de unirse a células que sobreexpresaban el receptor HER2 y las células T humanas normales, así como de desencadenar la actividad lítica de los linfocitos citotóxicos humanos contra dianas de tumor de mama humano.

También se han descrito varias técnicas para realizar y aislar fragmentos de anticuerpos biespecíficos directamente de cultivos de células recombinantes. Por ejemplo, se han producido anticuerpos biespecíficos utilizando cremalleras de leucina. Kostelny y col., *J. Immunol.*, 148(5):1547-1553 (1992). Los péptidos con

3X

cremallera de leucina de las proteínas Fos y Jun se unieron a las porciones Fab' de dos anticuerpos diferentes mediante fusión génica. Los homodímeros del anticuerpo se redujeron en la región bisagra para formar monómeros y después se reoxidaron para formar los heterodímeros del anticuerpo. Este método también se puede utilizar para producir los homodímeros del anticuerpo. La tecnología "diacuerpo" descrita por Hollinger y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 (1993) ha proporcionado un mecanismo alternativo para realizar fragmentos de anticuerpos biespecíficos. Los fragmentos comprenden un dominio variable de cadena pesada (VH) conectado a un dominio variable de cadena ligera (VL) mediante un enlazador que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios de la misma cadena. Por consiguiente, los dominios VH y VL de un fragmento se fuerzan para emparejarse con los dominios VL y VH complementarios de otro fragmento; por lo tanto, forman dos sitios de unión al antígeno. También se ha informado de otra estrategia para realizar fragmentos de anticuerpos biespecíficos mediante el uso de dímeros Fv de cadena única (sFv). Véase Gruber y col., *J. Immunol.*, 152:5368 (1994).

También se contemplan los anticuerpos con más de dos valencias. Por ejemplo, se pueden preparar anticuerpos triespecíficos (Tutt y col., *J. Immunol.* 147: 60 (1991)).

6. Anticuerpos multivalentes

Un anticuerpo multivalente puede internalizarse (y/o catabolizarse) más rápido que un anticuerpo bivalente por una célula que exprese un antígeno al que se unen los anticuerpos. Los anticuerpos de la presente invención pueden ser anticuerpos multivalentes (que son los que no pertenecen a la clase IgM) con tres o más sitios de unión al antígeno (por ejemplo, anticuerpos tetravalentes), que pueden producirse fácilmente mediante la expresión recombinante del ácido nucleico que codifica las cadenas de polipéptidos del anticuerpo. El anticuerpo multivalente puede comprender un dominio de dimerización y tres o más sitios de unión al antígeno. En ciertas formas de realización, el dominio de dimerización comprende (o está formado por) una región Fc o una región bisagra. En esta situación, el anticuerpo comprenderá una región Fc y tres o más sitios de unión amino-terminal del antígeno a la región Fc. En ciertas formas de realización, un anticuerpo multivalente comprende (o está formado por) aproximadamente entre tres y ocho sitios de unión a antígeno. En una de estas formas de realización, un anticuerpo multivalente comprende (o está formado por) cuatro sitios de unión a

antígeno. El anticuerpo multivalente comprende al menos una cadena de polipéptidos (por ejemplo, dos cadenas de polipéptidos) en la que la(s) cadena(s) de polipéptidos comprende(n) dos o más dominios variables. Por ejemplo, la(s) cadena(s) de polipéptidos puede(n) comprender VD1-(X1)_n-VD2-(X2)_n-Fc, donde VD1 es un primer dominio variable, VD2 es un segundo dominio variable, Fc es una cadena de polipéptidos de una región Fc, X1 y X2 representan una aminoácido o polipéptido y n es 0 ó 1. Por ejemplo, la(s) cadena(s) de polipéptidos puede(n) comprender: VH-CH1-enlazador flexible-VH-CH1- cadena de la región FC o VH-CH1-VH-CH1-cadena de la región Fc. El anticuerpo multivalente de la presente memoria descriptiva puede comprender, además, al menos dos (por ejemplo, cuatro) polipéptidos de dominio variable de cadena ligera. El anticuerpo multivalente de la presente memoria descriptiva puede, por ejemplo, comprender entre dos y ocho polipéptidos de dominio variable de cadena ligera. Los polipéptidos de dominio variable de cadena ligera considerados en esta memoria descriptiva comprenden un dominio variable de cadena ligera y, opcionalmente, un dominio CL.

7. Anticuerpos de dominio único

En ciertas formas de realización, un anticuerpo de la invención es un anticuerpo de dominio único. Un anticuerpo de dominio único es una única cadena polipeptídica que comprende la totalidad o parte del dominio variable de la cadena pesada o la totalidad o parte del dominio variable de la cadena ligera de un anticuerpo. En ciertas formas de realización, un anticuerpo de dominio único es un anticuerpo humano de dominio único (Domantis, Inc., Waltham, MA; véase, por ejemplo, patente de EE. UU. N.º 6.248.516 B1). En una forma de realización, un anticuerpo de dominio único está formado por la totalidad o parte del dominio variable de la cadena pesada de un anticuerpo.

8. Variantes de anticuerpos

En ciertas formas de realización, se contemplan la(s) modificación(es) de la secuencia de aminoácidos descrita(s) en la presente memoria descriptiva. Por ejemplo, puede desearse mejorar la afinidad de unión u otras propiedades biológicas del anticuerpo. Las variantes de la secuencia de aminoácidos del anticuerpo se pueden preparar mediante la introducción de cambios adecuados en la secuencia de nucleótidos que codifica el anticuerpo o mediante la síntesis de péptidos. Dichas modificaciones incluyen, por ejemplo, eliminaciones de o inserciones dentro o sustituciones de residuos dentro de las secuencias del

aminoácido del anticuerpo. Se puede realizar cualquier combinación de eliminación, inserción y sustitución para llegar a la construcción final, siempre que ésta posea las características deseadas. Las alteraciones aminoacídicas pueden introducirse en la secuencia de aminoácidos del anticuerpo del sujeto en el momento en que se realiza la secuencia.

Un método útil para la identificación de determinados residuos o regiones del anticuerpo que constituyen ubicaciones preferidas para la mutagénesis se denomina "mutagénesis de barrido de alanina", tal como se describe en Cunningham y Wells (1989) *Science*, 244:1081-1085. En la presente memoria descriptiva, se identifica un residuo o grupo de residuos de dianas (por ejemplo, residuos cargados como arg, asp, his, lys y glu) y se sustituyen por un aminoácido con carga negativa o neutra (alanina o polialanina) para afectar la interacción de los aminoácidos con el antígeno. Estas localizaciones de los aminoácidos que demuestran sensibilidad funcional a las sustituciones se refinan al introducir más u otras variantes en, o para, los sitios de sustitución. Por lo tanto, a pesar de que el sitio donde se introducirá una variación de una secuencia de aminoácidos está predeterminado, no es necesario que la naturaleza de la mutación per se tenga un carácter predeterminado. Por ejemplo, para analizar el rendimiento de una mutación en un lugar determinado, se realiza el barrido de alanina o mutagénesis aleatoria en el codón o región diana y las inmunoglobulinas expresadas se monitorizan para detectar la actividad deseada.

Las inserciones de la secuencia de aminoácidos incluyen fusiones en los extremos amino o carboxi-terminal que abarcan desde un residuo hasta polipéptidos que contienen cien o más residuos, así como inserciones en la secuencia de uno o múltiples residuos de aminoácidos. Entre los ejemplos de inserciones terminales se encuentra un anticuerpo con un residuo metionil en el N-terminal. Otras variantes de inserción de la molécula del anticuerpo incluyen la fusión del N-terminal o C del anticuerpo con una enzima (por ejemplo, para ADEPT) o un polipéptido que aumente la semivida sérica del anticuerpo.

En ciertas formas de realización, un anticuerpo de la invención se altera para aumentar o reducir la glicosilación del anticuerpo. La glicosilación de los polipéptidos se realiza generalmente por enlace N u O. El enlace N se refiere a la unión de una fracción glucídica a la cadena lateral de un residuo de asparragina. Las secuencias de tripéptidos asparragina-X-serina y asparragina-X-treonina, en donde X equivale a cualquier aminoácido excepto la prolina, son las secuencias

de reconocimiento para las uniones enzimáticas del residuo glucídico a la cadena lateral de asparragina. Por lo tanto, la presencia de cualquiera de estas secuencias de tripéptidos en un polipéptido crea un lugar de glicosilación potencial. La glicosilación por enlace O hace referencia a la unión de uno de los azúcares N-acetilgalactosamina, galactosa o xilosa a un hidroxiaminoácido, más comúnmente serina o treonina, a pesar de que también se puede utilizar 5-hidroxiprolina y 5-hidroxilisina.

La adición o eliminación de sitios de glicosilación al anticuerpo se logra convenientemente al alterar la secuencia del aminoácido para que se cree o elimine una o más de las secuencias de tripéptidos descritas anteriormente (para sitios de glicosilación unidos por enlace N). La alteración también se puede realizar mediante la adición de uno o más residuos de serina o treonina a la secuencia del anticuerpo original (para sitios de glicosilación unidos por enlace tipo O), o la eliminación de estos residuos o su sustitución.

Donde el anticuerpo comprende una región Fc, se puede alterar el carbohidrato unido al mismo. Por ejemplo, los anticuerpos con una estructura de carbohidratos madura que carece de fucosa unida a una región Fc del anticuerpo se describen en la Solicitud de patente de EE.UU. N.º 2003/0157108 (Presta, L.). Véase también patente de EE.UU. N.º 2004/0093621 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd). Los anticuerpos con una N-acetilglucosamina (GlcNAc) bisectriz en el carbohidrato unido a una región Fc del anticuerpo se describen en el documento WO 2003/011878, Jean-Mairet y col. y en la patente de EE.UU. N.º 6.602.684, Umaña y col. Los anticuerpos con al menos un residuo de galactosa en el oligosacárido unido a una región Fc del anticuerpo se describen en el documento WO 1997/30087, Patel y col. Véanse también los documentos WO 1998/58964 (Raju, S.) y WO 1999/22764 (Raju, S.) con respecto a los anticuerpos con carbohidratos alterados unidos a la región Fc de los mismos. Véase también la patente de EE.UU. 2005/0123546 (Umana y col.) sobre moléculas de unión a antígeno con glicosilación modificada.

En ciertas formas de realización, una variante de glicosilación comprende una región Fc, en la que una estructura de carbohidratos anexa a la región Fc carece de fucosa. Estas variantes han mejorado la función de la ADCC. Opcionalmente, la región Fc también comprende una o más sustituciones de aminoácidos en la zona que mejora aún más la ADCC; por ejemplo, sustituciones en las posiciones 298, 333 o 334, o todas ellas, de la región Fc (numeración Eu

de residuos). Entre las publicaciones relacionadas con los anticuerpos “defucosilados” o “con déficit de fucosa” podríamos citar: la patente de EE.UU. N.º 2003/0157108; el documento WO 2000/61739; el documento WO 2001/29246; la patente de EE.UU. N.º 2003/0115614; la patente de EE.UU. N.º 2002/0164328; la patente de EE.UU. N.º 2004/0093621; la patente de EE.UU. N.º 2004/0132140; la patente de EE.UU. N.º 2004/0110704; la patente de EE.UU. N.º 2004/0110282; la patente de EE.UU. N.º 2004/0109865; el documento WO 2003/085119; el documento WO 2003/084570; el documento WO 2005/035586; el documento WO 2005/035778; el documento WO2005/053742; Okazaki y col. *J. Mol. Biol.* 336:1239-1249 (2004); Yamane-Ohnuki y col. *Biotech. Bioeng.* 87: 614 (2004). Entre los ejemplos de líneas celulares que producen anticuerpos defucosilados encontraríamos las células Lec13 de ovario de hámster chino (CHO) con déficit de fucosilación de proteínas (Ripka y col., *Arch. Biochem. Biophys.* 249:533-545 (1986); la Solicitud de patente de EE. UU. N.º US 2003/0157108 A1, Presta, L y el documento WO 2004/056312 A1, Adams y col, especialmente el ejemplo 11) y las líneas celulares bloqueadas, como el gen alfa-1,6-fucosiltransferasa, el FUT8 y células de ovario de hámster chino (CHO) bloqueadas (Yamane-Ohnuki y col., *Biotech. Bioeng.* 87: 614 (2004)).

En una forma de realización, el anticuerpo se modifica para mejorar su semivida sérica. A fin de incrementar la semivida sérica del anticuerpo, se le puede incorporar un epítipo de unión a receptor de rescate (especialmente un fragmento de anticuerpo) tal como se describe en la patente de EE.UU. N.º 5739277, por ejemplo. Tal como se utiliza en la presente memoria descriptiva, el término “epítipo de unión a receptor de rescate” hace referencia a un epítipo de la región Fc de una molécula de IgG (por ejemplo, IgG₁, IgG₂, IgG₃ o IgG₄) que es responsable de incrementar la semivida sérica *in vivo* de la molécula de IgG (patente de EE.UU. N.º 2003/0190311, patente de EE.UU. N.º 6821505; patente de EE.UU. N.º 6165745; patente de EE.UU. N.º 5624821; patente de EE.UU. N.º 5648260; patente de EE.UU. N.º 6165745; patente de EE.UU. N.º 5834597).

Otro tipo de variante es una variante de sustitución aminoacídica. Estas variantes reemplazan al menos un residuo de aminoácidos en la molécula del anticuerpo por un residuo diferente. Los sitios de mayor interés para la mutagénesis por sustitución incluyen las regiones hipervariables, pero también se contemplan las alteraciones FR. Las sustituciones conservadoras se muestran en la Tabla 1 en el título “sustituciones preferentes”. Si dichas sustituciones

ocasionan un cambio deseable en la actividad biológica, entonces los productos se pueden examinar y se pueden introducir cambios más sustanciales, denominados “sustituciones ejemplares” en la Tabla 1, o como se describe con más detalle a continuación con referencia a las clases de aminoácidos.

TABLA 1

Residuo original	Sustituciones preferentes	Sustituciones preferentes
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp, Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; Norleucina	Leu
Leu (L)	Norleucina; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tir	Tir
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Tr	Tr
Tr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tir; Phe	Tir
Tir (Y)	Trp; Phe; Tr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; Norleucina	Leu

Las modificaciones sustanciales en las propiedades biológicas del anticuerpo se logran seleccionando sustituciones que difieran significativamente en su efecto de mantener (a) la estructura de la base del polipéptido en el área de

14

la sustitución, por ejemplo, como una conformación plana o helicoidal, (b) la carga o hidrofobicidad de la molécula en el lugar diana, o (c) el residuo de la cadena lateral. Los aminoácidos pueden agruparse de acuerdo con similitudes en las propiedades de sus cadenas laterales (en A. L. Lehninger, en *Biochemistry*, segunda ed., págs. 73-75, Worth Publishers, Nueva York (1975)):

(1) no polares: Ala (A), Val (V), Leu (L), Ile (I), Pro (P), Phe (F), Trp (W), Met (M)

(2) polares no cargados: Gly (G), Ser (S), Thr (T), Cys (C), Tyr (Y), Asn (N), Gln (Q)

(3) ácidos: Asp (D), Glu (E)

(4) básicos: Lys (K), Arg (R), His (H)

Alternativamente, los residuos que se obtienen naturalmente pueden dividirse en grupos en base a las propiedades comunes de las cadenas laterales:

(1) hidrófobos: Norleucina, Met, Ala, Val, Leu, Ile;

(2) hidrófilos neutrales: Cys, Ser, Tr, Asn, Gln;

(3) ácidos: Asp, Glu;

(4) básicos: His, Lys, Arg;

(5) residuos que tiene influencia en la orientación de la cadena: Gly, Pro;

(6) aromáticos: Trp, Tyr, Phe.

Las sustituciones no conservadoras supondrán intercambiar un miembro de una de estas clases por otra clase. Estos residuos sustituidos también se pueden introducir en sitios de sustitución conservadora o en los sitios restantes (no conservados).

Un tipo de variante de sustitución implica sustituir uno o más residuos de región hipervariable de un anticuerpo parental (por ejemplo, un anticuerpo humanizado o humano). Por lo general, la(s) variante(s) resultante(s) seleccionada(s) para profundizar en su desarrollo tendrá(n) propiedades biológicas modificadas (es decir, mejoradas) con relación al anticuerpo parental desde el cual se generó (generaron). Una manera conveniente de generar dichas variantes de sustitución implica la maduración de afinidad utilizando una presentación en fagos. De manera resumida, varios sitios de regiones hipervariables (por ejemplo, 6-7 sitios) se mutan para generar todas las sustituciones posibles de aminoácidos en cada sitio. Los anticuerpos así generados se representan a partir de partículas de fagos filamentosos como

fusiones a, al menos, parte de una proteína de revestimiento de fagos (por ejemplo, con el producto del gen III de M13 que hay dentro de cada partícula. Las variantes presentadas en fagos se monitorizan para detectar su actividad biológica (por ejemplo, afinidad de unión). Para identificar los lugares de la región hipervariable candidatos para la modificación, se puede realizar mutagenia mediante barridos (por ejemplo, barridos de alanina para identificar residuos de la región hipervariable que contribuyan significativamente a la unión a antígeno. Como alternativa, o adicionalmente, puede ser beneficioso analizar una estructura cristalina del complejo antígeno-anticuerpo para identificar los puntos de contacto entre el anticuerpo y el antígeno. Dichos residuos de contacto y los residuos adyacentes son candidatos a la sustitución de acuerdo con las técnicas conocidas en la materia, incluidas las explicadas en la presente memoria descriptiva. Una vez generadas dichas variantes, el panel de variantes está sujeto a examen utilizando técnicas conocidas en la materia, incluidas las descritas en la presente memoria descriptiva, y los anticuerpos con propiedades superiores en uno o más ensayos pertinentes se pueden seleccionar para profundizar en su desarrollo.

Las moléculas de ácido nucleico que codifican variantes de secuencia de aminoácidos del anticuerpo se preparan mediante varios métodos conocidos en la materia. Estos métodos incluyen, entre otros, aislamiento desde una fuente natural (en el caso de variantes de secuencia de aminoácidos presentes en la naturaleza) o preparación mediante mutagénesis con mediación oligonucleótida (o controlada *in situ*), mutagénesis PCR y mutagénesis de módulo de una variante preparada anteriormente o una versión no variante del anticuerpo.

Puede ser deseable introducir una o más modificaciones en los aminoácidos en la región Fc de anticuerpos de la invención, lo que genera una variante de la región Fc. La variante de la región Fc puede comprender una secuencia de la región Fc humana (por ejemplo, una región Fc de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 humanas) que contenga una modificación de aminoácidos (por ejemplo, una sustitución) en una o más posiciones de aminoácidos, incluida la de la cisteína bisagra.

Según esta descripción y los conocimientos en la materia, se contempla que en algunas realizaciones un anticuerpo de la invención pueda comprender una o más alteraciones, frente a su anticuerpo homólogo de tipo natural, por ejemplo, en la región Fc. No obstante, estos anticuerpos conservarán las mismas características necesarias para uso terapéutico, frente a su homólogo de tipo

natural. Por ejemplo, se cree que se pueden realizar algunas alteraciones en la región Fc que daría como resultado una unión C1q alterada (ya sea mejorada o disminuida) o citotoxicidad dependiente de complementos (CDC), por ejemplo, como se describe en el documento WO99/51642. Véase también Duncan & Winter *Nature* 322:738-40 (1988); la patente de EE. UU. N.º 5.648.260; la patente de EE. UU. N.º 5.624.821 y el documento WO94/29351 que se refieren a otros ejemplos de variantes de regiones Fc. Los documentos WO00/42072 (Presta) y WO 2004/056312 (Lowman) describen variantes de anticuerpos con capacidad de unión a los FcRs mejoradas o disminuidas. El contenido de estas publicaciones de patentes se incorpora específicamente a la presente memoria descriptiva a modo de referencia. Véase, además, Shields y col., *J. Biol. Chem.*, 9(2): 6591-6604 (2001). Los anticuerpos con un aumento de su semivida y una unión mejorada al receptor neonatal Fc (FcRn), que es responsable de la transmisión de las IgG maternas al feto (Guyer y col., *J. Immunol.* 117:587 (1976) y Kim y col., *J. Immunol.* 24:249 (1994)), se describen en la patente de EE.UU. N.º 2005/0014934A1 (Hinton y col.). Estos anticuerpos comprenden una región Fc con una o más sustituciones en la zona que mejoran la unión de la región Fc al FcRn. Las variantes polipeptídicas con secuencias aminoácidas de la región Fc alteradas y capacidad aumentada o disminuida de unión a Cq1 se describen en la patente de EE.UU. N.º 6.194.551B1 y el documento WO99/51642. El contenido de dichas publicaciones de patentes se incorpora específicamente a la presente memoria descriptiva a modo de referencia. Véase, además, Idusogie y col. *J. Immunol.* 164: 4178-4184 (2000).

En un aspecto, la invención proporciona anticuerpos que comprenden modificaciones en la interfaz de polipéptidos Fc que comprenden la región Fc, donde las modificaciones facilitan y/o fomentan la heterodimerización. Estas modificaciones comprenden la introducción de una protuberancia en un primer polipéptido Fc y una cavidad en un segundo polipéptido Fc, donde la protuberancia se puede posicionar en la cavidad para que fomente la formación de complejos del primer y segundo polipéptido Fc. Los métodos de generación de anticuerpos con estas modificaciones se conocen en la materia, por ejemplo, los descritos en la patente de EE.UU. N.º 5.731.168.

9. Derivados del anticuerpo

Los anticuerpos de la presente invención pueden modificarse aún más a fin de que contengan fracciones no proteicas adicionales que son conocidas en la

materia y se encuentran disponibles. Preferiblemente, las fracciones adecuadas para la derivatización del anticuerpo son polímeros solubles en agua. Ejemplos no limitantes de los polímeros solubles en agua incluyen los siguientes componentes: polietilenglicol (PEG), copolímero de etilenglicol/propilenglicol, carboximetilcelulosa, dextrano, alcohol polivinilo, polivinilpirrolidona, poli-1, 3-dioxolano, poli-1,3,6-trioxano, copolímero anhídrido etileno/maleico, poliaminoácidos (ya sean homopolímeros o copolímeros aleatorios), y dextrano o poli(n-vinilpirrolidona)polietilenglicol, homopolímeros de propilenglicol, óxido de prolipropileno / copolímeros de óxido de etileno, polialcoholes polioxietilados (por ejemplo glicerol), alcohol polivinilo, y mezclas de los mismos. Es posible que el polietilenglicol propionaldehído ofrezca ventajas en la elaboración, dada su estabilidad en agua. El polímero puede ser de cualquier peso molecular y puede ser ramificado o no. La cantidad de polímeros adheridos al anticuerpo puede variar y, si se une más de un polímero, los polímeros pueden ser las mismas o diferentes moléculas. Generalmente, la cantidad y/o tipo de polímeros utilizados para la derivatización pueden determinarse en función de ciertas consideraciones, como las propiedades o funciones particulares del anticuerpo a mejorar, si el anticuerpo derivatizado será utilizado en un tratamiento en condiciones definidas, etc.

En otra forma de realización, se proporcionan los conjugados del anticuerpo y la fracción no proteica que puede calentarse selectivamente mediante la exposición a radiación. En una forma de realización, la fracción no proteica es un nanotubo de carbono (Kam y col., *Proc. Natl. Acad. Sci.* 102: 11600-11605 (2005)). La radiación puede ser de cualquier longitud de onda, e incluye una longitud de onda que no dañe las células comunes, pero que caliente las fracciones no proteicas hasta una temperatura en la cual se eliminen las células próximas a las fracciones no proteicas del anticuerpo.

Algunos métodos de elaboración de anticuerpos

1. Algunos métodos de hibridoma

Pueden conseguirse los anticuerpos monoclonales anti-CD22 de la invención por el método del hibridoma, descrito por primera vez en Kohler y col., *Nature*, 256:495 (1975) o con el método del ADN recombinante (patente de EE. UU. N.º 4.816.567).

En el método del hibridoma, un ratón u otro animal huésped apropiado, como un hámster, se inmuniza para obtener linfocitos que produzcan o sean

capaces de producir anticuerpos que se unirán específicamente a la proteína utilizada para la inmunización. Los anticuerpos anti-CD22 se producen generalmente en animales mediante inyecciones subcutáneas (sc) o intraperitoneales (ip) de CD22 y un adyuvante. El CD22 se puede preparar usando métodos bien conocidos en la materia, algunos de los cuales se describen con más detalle en la presente memoria descriptiva. Por ejemplo, el CD22 se puede producir de forma recombinante. En una forma de realización, se inmuniza a los animales con un derivado de CD22 que contiene una porción extracelular de CD22 fusionado a la porción Fc de una cadena pesada de inmunoglobulina. En una forma de realización, se inmuniza a los animales con una proteína de fusión CD22-IgG1. En una forma de realización, se inmuniza a animales con derivados inmunogénicos de CD22 en una solución con monofosforil lípido A (MPL)/dicrinomicolato de trehalosa (TDM) (Ribi Immunochem. Research, Inc., Hamilton, MT) y la solución se inyecta intradérmicamente en múltiples puntos. Dos semanas más tarde los animales reciben dosis de refuerzo. Entre siete y catorce días más tarde, se les extrae sangre a los animales y el suero se analiza para titular los anticuerpos anti-CD22. Los animales reciben dosis de refuerzo hasta obtener los niveles adecuados de titulación.

De manera alternativa, los linfocitos se pueden inmunizar *in vitro*. Después, los linfocitos se fusionan con las células de mieloma utilizando un agente fusionante adecuado, como por ejemplo polietilenglicol, para formar una célula de hibridoma (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, págs. 59-103 (Academic Press, 1986)).

Por lo tanto, las células de hibridoma preparadas se siembran y cultivan en un medio de cultivo adecuado, por ejemplo, un medio que contenga una o más sustancias que inhiban el crecimiento o la supervivencia de las células de mieloma parental no fusionadas. Por ejemplo, si las células de mieloma parentales no poseen la enzima hipoxantina-guanina-fosforribosil-transferasa (HGPRT o HPRT), el medio de cultivo para los hibridomas generalmente incluirá hipoxantina, aminopterina y timidina (medio HAT), cuyas sustancias evitan el crecimiento de células con déficit de HGPRT.

En ciertas formas de realización, las células de mieloma son aquellas que se fusionan eficazmente, soportan altos niveles estables de producción de anticuerpos por las células productoras de anticuerpos seleccionadas y son sensibles a un medio como el medio HAT. Entre las células de mieloma

ejemplares se encuentran, entre otras, las líneas de mieloma murino, como aquellas derivadas de los tumores de ratones MOPC-21 y MPC-11, disponibles en Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California, EE.UU., y las células SP-2 o X63-Ag8-653, disponibles en el American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, EE.UU. Las líneas celulares de mieloma humano y heteromieloma de ratón-humano también se han descrito para la producción de anticuerpos monoclonales humanos (Kozbor, *J. Immunol.*, 133:3001 (1984); Brodeur y col., *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, págs. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987)).

El medio de cultivo en el cual las células de hibridoma crecen se analiza para la producción de anticuerpos monoclonales que se unan a CD22. Preferentemente, la especificidad de unión de los anticuerpos monoclonales producidos por las células de hibridoma está determinada por la inmunoprecipitación o por un ensayo de unión, como el radioinmunoensayo (RIA) o ensayo de inmunoabsorción enzimática (ELISA). La afinidad de unión del anticuerpo monoclonal puede determinarse, por ejemplo, mediante el análisis Scatchard de Munson y col, *Anal. Biochem.*, 107:220 (1980).

Después de identificar que las células de hibridoma producen anticuerpos con la especificidad, afinidad o actividad deseada, o todos ellos, los clones se pueden subclonar limitando los procedimientos de dilución y pueden crecer mediante métodos estándar (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, págs. 59-103 (Academic Press, 1986)). Los medios de cultivo adecuados para este fin incluyen, por ejemplo, medio D-MEM o RPMI-1640. Además, las células de hibridoma pueden crecer *in vivo* en un animal como tumores con ascitis. Los anticuerpos monoclonales secretados por los subclones se separan adecuadamente del medio de cultivo, los fluidos ascíticos o el suero mediante procedimientos convencionales de purificación de inmunoglobulinas, como por ejemplo, la proteína-A-sefrosa, la cromatografía de hidroxilapatita, la electroforesis en gel, la diálisis o la cromatografía de afinidad.

2. Algunos métodos de detección de librerías

Los anticuerpos anti-CD22 de la invención se pueden obtener utilizando bibliotecas combinatorias para detectar anticuerpos con la actividad o actividades deseadas. Por ejemplo, se conocen en la materia diversos métodos para generar bibliotecas de representación en imágenes de fagos y detectar dichas bibliotecas para anticuerpos que posean las características de unión deseadas. Estos

métodos se describen de forma general en Hoogenboom y col. (2001) en *Methods in Molecular Biology* 178:1-37 (O'Brien y col., ed., Human Press, Totowa, NJ), y en ciertas formas de realización, en Lee y col. (2004) *J. Mol. Biol.* 340:1073-1093.

En principio, los clones de anticuerpos sintéticos se seleccionan mediante la detección de bibliotecas de fagos que contienen fagos que representan diversos fragmentos de la región variable (Fv) de anticuerpos fusionados a proteína de revestimiento de fagos. Estas bibliotecas de fagos se criban mediante cromatografía de afinidad para detectar el antígeno deseado. Los clones que expresan fragmentos Fv capaces de unirse al antígeno deseado son adsorbidos al antígeno y, de este modo, separados de los clones de la biblioteca que no tienen capacidad de unión. Los clones con capacidad de unión se eluyen entonces del antígeno y pueden enriquecerse aún más mediante ciclos adicionales de adsorción/elución de antígenos. Cualquiera de los anticuerpos anti-CD22 de la invención se puede obtener diseñando un procedimiento apropiado de detección de antígenos para seleccionar el clon del fago de interés, seguido por la construcción de un clon del anticuerpo anti-CD22 de longitud completa utilizando las secuencias de Fv del clon del fago de interés y secuencias de la región constante (Fc) adecuadas, descritas en Kabat y col., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Fifth Edition, NIH Publication 91-3242, Bethesda MD (1991), vols. 1-3.

En determinadas formas de realización, el dominio de unión a antígeno de un anticuerpo está formado a partir de dos regiones variables (V) de unos 110 aminoácidos, una correspondiente a la cadena ligera (VL) y otra correspondiente a la cadena pesada (VH), que presentan en ambos casos tres bucles hipervariables (HVR) o regiones de determinación de complementariedad (CDR). Los dominios variables se pueden representar funcionalmente en el fago, ya sea como fragmentos de Fv de cadena única (scFv), en los que VH y VL están covalentemente enlazados por medio de un péptido corto y flexible, o como fragmentos Fab, en los que están fusionados a un dominio constante e interactúan no covalentemente, como se describe en Winter y col, *Ann. Rev. Immunol.*, 12: 433-455 (1994). Como se usa en la presente memoria descriptiva, los clones de fagos que codifican scFv y los clones de fagos que codifican Fab se denominan colectivamente "clones de fagos Fv" o "clones Fv".

Los repertorios de genes de VH y VL se pueden clonar por separado mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y recombinar

aleatoriamente en bibliotecas de fagos, en las que se puede buscar por clones de unión a antígeno, como se describe en Winter y col, *Ann. Rev. Immunol.*, 12: 433-455 (1994). Las bibliotecas procedentes de fuentes inmunizadas proporcionan anticuerpos de alta afinidad al inmunógeno sin la necesidad de construir hibridomas. Alternativamente, el repertorio virgen se puede clonar para proporcionar una única fuente de anticuerpos humanos a una gran variedad de antígenos extraños y también de autoantígenos sin ninguna inmunización como se describe en Griffiths y col, *EMBO J*, 12: 725-734 (1993). Por último, las bibliotecas nativas también se pueden producir sintéticamente mediante la clonación de segmentos de genes V no reorganizados procedentes de células madre y utilizando cebadores de la PCR que contenga secuencias aleatorias para codificar las regiones CDR3 altamente variables y para conseguir la reorganización *in vitro* como se describe en Hoogenboom y Winter, *J. Mol. Biol.*, 227: 381-388 (1992).

En determinadas formas de realización, el fago filamentoso se utiliza para representar fragmentos de anticuerpos mediante fusión a la proteína de revestimiento menor pIII. Los fragmentos de anticuerpos se pueden representar como fragmentos Fv de cadena única, en los que los dominios de VH y VL están conectados a la misma cadena polipeptídica mediante un separador de polipéptidos flexible, como se describe en Marks y col, *J. Mol. Biol.*, 222: 581-597 (1991), o como fragmentos Fab, en los que una cadena se fusiona a pIII y la otra se segrega en el periplasma del huésped celular bacteriano donde el ensamblaje de una estructura proteínica de revestimiento de Fab se representa en la superficie del fago mediante el desplazamiento de las proteínas de revestimiento de tipo natural, por ejemplo, como se describe en Hoogenboom y col., *Nucl. Acids Res.*, 19: 4133-4137 (1991).

En general, los ácidos nucleicos que codifican fragmentos de genes de anticuerpos se obtienen a partir de inmunocitos recolectados de humanos o animales. Si se desea una biblioteca que presente un sesgo a favor de clones anti-CD22, el sujeto se inmuniza con CD22 para generar una respuesta a anticuerpos y las células esplénicas o los linfocitos B circulantes u otros linfocitos de la circulación periférica se recuperan para la construcción de la biblioteca. En una forma de realización preferente, una biblioteca de fragmentos de genes de anticuerpos humanos sesgada a favor de clones de anti-CD22 humano se obtiene al generar una respuesta a un anticuerpo anti-CD22 en ratones transgénicos

151

portadores de una matriz de genes humanos funcionales de la inmunoglobulina (y carentes de un sistema funcional de producción de anticuerpos endógenos), de forma que la inmunización con CD22 da lugar a células B productoras de anticuerpos humanos anti-CD22. La generación de ratones transgénicos productores de anticuerpos humanos se describe más adelante.

El enriquecimiento adicional de poblaciones celulares reactivas a anti-CD22 se puede obtener mediante un procedimiento de detección adecuado para aislar linfocitos B que expresen un anticuerpo unido a membrana específico de CD22, por ejemplo, mediante separación celular con cromatografía de afinidad a CD22 o adsorción de células a CD22 marcada con flurocromo seguida de separación de células activadas por fluorescencia (FACS).

Alternativamente, el uso de células esplénicas y/o linfocitos B u otros PBL procedentes de un donante no inmunizado ofrece una mejor representación del posible repertorio de anticuerpos y también permite la construcción de una biblioteca de anticuerpos usando cualquier especie animal (humana o no humana) en la que CD22 no es antigénico. En el caso de bibliotecas que incorporen construcción de genes de anticuerpos *in vitro*, las células madre se recolectan del sujeto para proporcionar ácidos nucleicos que codifiquen segmentos de genes de anticuerpos no organizados. Los inmunocitos de interés se pueden obtener de diversas especies animales, como humanos, ratón, rata, lagomorfa, luprina, canina, felina, porcina, bovina, equina y especies aviares, etc.

Los segmentos de regiones variables de genes anticuerpos que codifican ácidos nucleicos (incluidos los segmentos VH y VL) se recuperan a partir de las células de interés y se amplifican. En el caso de bibliotecas de genes de VH y VL reorganizadas, el ADN deseado se puede obtener aislando el ADN o el ARNm genómico de los linfocitos, seguido de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con cebadores que se acoplen a los extremos 5' y 3' de los genes de la VH y la VL reorganizados, como se describe en Orlandi y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 86: 3833-3837 (1989), lo que permite obtener diversos repertorios de genes V para su expresión. Los genes V se pueden amplificar a partir del ADNc y del ADN genómico con cebadores reversos en el extremo 5' del exon que codifica el dominio V maduro y cebadores anversos dentro del segmento J como se describe en Orlandi y col. (1989) y en Ward y col., *Nature*, 341: 544-546 (1989). Sin embargo, para amplificar desde el ADNc, los cebadores reversos también se pueden situar en el exón líder, como se describe en Jones y col., *Biotechnol.*, 9:

88-89 (1991), y los cebadores anversos dentro de la región constante, como se describe en Sastry y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 86: 5728-5732 (1989). Para maximizar la complementariedad, se puede incorporar la degeneración en los cebadores como se describe en Orlandi y col. (1989) o Sastry y col. (1989). En ciertas formas de realización, la diversidad de bibliotecas se maximiza utilizando cebadores de la PCR dirigidos a cada familia de genes V para amplificar todas las organizaciones disponibles de VH y VL presentes en la muestra de ácidos nucleicos de inmunocitos, por ejemplo, como se describe en el método de Marks y col., *J. Mol. Biol.*, 222: 581-597 (1991) o como se describe en el método de Orum y col., *Nucleic Acids Res.*, 21: 4491-4498 (1993). Para la clonación del ADN amplificado en vectores de expresión, se pueden introducir sitios de restricción poco habituales dentro del cebador de la PCR como una marca en un extremo, según se describe en Orlandi y col. (1989), o mediante una nueva amplificación de la PCR con un cebador marcado, como se describe en Clackson y col., *Nature*, 352: 624-628 (1991).

De segmentos de genes V *in vitro* se pueden derivar repertorios de genes V sintéticamente reorganizados. La mayoría de los segmentos de genes VH humanos se han clonado y secuenciado (según Tomlinson y col. *J. Mol. Biol.*, 227: 776-798 (1992)), y mapeados (según Matsuda y col., *Nature Genet.*, 3: 88-94 (1993); estos segmentos clonados (incluidas todas las principales conformaciones del bucle H1 y H2) se pueden utilizar para generar diversos repertorios de genes VH con cebadores de la PCR que codifican bucles de H3 de secuencia y longitud diversas, como se describe en Hoogenboom y Winter, *J. Mol. Biol.*, 227: 381-388 (1992). Los repertorios de VH también se pueden hacer con toda la diversidad de secuencias centrada en un bucle de H3 largo de una única longitud, como se describe en Barbas y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 4457-4461 (1992). Los segmentos Vk y Vλ humanos se han clonado y secuenciado (según se explica en Williams y Winter, *Eur. J. Immunol.*, 23: 1456-1461 (1993)) y se pueden utilizar para hacer repertorios sintéticos de la cadena ligera. Los repertorios de genes V sintéticos, basados en una gran variedad de dominios de VH y VL, y longitudes de L3 y H3, codificarán anticuerpos de considerable diversidad estructural. Tras la amplificación de los ADN codificadores de genes V, los segmentos de genes V de línea germinal se pueden reorganizar *in vitro* según los procedimientos de Hoogenboom y Winter, *J. Mol. Biol.*, 227: 381-388 (1992).

151

Se pueden construir repertorios de fragmentos de anticuerpos mediante combinación de repertorios de genes de VH y VL juntos de varias formas. Cada repertorio se puede crear en vectores diferentes y los vectores se pueden recombinar *in vitro*, por ejemplo, como se describe en Hogrefe y col., *Gene*, 128: 119-126 (1993), o *in vivo* mediante infección combinatoria, por ejemplo, el sistema loxP descrito en Waterhouse y col., *Nucl. Acids Res.*, 21: 2265-2266 (1993). El procedimiento de la recombinación *in vivo* se aprovecha de las dos cadenas de los fragmentos Fab para superar el límite en el tamaño de la biblioteca impuesto por la eficacia de transformación de *E. coli*. Los repertorios de VH y VL vírgenes se clonan por separado, uno en un fagémido y el otro en un vector fágico. Las dos bibliotecas se combinan a continuación mediante infección fágica de bacterias que contienen fagémidos, de forma que cada célula contiene una combinación distinta y el tamaño de la biblioteca sólo está limitado por el número de células presente (unos 10^{12} clones). Los dos vectores contienen seales de recombinación *in vivo*, por lo que los genes VH y VL se recombinan en un único replicón y se introducen en viriones fágicos. Estas enormes bibliotecas proporcionan gran número de diversos anticuerpos con buena afinidad (K_d^{-1} de aproximadamente 10^8 M).

Alternativamente, los repertorios se pueden clonar secuencialmente en el mismo vector, por ejemplo, como se describe en Barbas y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88: 7978-7982 (1991), o ensamblar juntos mediante PCR y, posteriormente, clonarse, como se describe en Clackson y col., *Nature*, 352: 624-628 (1991). El ensamblaje de la PCR también se puede utilizar para unir los ADN de la VH y la VL con ADN que codifica un espaciador peptídico flexible para formar repertorios de Fv de cadena única (scFv). En otra técnica, "el ensamblaje de la PCR en el interior de la célula" se usa para combinar genes VH y VL dentro de linfocitos mediante PCR y, posteriormente, clonar repertorios de genes enlazados, como se describe en Embleton y col., *Nucl. Acids Res.*, 20: 3831-3837 (1992).

Los anticuerpos producidos por bibliotecas nativas (ya sea naturales o sintéticas) pueden ser de afinidad moderada (K_d^{-1} de aproximadamente 10^6 a 10^7 M⁻¹), pero la maduración de la afinidad también se puede imitar *in vitro* mediante construcción y reelección a partir de bibliotecas secundarias, como se describe en Winter y col. (1994), mencionado anteriormente. Por ejemplo, la mutación se puede introducir aleatoriamente *in vitro* utilizando polimerasa con tendencia al

error (explicado en Leung y col., *Technique*, 1: 11-15 (1989)) en el método de Hawkins y col., *J. Mol. Biol.*, 226: 889-896 (1992) o en el método de Gram y col., *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 89: 3576-3580 (1992). Asimismo, la maduración de la afinidad se puede realizar mediante mutación aleatorizada de una o más CDR, por ejemplo, utilizando PCR con cebadores de secuencia aleatoria que abarquen la CDR de interés, en clones de Fv individuales seleccionados y detecten clones de afinidad más alta. El documento WO 9607754 (publicado el 14 de marzo de 1996) describía un procedimiento para inducir la mutagenia en una región de determinación de complementariedad de una cadena ligera de inmunoglobulinas para crear una librería de genes de la cadena ligera. Otro método eficaz consiste en recombinar los dominios de VH o VL seleccionados por representación de fagos con repertorios de variantes de dominio V que se producen naturalmente obtenidos a partir de donantes no inmunizados y detectar los de mayor afinidad en varias series de nueva transposición de cadenas, como se describe en Marks y col., *Biotechnol.*, 10: 779-783 (1992). Esta técnica permite la producción de anticuerpos y de fragmentos de anticuerpos con afinidades del orden de 10^{-9} M o menos.

La detección de las bibliotecas se puede lograr mediante diversas técnicas conocidas en la materia. Por ejemplo, se puede utilizar CD22 para revestir los pocillos de placas de adsorción, expresado en huéspedes celulares en placas de adsorción o utilizada en separación celular, o conjugada con biotina para captura con partículas revestidas de estreptavidina, o utilizadas en cualquier otro procedimiento conocido en la materia para detectar bibliotecas de representación de imágenes de fagos.

Las muestras de bibliotecas de fagos están en contacto con el CD22 inmovilizado en condiciones aptas para la unión de al menos una porción de partículas de fago con el adsorbente. Normalmente, las condiciones, incluido el pH, la concentración iónica, la temperatura y similares, se seleccionan de forma que imiten condiciones fisiológicas. Los fagos unidos a la fase sólida se lavan y, posteriormente, se eluyen mediante ácido, por ejemplo, como se describe en Barbas y col., *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 88: 7978-7982 (1991), o mediante álcali, por ejemplo, como se describe en Marks y col., *J. Mol. Biol.*, 222: 581-597 (1991), o mediante competición antigénica con CD22, por ejemplo, en un procedimiento similar al procedimiento de competición antigénica de Clackson y col., *Nature*, 352: 624-628 (1991). Los fagos se pueden enriquecer de 20 a 1.000 veces en

una única serie de selección. Además, los fagos enriquecidos se pueden cultivar en cultivos bacterianos y estar sometidos a nuevas series de selección.

La eficacia de la selección depende de muchos factores, incluida la cinética de la disociación durante el lavado y si múltiples fragmentos de anticuerpos de un único fago se pueden unir simultáneamente a antígeno. Los anticuerpos con rápida cinética de disociación (y afinidades de unión débiles) se pueden conservar mediante el uso de lavados cortos, representación de imágenes de fagos multivalente y densidad de revestimiento alta del antígeno en fase sólida. La densidad elevada no sólo estabiliza al fago durante las interacciones multivalentes, sino que, además, favorece la unión del fago disociado otra vez. La selección de anticuerpos con lenta cinética de disociación (y buenas afinidades de unión) se puede promover mediante el uso de largos lavados y representación de imágenes de fagos monovalentes, como se describe en Bass y col., *Proteins*, 8: 309-314 (1990) y en el documento WO 92/09690, y una baja densidad de revestimiento del antígeno como se describe en Marks y col., *Biotechnol.*, 10: 779-783 (1992).

Es posible seleccionar entre anticuerpos de fagos de distintas afinidades, incluso con afinidades que difirieran ligeramente, para CD22. Sin embargo, la mutación aleatoria de un anticuerpo seleccionado (por ejemplo, como la realizada en algunas de las técnicas de maduración de la afinidad) es probable que ocasione muchos mutantes, la mayoría de unión a antígeno, y unos cuantos con afinidad más alta. Con un CD22 limitado, es raro que se pudieran completar fagos de alta afinidad. Para conservar todos los mutantes de afinidad más alta, los fagos se pueden incubar con una cantidad mayor de CD22 biotinilado, pero con el CD22 biotinilado a una concentración de molaridad menor de la constante de afinidad molar diana para CD22. Los fagos con afinidad de unión más alta pueden, entonces, ser capturados por partículas paramagnéticas revestidas de estreptavidina. Esta "captura en equilibrio" permite seleccionar los anticuerpos según sus afinidades de unión, son una sensibilidad que permite aislar clones mutantes con una afinidad tan solo dos veces más elevada de la enorme cantidad de fagos con afinidad menor. Las condiciones usadas en el lavado de fagos unidos a una fase sólida también se pueden manipular para distinguirlos en función de la cinética de disociación.

Los clones anti-CD22 se pueden seleccionar en función de la actividad. En ciertas formas de realización, la invención proporciona anticuerpos anti-CD22 que

se unen a células vivas que expresan naturalmente el CD22. En una forma de realización, la invención proporciona anticuerpos anti-CD22 que bloquean la unión entre un ligando de CD22 y CD22, pero no bloquean la unión entre un ligando de CD22 y una segunda proteína. Los clones de Fv que corresponden a estos anticuerpos anti-CD22 se pueden seleccionar (1) aislando clones anti-CD22 de una biblioteca de fagos como se ha descrito antes y, opcionalmente, amplificando la población aislada de clones de fagos mediante el cultivo de la población en un huésped bacteriano apropiado; (2) seleccionando CD22 y una segunda proteína contra la que se desea una actividad bloqueante y no bloqueante, respectivamente; (3) adsorbiendo los clones de fagos anti-CD22 a CD22 inmovilizado; (4) usando una mayor cantidad de la segunda proteína para eluir los clones no deseados que reconocen los determinantes de unión a CD22 que se solapan o se comparten con los determinantes de unión de la segunda proteína y (5) elución de los clones que todavía no se han adsorbido tras el paso (4). Opcionalmente, los clones con las propiedades bloqueantes/ no bloqueantes deseadas se pueden enriquecer también mediante repetición de los procedimientos de selección descritos en la presente memoria descriptiva una o más veces.

El ADN que codifica los anticuerpos monoclonales derivados de hibridoma o los clones de Fv de la invención es rápidamente aislado y secuenciado utilizando procedimientos convencionales (por ejemplo, utilizando cebadores oligonucleóticos diseñados para amplificar específicamente las regiones que codifican las cadenas ligera y pesada de interés de plantillas de ADN de fagos o hibridoma). Una vez aislado, el ADN se puede colocar en vectores de expresión, que después se transfectan en células anfitrión, como por ejemplo las células *E. coli*, las células COS de monos, las células de ovario de hámster chino (CHO) o las células de mieloma que, de otro modo, no producen la proteína de la inmunoglobulina, para obtener la síntesis de los anticuerpos monoclonales deseados en las células anfitrión recombinantes. Los artículos de revisión sobre expresión recombinante en bacterias del ADN que codifican el anticuerpo incluyen Skerra y col., *Curr. Opinion in Immunol.*, 5: 256 (1993) y Pluckthun, *Immunol. Revs.*, 130: 151 (1992).

El ADN que codifica los clones de Fv de la invención se pueden combinar con secuencias de ADN conocidas que codifican las regiones constantes de la cadena ligera y/o la cadena pesada (por ejemplo, las secuencias de ADN

25

apropiadas se pueden obtener según Kabat y col., mencionado anteriormente) para formar clones que codifiquen cadenas ligeras y/o pesadas de longitud total o parcial. Se tendrá en cuenta que las regiones constantes de cualquier isótopo se pueden utilizar para este fin, incluidas las regiones constantes IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, y que dichas regiones constantes se pueden obtener de cualquier especie animal o humana. Un clon de Fv se deriva del ADN del dominio variable de una especie animal (por ejemplo, un humano) y, luego, se fusiona al ADN de la región constante de otra especie animal para formar una o más secuencias de codificación, puesto que una cadena ligera y/o pesada de longitud completa e "híbrida" está incluida en la definición de anticuerpo "híbrido" y "quimérico" como se usa en la presente memoria descriptiva. En determinadas formas de realización, un clon de Fv derivado de ADN variable humano se fusiona con ADN de región constante humano para formar una o más secuencias de codificación para todas las cadenas ligeras y/o pesadas de longitud parcial o completa y humanas.

El ADN que codifica un anticuerpo anti-CD22 derivado de un hibridoma de la invención también se puede modificar, por ejemplo, mediante sustitución de las secuencias murinas homólogas derivadas del clon de hibridoma por la secuencia de codificación para los dominios constantes de la cadena ligera y pesada humanas (por ejemplo, como en el método de Morrison y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81: 6851-6855 (1984)). El ADN que codifica un anticuerpo o fragmento derivado del clon de Fv o un hibridoma se puede modificar a su vez mediante el enlace covalente a la secuencia de codificación de la inmunoglobulina de la totalidad o parte de la secuencia de codificación de un polipéptido que no sea inmunoglobulina. De este modo, se preparan anticuerpos "quiméricos" o "híbridos" que tiene la especificidad de unión de los anticuerpos de la invención derivados del clon de hibridoma o del clon de Fv.

3. Vectores, células huésped y métodos recombinantes

Para la producción recombinante de un anticuerpo de la invención, el ácido nucleico que lo codifica se aísla e inserta en un vector replicable para la clonación subsiguiente (amplificación del ADN) o para expresión. El ADN que codifica el anticuerpo se aísla fácilmente y se secuencia utilizando procedimientos convencionales (por ejemplo, usando sondas oligonucleótidas capaces de unirse específicamente a los genes que codifican las cadenas pesadas y ligeras del anticuerpo). Hay muchos vectores disponibles. La elección del vector depende en

parte del huésped celular que se utilice. Por lo general, las células huésped son de origen procariótico o eucariótico (por lo general, de mamíferos). Se tendrá en cuenta que las regiones constantes de cualquier isótopo se pueden utilizar para este fin, incluidas las regiones constantes IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, y que dichas regiones constantes se pueden obtener de cualquier especie animal o humana.

Generación de anticuerpos usando células huésped eucarióticas:

Construcción de vectores

Las secuencias de polinucleótidos que codifican los componentes de polipéptidos del anticuerpo de la invención se pueden obtener utilizando técnicas recombinantes estándar. Las secuencias deseadas de polinucleótidos se pueden aislar y secuenciar a partir de anticuerpos que producen células, como por ejemplo células de hibridoma. Alternativamente, los polinucleótidos se pueden sintetizar usando técnicas de PCR o sintetizador de nucleótidos. Una vez obtenidas, las secuencias que codifican los polipéptidos se insertan en un vector recombinante capaz de replicar y expresar polinucleótidos heterólogos en los huéspedes procarióticos. Muchos vectores que están disponibles y son conocidos en la materia se pueden utilizar para el fin de la presente invención. La selección de un vector apropiado dependerá principalmente del tamaño de los ácidos nucleicos que se van a insertar en el vector y de la célula huésped concreta que se transformará con el vector. Cada vector contiene diversos componentes, dependiendo de su función (amplificación o expresión de polinucleótido heterólogo o ambas) y su compatibilidad con la célula huésped concreta en la que resida. Por lo general, los componentes del vector incluyen, entre otros: un origen de replicación, un gen marcador de la selección, un promotor, un sitio de unión a ribosoma (RBS), una secuencia de señal, la inserción del ácido nucleico heterólogo y una secuencia de terminación de la transcripción.

En general, los vectores plásmidos que contienen secuencias de control y replicón que se derivan de especies compatibles con la célula huésped se usan en conexión con estos huéspedes. Por lo general, el vector lleva un sitio de replicación, así como secuencias de marcado, que son capaces de proporcionar selección fenotípica en células transformadas. Por ejemplo, *E. coli* se transforma habitualmente usando pBR322, un plásmido derivado de una especie *E. coli*. El pBR322 contiene genes que codifican la resistencia a la ampicilina (Amp) y tetraciclina (Tet) y, de este modo, proporcionan una forma fácil de identificar células transformadas. El pBR322, sus derivados, u otros plásmidos microbianos

o bacteriófagos pueden contener también, o ser modificados para que contengan, promotores que pueden ser utilizados por el organismo microbiano para la expresión de proteínas endógenas. Ejemplos de derivados del pBR322 usados para la expresión de anticuerpos concretos se describen en detalle en Carter y col., patente de EE.UU. N.º 5.648.237.

Además, los vectores fágicos que contienen secuencias de control y replicón que son compatibles con los microorganismos huésped se pueden usar como vectores de transformación en relación con estos huéspedes. Por ejemplo, un bacteriófago como λ GEM.TM.-11 se puede utilizar para marcar un vector recombinante que se pueda utilizar para transformar células huésped susceptibles como *E. coli* LE392.

El vector de expresión de la invención puede comprender dos o más pares de promotores de cistrón, que codifiquen cada uno de los componentes polipeptídicos. Un promotor es una secuencia reguladora no traducida situada antes del extremo (5') del promotor en un cistrón que modula su expresión. Los promotores procarióticos suelen pertenecer a dos clases: inducibles y constitutivos. El promotor inducible es aquel que inicia un aumento de los niveles de transcripción del cistrón bajo su control en respuesta a cambios en las condiciones del cultivo, por ejemplo, la presencia o ausencia de un nutriente o un cambio de temperatura.

Se conoce un gran número de promotores reconocidos por diversas células huésped posibles. El promotor seleccionado puede enlazarse funcionalmente al ADN del cistrón que codifica la cadena pesada o ligera mediante eliminación del promotor del ADN fuente a través de digestión enzimática mediante restricción e inserción de la secuencia aislada del promotor en el vector de la invención. Tanto la secuencia nativa del promotor como muchos promotores heterólogos se pueden utilizar para dirigir la amplificación y/o expresión de los genes diana. En algunas formas de realización, se utilizan promotores heterólogos, puesto que por lo general permiten una mayor transcripción y una mayor producción del gen diana expresado, frente al promotor polipeptídico diana nativo.

Los promotores aptos para su uso con huéspedes procarióticos incluyen el promotor PhoA, los sistemas promotores de lactosa y β -galactamasa, un sistema promotor a base de triptofano (*trp*) y promotores híbridos como el promotor *tac* o el *trc*. Sin embargo, también son aptos otros promotores que son funcionales en bacterias (como otros promotores de fagos o bacterianos conocidos). Se han

publicado sus secuencias de nucleótidos, lo que permite que un experto pueda ligarlas a cistrones que codifiquen las cadenas pesada y ligera dianas (Siebenlist y col., (1980) *Cell* 20: 269) usando enlazadores o adaptadores que proporcionen sitios de restricción necesarios.

En un aspecto de la invención, cada cistrón dentro del vector recombinante comprende un componente de la secuencia de señal de la secreción que dirige la translocación de los polipéptidos expresados en una membrana. En general, la secuencia de señal puede ser un componente del vector, o puede ser parte del ADN del polipéptido diana que se inserta en el vector. La secuencia de señal seleccionada a efectos de esta invención es aquella que la célula huésped reconoce y procesa (es decir, escindida por una peptidasa de señal). Para las células huésped procarióticas que no reconocen ni procesan las secuencias de señal nativas a los polipéptidos heterólogos, la secuencia de señal se sustituye por una secuencia de señal procariótica seleccionada, por ejemplo, entre un grupo formado por fosfatasa alcalina, penicilasa, lpp o líderes de enterotoxina II termoestable (STII), LamB, PhoE, PelB, OmpA y MBP. En una forma de realización de la invención, las secuencias de señal usadas en ambos cistrones del sistema de expresión son secuencias de señal STII o variantes de las mismas.

En otro aspecto, la producción de las inmunoglobulinas según la invención puede tener lugar en el citoplasma de la célula huésped y, por lo tanto, no requiere la presencia de secuencias de señal de secreción dentro de cada cistrón. A este respecto, las cadenas pesada y ligera de inmunoglobulina se expresan, multiplican y ensamblan para formar inmunoglobulinas funcionales dentro del citoplasma. Determinadas cepas de huéspedes (por ejemplo, las cepas de *E. coli* trxB) ofrecen condiciones citoplasmáticas que son favorables a la formación de uniones de disulfuros, lo que permite una multiplicación y ensamblaje correctos de las subunidades de las proteínas expresadas (Proba y Pluckthun *Gene*, 159:203 (1995)).

Los anticuerpos de la invención también se pueden producir usando un sistema de expresión en el que la relación cuantitativa de los componentes polipeptídicos expresados se pueda modular para maximizar la producción de anticuerpos secretados y debidamente ensamblados de la invención. Esta modulación se logra al menos en parte mediante modulación simultánea de concentraciones translacionales para los componentes polipeptídicos.

Una técnica para la modulación de la concentración translacional se divulga en Simmons y col., patente de EE.UU. N.º 5.840.523. Utiliza variantes de la región de iniciación translacional (TIR) dentro de un cistrón. Para una TIR dada, se puede crear una serie de variantes de secuencias de ácidos nucleicos o aminoácidos con un intervalo de concentraciones translacionales, lo que proporciona un medio conveniente mediante el cual ajustar este factor al nivel de expresión deseado de la cadena específica. Las variantes de la TIR se pueden generar mediante técnicas de mutagenia convencionales que dan lugar a cambios en codones que pueden alterar la secuencia aminoacídica. En ciertas formas de realización, los cambios en la secuencia de nucleótidos son silenciosos. Las alteraciones en la TIR pueden incluir, por ejemplo, alteraciones en el número o espaciado de secuencias de Shine-Dalgarno, junto con alteraciones en la secuencia de la señal. Un método para generar secuencias de señal mutantes es generar un "banco de codones" al inicio de una secuencia de codificación que no cambie la secuencia de aminoácidos de la secuencia de la señal (es decir, los cambios son silenciosos). Esto se puede conseguir cambiando la posición del tercer nucleótido de cada codón; además, algunos aminoácidos, como leucina, serina y arginina, tienen múltiples posiciones primera y segunda que pueden añadir complejidad para realizar el banco. Este método de mutagenia se describe en detalle en Yansura y col., (1992) *METHODS: A Companion to Methods in Enzymol.* 4:151-158.

En una forma de realización, un conjunto de vectores se genera con un intervalo de concentraciones de TIR para cada cistrón en ellos. Este conjunto limitado permite una comparación de los niveles de expresión de cada cadena, así como la producción de los productos deseados de anticuerpos en varias combinaciones de concentraciones de TIR. Las concentraciones TIR se pueden determinar cuantificando el nivel de expresión de un gen indicador como se describe en detalle en Simmons y col., patente de EE.UU. N.º 5.840.523. En función de la comparación de las concentraciones translacionales, las TIR individuales se seleccionan para su combinación en los constructos del vector de expresión de la invención.

Las células huésped procarióticas aptas para la expresión de anticuerpos de la invención incluyen Archaeobacteria y Eubacteria, como microorganismos grampositivos o gramnegativos. Entre los ejemplos de bacterias útiles se incluyen *Escherichia* (por ejemplo, *E. coli*), *Bacilli* (por ejemplo, *B. subtilis*), *Enterobacteria*,

las especies *Pseudomonas* (por ejemplo, *P. aeruginosa*), *Salmonella typhimurium*, *Serratia marcescans*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Shigella*, *Rhizobia*, *Vitreoscilla* o *Paracoccus*. En una forma de realización, se utilizan células gramnegativas. En una forma de realización, se utilizan células *E. coli* como huéspedes para la invención. Entre los ejemplos de cepas *E. coli* se incluyen la cepa W3110 (Bachmann, *Cellular and Molecular Biology*, vol. 2 (Washington, D.C.: American Society for Microbiology, 1987), págs. 1190-1219; depósito en la ATCC N.º 27.325) y derivados de las mismas, que incluyen la cepa 33D3 con el genotipo W3110 Δ fhuA (Δ tonA) ptr3 lac lq lacL8 Δ ompT Δ (nmpc-fepE) degP41 kanR (patente de EE.UU. N.º 5.639.635). Otras cepas y derivados de las mismas, como *E. coli* 294 (ATCC 31.446), *E. coli* B, *E. coli* λ 1776 (ATCC 31.537) y *E. coli* RV308 (ATCC 31.608) también están indicados. Estos ejemplos tienen carácter ilustrativo y no limitador. Los métodos para la construcción de derivados de cualquiera de las bacterias antes mencionadas con genotipos definidos son conocidos en la materia y se describen, por ejemplo, en Bass y col., *Proteins*, 8:309-314 (1990). Por lo general, es necesario seleccionar las bacterias apropiadas teniendo en cuenta la replicabilidad del replicón en las células de una bacteria. Por ejemplo, las especies *E. coli*, *Serratia* o *Salmonella* se pueden usar bien como huésped cuando plásmidos bien conocidos como pBR322, pBR325, pACYC177 o pKN410 se utilizan para suministrar al replicón. Normalmente, en caso de que la célula huésped deba secretar cantidades mínimas de enzimas proteolíticas puede resultar conveniente incorporar al cultivo celular inhibidores adicionales de la proteasa.

Producción de anticuerpos

Las células huésped se transforman con los vectores de expresión descritos anteriormente y se cultivan en medios nutrientes convencionales modificados como es adecuado para inducir promotores, seleccionar transformantes o amplificar los genes que codifican las secuencias deseadas.

Transformación significa introducir ADN en el huésped procariótico de forma que el ADN sea replicable, ya sea como elemento extracromosómico o como integrante cromosómico. Según la célula huésped que se utilice, la transformación se realiza empleando técnicas estándar apropiadas para dichas células. El tratamiento con calcio que emplea cloruro de calcio se usa por lo general para células bacterianas que contienen barreras sustanciales en la pared



celular. Otro método de transformación emplea polietilenglicol/DMSO. Otra técnica utilizada es la electroporación.

Las células procarióticas utilizadas para producir los polipéptidos de la invención se cultivan en medios conocidos en la materia y aptos para el cultivo de células huésped seleccionadas. Ejemplos de medios apropiados son caldo de luria (LB) más nutrientes complementarios necesarios. En algunas formas de realización, los medios también contienen un agente de selección, elegido en función de la construcción del vector de expresión, para permitir el crecimiento selectivo de células procarióticas que contengan el vector de expresión. Por ejemplo, se añade ampicilina a los medios de cultivo para el crecimiento de células que expresan un gen resistente a ampicilina.

Los anticuerpos necesarios aparte de carbono, nitrógeno y fuentes inorgánicas de fosfato también se pueden incluir a concentraciones apropiadas introducidas solas en una mezcla con otro suplemento o medio de cultivo como una fuente de nitrógeno compleja. Opcionalmente, el medio de cultivo puede contener uno o más agentes reductores seleccionados a partir del grupo formado por glutatona, cisteína, cistamina, tioglicolato, ditioeritriol y ditiotreitól.

Las células huésped procarióticas se cultivan a temperaturas apropiadas. En algunas formas de realización, para el crecimiento de *E. coli*, las temperaturas oscilan entre aproximadamente 20 °C y aproximadamente 39 °C; entre aproximadamente 25 °C y aproximadamente 37 °C; o aproximadamente 30 °C. El pH del medio de cultivo puede ser cualquiera comprendido entre 5 y 9, dependiendo principalmente del organismo huésped. En ciertas formas de realización, el pH para *E. coli* puede oscilar entre 6,8 y 7,4 aproximadamente o 7,0 aproximadamente.

Si un promotor inducible se utiliza en el vector de expresión de la invención, la expresión de la proteína se induce en condiciones aptas para la activación del promotor. En un aspecto de la invención, los promotores PhoA se utilizan para controlar la transcripción de los polipéptidos. Según esto, las células huésped transformadas se cultivan en un medio limitador de fosfato para la inducción. En algunas formas de realización, el medio de cultivo limitador de fosfato es el C.R.A.P (véase, por ejemplo, Simmons y col., *J. Immunol. Methods* (2002), 263:133-147). Se pueden utilizar otros inductores diversos, según el constructo de vector empleado, como se sabe en la materia.

En una forma de realización, los polipéptidos expresados de la presente invención se secretan en el periplasma de las células huésped y se recuperan allí. La recuperación de las proteínas generalmente supone la ruptura de los microorganismos, por lo general mediante choque osmótico, sonicación o lisis. Una vez producida la ruptura de las células, los desechos celulares o células enteras se pueden eliminar mediante centrifugación o filtración. Las proteínas pueden purificarse más, por ejemplo, mediante cromatografía de afinidad con resina. De manera alternativa, pueden transportarse proteínas dentro de los medios de cultivo y aislarse en él. Las células pueden retirarse del cultivo, y el sobrenadante del cultivo puede filtrarse y concentrarse para proceder a la posterior purificación de las proteínas producidas. Los polipéptidos expresados pueden volver a aislarse e identificarse mediante métodos comúnmente conocidos, como la electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE) y ensayo Western blot.

En uno de los aspectos de la invención, la producción de anticuerpos se realiza en gran cantidad mediante proceso de fermentación. Existen varios procesos disponibles de fermentación de lotes alimentados a gran escala para la producción de proteínas recombinantes. Las fermentaciones a gran escala se realizan en dispositivos de al menos 1.000 litros de capacidad y, en ciertas formas de realización, entre 1.000 y 100.000 litros de capacidad. Estos fermentadores utilizan agitadores de hélice para distribuir oxígeno y nutrientes, especialmente glucosa (la fuente preferente de carbono/energía). La fermentación a pequeña escala hace referencia generalmente a la fermentación en fermentadores de aproximadamente no más de 100 litros de capacidad volumétrica, y pueden variar de 1 a 100 litros aproximadamente.

En un proceso de fermentación, la inducción de expresión proteica se inicia típicamente después de que las células hayan crecido en condiciones adecuadas hasta alcanzar la densidad deseada, por ejemplo una OD₅₅₀ de entre 180-220, momento en el cual las células se encuentran en la fase estacionaria temprana. Pueden usarse distintos inductores, de acuerdo con el constructo del vector utilizado, tal y como se conoce en la materia y como se ha descrito anteriormente. Las células pueden hacerse crecer durante períodos más cortos antes de la inducción. Las células se inducen normalmente durante unas 12-50 horas, aunque es posible utilizar tiempos de inducción más prolongados o más cortos.

Pueden modificarse distintas condiciones de fermentación para mejorar el rendimiento de producción y la calidad de los polipéptidos de la invención. Por ejemplo, para mejorar el ensamblaje adecuado y el plegamiento de los polipéptidos de anticuerpos secretados, pueden utilizarse vectores adicionales que sobreexpresan la proteína chaperona, tales como proteínas Dsb (DsbA, DsbB, DsbC, DsbD y/o DsbG) o FkpA (una peptidil-propil cys,trans-isomerasa con actividad chaperona) para co-transformar las células huésped procarióticas. Se ha demostrado que las proteínas chaperonas facilitan la solubilidad y el plegamiento adecuado de las proteínas heterólogas producidas en células bacterianas huésped. Chen y col., (1999) *J Bio Chem* 274:19601-19605; Georgiou y col., patente de EE.UU. N.º 6.083.715; Georgiou y col., patente de EE.UU. N.º 6.027.888; Bothmann y Pluckthun (2000) *J. Biol. Chem.* 275:17100-17105; Ramm y Pluckthun (2000) *J. Biol. Chem.* 275:17106-17113; Arie y col., (2001) *Mol. Microbiol.* 39:199-210.

Pueden utilizarse ciertas cepas huésped con deficiencia de enzimas proteolíticas para minimizar la proteólisis de proteínas heterólogas (especialmente las que son sensibles desde el punto de vista proteolítico). Por ejemplo, las cepas de células huésped pueden modificarse para efectuar mutaciones genéticas relativas a los genes que codifican proteasas bacterianas conocidas, como la Proteasa III, OmpT, DegP, Tsp, Proteasa I, Proteasa Mi, Proteasa V, Proteasa VI y combinaciones de éstas. Algunas cepas de *E. coli* con deficiencia de proteasas están disponibles, y descritas, por ejemplo en Joly y col. (1998), citado anteriormente; Georgiou y col., patente de EE.UU. N.º 5.264.365; Georgiou y col., patente de EE.UU. N.º 5.508.192; Hara y col., *Microbial Drug Resistance*, 2:63-72 (1996).

En una forma de realización, en el sistema de expresión de la invención se utilizan como células huésped cepas de *E. coli* con deficiencia de enzimas proteolíticas transformadas con plásmidos que sobreexpresan una o más proteínas chaperonas.

Purificación de anticuerpos

En una forma de realización, la proteína de anticuerpo que se produce mediante la invención descrita en la presente memoria se purifica más para obtener preparaciones que son substancialmente homogéneas para posteriores ensayos y usos. Pueden emplearse métodos estándar conocidos en la materia para la purificación de proteínas. Los siguientes procedimientos tienen carácter

ejemplar en lo que se refiere a procedimientos de purificación adecuados: fraccionamiento en columnas de intercambio iónico o de inmunoafinidad, precipitación en etanol, HPLC de fase reversa, cromatografía en anhídrido silícico o en una resina de intercambio catiónico tal como DEAE, cromatografía de exclusión, SDS-PAGE, precipitación en sulfato de amonio y filtrado en gel mediante, por ejemplo, Sephadex G-75.

En un aspecto, se utiliza Proteína A inmovilizada en una fase sólida para purificación por inmunoafinidad de los productos de anticuerpos de la invención. La proteína A es una proteína de pared celular de 41kD del *Staphylococcus aureus* que se une con gran afinidad por la región Fc de los anticuerpos. Lindmark y col., (1983) *J. Immunol. Meth.* 62:1-13. La fase sólida a la que se fija la Proteína A puede ser una columna que contenga una superficie de vidrio o anhídrido silícico, o una columna de ácido silícico o de vidrio poroso controlado. En ciertas aplicaciones, la columna se recubre con un reactivo, como el glicerol, para evitar una posible adherencia inespecífica de contaminantes.

Como primer paso de purificación, una preparación derivada del cultivo celular, según lo descrito anteriormente, puede aplicarse a una fase sólida de Proteína A inmovilizada para permitir la unión específica del anticuerpo de interés a la Proteína A. La fase sólida se lavaría a continuación, para eliminar los contaminantes unidos inespecíficamente a ella. Finalmente, el anticuerpo de interés se recupera de la fase sólida mediante elución.

Generación de anticuerpos usando células huésped eucarióticas:

Un vector para utilizar en una célula huésped eucariótica incluye, por lo general, uno o más de los siguientes componentes no limitantes: una secuencia de señal, un origen de replicación, uno o más genes marcadores, un potenciador, un promotor y una secuencia de finalización de la transcripción.

Componente de secuencia de señal

Un vector para utilizar en una célula huésped eucariótica puede contener también una secuencia de señal u otro polipéptido con una escisión específica en el N-terminal de la proteína madura o polipéptido de interés. La secuencia de señal heteróloga seleccionada puede ser aquella que la célula huésped reconoce y procesa (es decir, escindida por una peptidasa de señal). En la expresión celular de los mamíferos, están disponibles las secuencias de señal de los mamíferos así como los líderes secretorios víricos, por ejemplo, la señal del

herpes simplex gD. El ADN para la región de dicho precursor está ligado en la estructura de lectura al ADN que codifica el anticuerpo.

Origen de la replicación

Por lo general, no es necesario un componente origen de la replicación para los vectores de expresión en mamíferos. Por ejemplo, el origen SV40 se puede utilizar habitualmente sólo porque contiene el promotor precoz.

Componente gen de selección

Los vectores de expresión y clonación pueden contener un gen de selección, también denominado marcador seleccionable. Los genes de selección típicos codifican proteínas que (a) otorgan resistencia a antibióticos u otras toxinas, por ejemplo, ampicilina, neomicina, metotrexato o tetraciclina, (b) complementan las deficiencias auxotróficas, si procede o (c) suministran nutrientes básicos no disponibles a partir de medios complejos.

Un ejemplo de un esquema de selección utiliza un fármaco para detener el crecimiento de una célula huésped. Estas células que se transforman con éxito con un gen heterólogo producen una proteína que otorga resistencia al fármaco y, así, sobrevive a la estrategia de selección. Ejemplos de esta selección dominante utilizan los fármacos neomicina, ácido micofenólico e higromicina.

Otro ejemplo de marcadores seleccionables adecuados para células de mamíferos son los que permiten la identificación de las células encargadas de absorber el ácido nucleico del anticuerpo, como DHFR, timidina cinasa, metalotioneína I y II, preferiblemente, genes de metalotioneína en primates, adenosina deaminasa, ornitina decarboxilasa, etc.

Por ejemplo, en algunas formas de realización, las células transformadas con el gen de selección DHFR se identifican primero a través del cultivo de todos los transformantes en un medio de cultivo que contiene metotrexato (Mtx), un antagonista competitivo del DHFR. En algunas formas de realización, una célula huésped adecuada cuando se utiliza el DHFR de tipo natural es la línea celular de ovario de hámster chino (CHO) deficiente en actividad del DHFR (por ejemplo, ATCC CRL-9096).

Alternativamente, las células huésped (en especial los huéspedes naturales que contienen DHFR endógeno) transformadas o co-transformadas con secuencias de ADN que codifican un anticuerpo, la proteína DHFR natural y otro marcador seleccionable como la aminoglicosida 3'-fosfotransferasa (APH) puede seleccionarse mediante crecimiento celular en un medio que contenga un agente

de selección para el marcador seleccionable, como un antibiótico aminoglicosídico, por ejemplo, canamicina, neomicina o G418. Véase la patente de EE.UU. N.º 4.965.199.

Componente promotor

Los vectores de expresión y clonación suelen contener un promotor que es reconocido por el organismo huésped y está operativamente enlazado al ácido nucleico que codifica un polipéptido de interés (por ejemplo, un anticuerpo). Se conocen las secuencias de promotores para eucariotas. Por ejemplo, prácticamente todos los genes eucarióticos poseen una región rica en AT situada aproximadamente entre las bases 25 y 30 antes del extremo 5' del promotor desde donde se inicia la transcripción. Otra secuencia encontrada entre las bases 70 y 80 antes del extremo 5' del promotor desde el inicio de la transcripción de muchos genes es la región CNCAAT en la que N puede ser cualquier nucleótido. En el extremo 3' de la mayoría de los genes eucarióticos se encuentra una secuencia AATAAA que puede ser la señal para la adición de la cola de poli(A) al extremo 3' de la secuencia de codificación. En ciertas formas de realización, la totalidad o algunas de estas secuencias se pueden insertar sin problemas en vectores de expresión eucarióticos.

La transcripción a partir de los vectores en células huésped de mamíferos está controlada, por ejemplo, por promotores obtenidos a partir de los genomas de virus como el poliomavirus, el virus de la viruela de las aves de corral, el adenovirus (como el Adenovirus 2), el virus del papiloma bovino, el virus del sarcoma aviario, el citomegalovirus, un retrovirus, el virus de la hepatitis B y el Simian Virus 40 (SV40); a partir de promotores heterólogos de mamíferos, por ejemplo, el promotor de actina o un promotor de inmunoglobulina, o a partir de promotores de choque térmico, siempre que dichos promotores sean compatibles con los sistemas de las células huésped.

Los promotores tempranos y tardíos del virus SV40 se obtienen fácilmente como un fragmento de restricción del SV40, que también contiene el origen viral de replicación del SV40. El promotor temprano inmediato del citomegalovirus humano se obtiene fácilmente como un fragmento de restricción HindIII E. Un sistema para la expresión del ADN en huéspedes de mamíferos que utilizan el virus del papiloma bovino como vector se da a conocer en la patente de EE.UU N.º 4.419.446. Una modificación de este sistema se describe en la patente de EE.UU N.º 4.601.978. Véase también Reyes y col., *Nature* 297:598-601 (1982)

para la expresión del ADNc del interferón beta humano en células de ratón bajo el control de un promotor timidina cinasa del virus del herpes simplex. Alternativamente, la repetición del terminal largo del virus del sarcoma de Rous se puede utilizar como promotor.

Componente elemento potenciador

La transcripción de ADN que codifica un anticuerpo de esta invención a través de eucariotas más altas se aumenta con frecuencia al insertar la secuencia de un potenciador en el vector. Se conocen ya muchas secuencias de potenciadores de genes de mamíferos (globina, elastasa, albúmina, fetoproteína alfa e insulina). No obstante, lo habitual es que se utilice un potenciador procedente de un virus de células eucarióticas. Entre los ejemplos destacan el potenciador SV40 en el lado tardío del origen de la replicación (bp 100-270), el potenciador del promotor temprano de citomegalovirus, el potenciador de polioma en el lado tardío del origen de la replicación y los potenciadores de adenovirus. Véase también Yaniv, *Nature* 297:17-18 (1982), que describe los elementos de potenciación para activar los promotores eucarióticos. El potenciador puede empalmarse en el vector en una posición 5' a 3' a la secuencia de codificación del polipéptido del anticuerpo, pero está situado generalmente en un sitio 5' desde el promotor.

Componente de finalización de la transcripción

Los vectores de expresión utilizados en células huésped eucarióticas pueden también contener secuencias necesarias para la terminación de la transcripción y para la estabilización del ARNm. Estas secuencias están habitualmente disponibles desde las regiones no traducidas del extremo 5' y ocasionalmente el 3' de los ADN o ADNc virales o eucarióticos. Estas regiones contienen segmentos de nucleótidos transcritos como fragmentos poliadenilados en la porción no traducida del ARNm que codifica un anticuerpo. Un componente de finalización de la transcripción útil es la región de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina. Véase el documento WO94/11026 y el vector de expresión que se da a conocer en el mismo.

Selección y transformación de células huésped

Entre las células huésped apropiadas para clonación o expresión del ADN en los vectores de la presente memoria descriptiva figuran las células eucariotas más altas, incluidas las células huésped de vertebrados. La propagación de células de vertebrados en cultivos (cultivo tisular) se ha convertido en un

procedimiento habitual. Ejemplos de líneas celulares útiles de mamíferos son la línea CV1 de riñón del mono transformada por SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); la línea de riñón embrionario humano (293 ó 293 células subclonadas para crecimiento en cultivo en suspensión, Graham y col., *J. Gen Virol.* 36:59 (1977)) ; células de riñón de crías de hámster (BHK, ATCC CCL 10); células de ovario de hámster chino/-DHFR (CHO, Urlaub y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216 (1980)); células sertoli de ratón (TM4, Mather, *Biol. Reprod.* 23:243-251 (1980)); células de riñón de mono (CV1 ATCC CCL 70); células de riñón de mono verde africano (VERO-76, ATCC CRL-1587); células de carcinoma cervical humano (HELA, ATCC CCL 2); células caninas de riñón (MDCK, ATCC CCL 34); células de riñón de ratas búfalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442); células humanas de pulmón (W138, ATCC CCL 75); células hepáticas humanas (Hep G2, HB 8065); tumor de mama de ratón (MMT 060562, ATCC CCL51); células TRI (Mather y col., *Annals N.Y. Acad. Sci.* 383:44-68 (1982)); células MRC 5; células FS4 y una línea de hepatoma humano (Hep G2).

Las células huésped se transforman con los vectores de expresión o clonación descritos anteriormente para la producción del anticuerpo y se cultivan en medios nutrientes convencionales modificados como es adecuado para inducir promotores, seleccionar transformantes o amplificar los genes que codifican las secuencias deseadas.

Cultivo de células huésped

Las células huésped utilizadas para producir un anticuerpo de esta invención se pueden cultivar en diversos medios. Medios comercialmente disponibles como Ham's F10 (Sigma), Minimal Essential Medium ((MEM), (Sigma), RPMI-1640 (Sigma) y Dulbecco's Modified Eagle's Medium ((DMEM), Sigma) son aptos para el cultivo de células huésped. Además, cualquiera de los medios de cultivo descritos en Ham y col., *Meth. Enz.* 58:44 (1979), Barnes y col., *Anal. Biochem.* 102:255 (1980), patentes de EE.UU. N.º 4.767.704, 4.657.866, 4.927.762, 4.560.655 ó 5.122.469; el documento WO 90/03430; el documento WO 87/00195; o la patente de EE.UU. Ref. 30.985 se pueden utilizar como medios de cultivo para células huésped. Cualquiera de estos medios se puede complementar cuando sea necesario con hormonas y otros factores de crecimiento (como insulina, transferrina o factor de crecimiento epidérmico), sales (como cloruro sódico, calcio, magnesio y fosfato), tampones (como HEPES), nucleótidos (como adenosina y timidina), antibióticos (como el fármaco

GENTAMYCIN™), elementos de traza (definidos como compuestos inorgánicos presentes por lo habitual en las concentraciones finales en el rango micromolar) y glucosa o una fuente de energía equivalente. También pueden incluirse otros suplementos en las concentraciones adecuadas conocidas por los expertos en la materia. Las condiciones del cultivo, tales como la temperatura o el pH, entre otras, son las utilizadas anteriormente con la célula huésped seleccionada para la expresión y serán evidentes para los expertos.

Purificación del anticuerpo

Al utilizar técnicas recombinantes, se puede producir el anticuerpo intracelularmente o directamente secretado en el medio. Si el anticuerpo se produce intracelularmente, como primer paso, los residuos de partículas, ya sean células huésped o fragmentos lisados, se pueden eliminar, por ejemplo, mediante centrifugación o ultrafiltrado. Cuando el anticuerpo es secretado en el medio, los sobrenadantes de dichos sistemas de expresión se pueden concentrar primero utilizando un filtro para concentración de proteínas disponible comercialmente, por ejemplo una unidad de ultrafiltrado Amicon o Millipore Pellicon. Se puede incluir un inhibidor de la proteasa como PMSF en cualquiera de las fases anteriores para inhibir la proteólisis y se pueden incluir antibióticos para impedir el crecimiento de contaminantes casuales.

La composición del anticuerpo preparado a partir de las células se puede purificar utilizando, por ejemplo, cromatografía de hidroxilapatita, electroforesis en gel, diálisis y cromatografía de afinidad. Esta última es una técnica de purificación conveniente. La idoneidad de la proteína A como ligando de afinidad depende de las especies y del isotipo de cualquier dominio Fc de la inmunoglobulina que está presente en el anticuerpo. La proteína A se puede utilizar para purificar anticuerpos que se basan en cadenas pesadas humanas $\gamma 1$, $\gamma 2$, o $\gamma 4$ (Lindmark y col., *J. Immunol. Methods* 62:1-13 (1983)). La proteína G se recomienda para todos los isotipos de ratón y para la $\gamma 3$ humana (Guss y col., *EMBO J.* 5:1567-1575 (1986)). La matriz a la que el ligando de afinidad se une puede ser agarosa, pero también están disponibles otras matrices. Las matrices mecánicamente estables, como vidrio poroso controlado o poli(estireno-divinil)benceno, permiten tasas de flujo más rápidas y tiempos de procesamiento más cortos que los que se pueden lograr con agarosa. Cuando el anticuerpo comprende un dominio CH3, la resina Bakerbond ABX™ (J. T. Baker, Phillipsburg, New Jersey) es útil para la purificación. También están disponibles, dependiendo del anticuerpo que quiera

recuperarse, otras técnicas para la purificación de las proteínas, como fraccionamiento en una columna de intercambio iónico, precipitación en etanol, HPLC de fase inversa, cromatografía en anhídrido silícico, cromatografía en heparina SEPHAROSE™, cromatografía en una resina de intercambio iónico o catiónico (como una columna de ácido poliaspártico), cromatoisoelectroforesis, SDS-PAGE y precipitación en sulfato de amonio.

Seguindo cualquiera de las fases preliminares de purificación, la mezcla que contiene el anticuerpo de interés y los contaminantes puede estar sujeta a nuevas etapas de purificación, por ejemplo, mediante cromatografía de interacción hidrófoba con pH bajo utilizando una solución de elución a un pH entre 2,5 y 4,5, generalmente a concentraciones bajas en sal (por ejemplo, entre 0-0,25M aproximadamente).

En general, están consolidados en la materia diversos métodos para la preparación de anticuerpos para uso en investigación, pruebas y uso clínico, son coherentes con todo lo anterior y/o se consideran apropiados por un experto en la materia para un anticuerpo concreto de interés.

Inmunoconjugados

La invención también proporciona inmunoconjugados (también denominados "conjugados de anticuerpos con fármacos" o "ADC"), que comprenden cualquiera de los anticuerpos anti-CD22 de la invención conjugado a uno o más agentes citotóxicos como por ejemplo un agente quimioterapéutico, un fármaco, un agente inhibidor del crecimiento, una toxina (por ejemplo, una toxina enzimáticamente activa de origen bacteriano, fúngico, animal o vegetal, o fragmentos de la misma) o un isótopo radioactivo (es decir, un radioconjugado).

En ciertas formas de realización, un inmunoconjugado comprende un anticuerpo anti-CD22 y un agente quimioterapéutico u otra toxina. Los agentes quimioterapéuticos útiles en la generación de inmunoconjugados se describen en la presente memoria descriptiva (por ejemplo, anteriormente). También se pueden utilizar toxinas enzimáticamente activas y fragmentos de las mismas y se describen en la presente memoria descriptiva.

En ciertas formas de realización, un inmunoconjugado comprende un anticuerpo anti-CD22 y una o más toxinas de molécula pequeña, incluyendo, entre otros, fármacos de molécula pequeña como caliqueamicina, maitansinoide, dolastatina, auristatina, tricoteceno y CC1065, así como los derivados de estos

fármacos que tengan actividad citotóxica. A continuación, se describen detalladamente ejemplos de estos inmunoconjugados.

1. Inmunoconjugados ejemplares – Conjugados de anticuerpos con fármacos

Un inmunoconjugado (o “conjugado de anticuerpo con fármacos” (“ADC”)) de la invención puede ser la Fórmula I, que figura a continuación, donde un anticuerpo anti-CD22 se conjuga (es decir, se une covalentemente) con una o más fracciones de fármaco (D) a través de un enlazador opcional (L).



Por consiguiente, el anticuerpo anti-CD22 se puede conjugar con el fármaco ya sea directamente o mediante un enlazador. En la Fórmula I, p es el promedio de fracciones de fármaco por anticuerpo, que puede oscilar, por ejemplo, entre aproximadamente 1 y aproximadamente 20, fracciones de fármaco por anticuerpo y, en ciertas formas de realización, entre 1 y aproximadamente 8 fracciones de fármaco por anticuerpo.

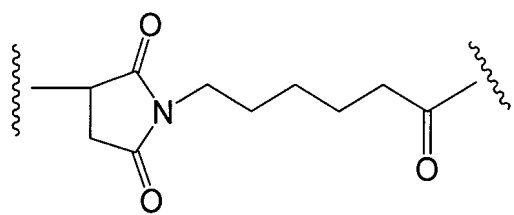
Enlazadores ejemplares

En la presente memoria descriptiva se detallan enlazadores y fracciones de fármacos ejemplares. Un enlazador puede comprender uno o más componentes enlazadores. Los componentes de enlace ejemplares incluyen: 6-maleimidocaproilo (“MC”), maleimidopropanoilo (“MP”), valina-citrulina (“val-cit” o “vc”), alanina-fenilalanina (“ala-phe”), p-aminobensiloxycarbonil (“PAB”), N-Succinimidil 4-(2-piridiltio) pentanoato (“SPP”), N-Succinimidil 4-(N-maleimidometil) ciclohexano-1 carboxilato (“SMCC”), y N-Succinimidil (4-yodo-acetil) aminobenzoato (“SIAB”). Diversos componentes enlazadores son conocidos en la materia y algunos se describen más adelante.

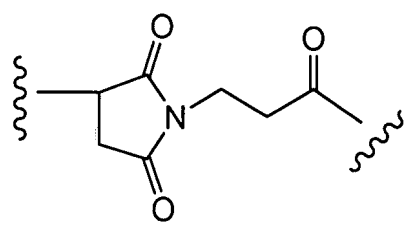
Un enlazador puede ser un “enlazador escindible”, que facilite la liberación de un fármaco en la célula. Por ejemplo, puede utilizarse un enlazador lábil al ácido (por ejemplo, hidrazona), un enlazador sensible a la proteasa (por ejemplo, sensible a la peptidasa), un enlazador fotolábil, un enlazador de dimetilo o un enlazador que contenga disulfuro (Chari y col., *Cancer Research* 52:127131 (1992); patente de EE.UU. N.º 5.208.020).

En ciertas formas de realización, un componente enlazador puede comprender una “unidad de extensión” que une un anticuerpo con otro componente enlazador o con una fracción de fármaco. A continuación se

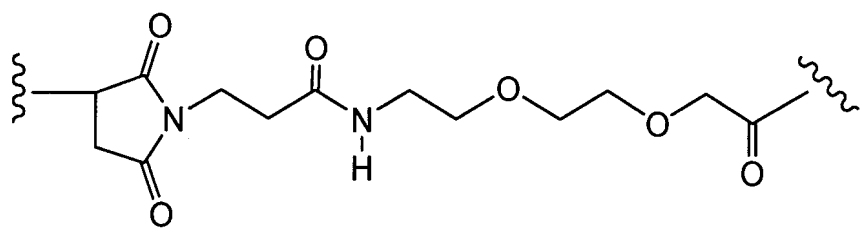
muestran unidades de extensión ejemplares (en las que la línea ondulada indica sitios de enlace covalente a un anticuerpo):



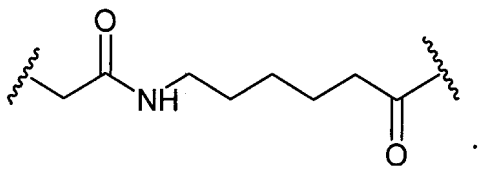
MC



MP



MPEG



En ciertas formas de realización, un componente enlazador puede comprender una unidad de aminoácidos. En una de estas formas de realización, la unidad de aminoácidos permite la escisión del enlazador por una proteasa, lo que facilita la liberación del fármaco desde el inmunoconjugado tras exposición a proteasas intracelulares, como enzimas lisosomales. Véase, por ejemplo, Doronina y col., (2003) *Nat. Biotechnol.* 21:778-784. Entre las unidades de aminoácidos ejemplares se encuentra un dipéptido, un tripéptido, un tetrapéptido y un pentapéptido. Los dipéptidos ejemplares incluyen: valina-citrulina (vc o val-cit), alanina-fenilalanina (af o ala-phe); fenilalanina-lisina (fk o phe-lys); o N-metil-valina-citrulina (Me-val-cit). Los tripéptidos ejemplares incluyen: glicina-valina-citrulina (gly-val-cit) y glicina-glicina-glicina (gly-gly-gly). Una unidad de aminoácidos puede comprender residuos de aminoácidos que ocurren de forma

3

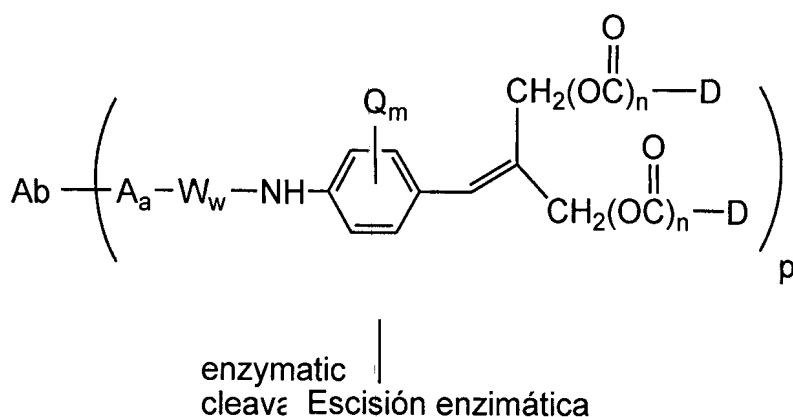
natural, así como aminoácidos menores y análogos de aminoácidos que no ocurren de forma natural, como la citrulina. Las unidades de aminoácidos pueden designarse y optimizarse en su selectividad para la escisión mediante una enzima específica, por ejemplo, una proteasa asociada a un tumor, catepsina B, C y D, o una proteasa plasmina.

En algunas formas de realización, un componente enlazador puede comprender una unidad “espaciadora” que une el anticuerpo a una fracción de fármaco, bien directamente bien mediante una unidad de extensión y/o una unidad de aminoácidos. Una unidad espaciadora puede ser “autoinmoladora” o “no autoinmoladora”. Una unidad espaciadora “no autoinmoladora” es aquella en la que la totalidad o parte de la unidad espaciadora permanece unida a la fracción del fármaco tras escisión enzimática (por ejemplo, proteolítica) del ADC. Entre los ejemplos de unidades espaciadoras no autoinmoladoras están una unidad espaciadora de glicina y una unidad espaciadora de glicina-glicina. También se consideran otras combinaciones de espaciadores peptídicos susceptibles de escisión enzimática específica para una secuencia. Por ejemplo, la escisión enzimática de un ADC que contenga una unidad espaciadora de glicina-glicina mediante una proteasa asociada a una célula tumoral daría lugar a la liberación de la fracción de fármaco de glicina-glicina desde el resto del ADC. En una de estas formas de realización, la fracción de fármaco de glicina-glicina está entonces sujeta a una fase independiente de hidrólisis, lo que permite la escisión de la unidad espaciadora de glicina-glicina de la fracción del fármaco.

Una unidad espaciadora “autoinmoladora” permite la liberación de la fracción del fármaco sin una fase de hidrólisis independiente. En determinadas formas de realización, una unidad espaciadora de un enlazador comprende una unidad p-aminobenzilo. En una de estas formas de realización, un alcohol p-aminobenzilo se une a una unidad de aminoácidos mediante una unión amida, y un carbamato, metilcarbamato o carbonato se realiza entre el alcohol de benzilo y un agente citotóxico. Véase, por ejemplo, Hamann y col., (2005) *Expert Opin. Ther. Patents* (2005) 15:1087-1103. En una forma de realización, la unidad espaciadora es p-aminobenciloxicarbonilo (PAB). En ciertas formas de realización, la porción de fenileno de una unidad de benzilo p-amino se sustituye por Q_m, donde Q es C₁-C₈ alquilo, -O-(C₁-C₈ alquilo), -halógeno, -nitro o -ciano; y m es un número entero que oscila entre 0 y 4. Otros ejemplos de unidades espaciadoras autoinmoladoras incluyen, entre otros, compuestos aromáticos que

son electrónicamente similares a alcohol p-aminobencilo (véase, por ejemplo, patente de EE.UU. N.º 2005/0256030 A1), como derivados de 2-aminoimidazol-5-metanol (Hay y col., (1999) *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 9:2237) y orto- o para-aminobencilacetales. Se pueden utilizar espaciadores que se sometan a ciclización tras hidrólisis de la unión amida, como amidas a ácido 4-aminobutírico sustituido y no sustituido (Rodrigues y col., *Chemistry Biology*, 1995, 2, 223); sistemas en anillo biciclo[2.2.1] y biciclo[2.2.2] sustituidos adecuadamente (Storm y col., *J. Amer. Chem. Soc.*, 1972, 94, 5815); y amidas de ácido 2-aminofenilpropiónico (Amsberry y col., *J. Org. Chem.*, 1990, 55, 5867). La eliminación de fármacos con contenido en aminas que se sustituyen en la posición a de la glicina (Kingsbury y col., *J. Med. Chem.*, 1984, 27, 1447) también constituye un ejemplo de espaciadores autoinmoladores útiles en ADC.

En una forma de realización, una unidad espaciadora es una unidad ramificada bis(hidroximetil)estireno (BHMS) como se muestra a continuación, que se puede utilizar para incorporar y liberar múltiples fármacos.



2 drugs

2 fármacos

donde Q es -C₁-C₈ alquilo, -C₁-C₈ alquilo, -halógeno, -nitro o -ciano; m es un número entero que oscila entre 0 y 4; n es 0 ó 1; y p oscila entre 1 y aproximadamente 20.

Un enlazador puede comprender uno o más componentes enlazadores anteriores. En determinadas formas de realización, un enlazador es como se muestra entre corchetes en la siguiente Fórmula II de ADC.

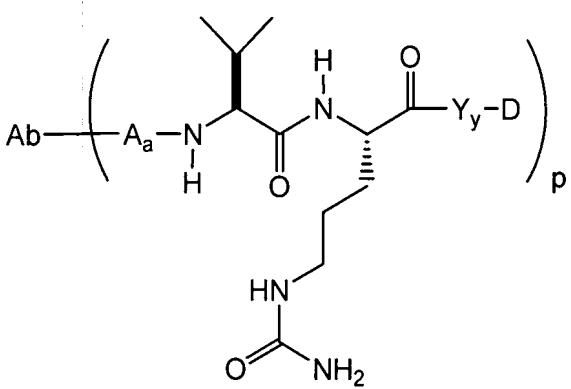


Fórmula II

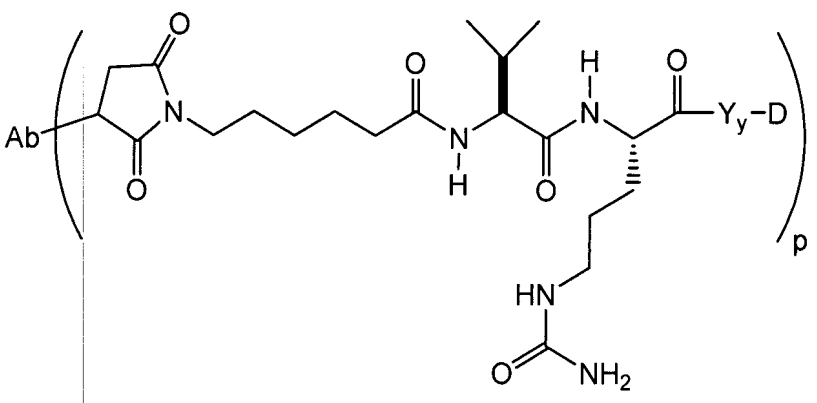
donde A es una unidad de extensión y a es un número entero comprendido entre 0 y 1; W es una unidad de aminoácidos y w es un número entero comprendido entre 0 y 12; Y es una unidad espaciadora e y es 0, 1 ó 2; y Ab, D y

p se definen como se ha hecho anteriormente para la Fórmula I. Formas de realización ejemplares de estos enlazadores se describen en la patente de EE.UU. N.º 20050238649 A1, que se incorpora expresamente en la presente memoria descriptiva a modo de referencia.

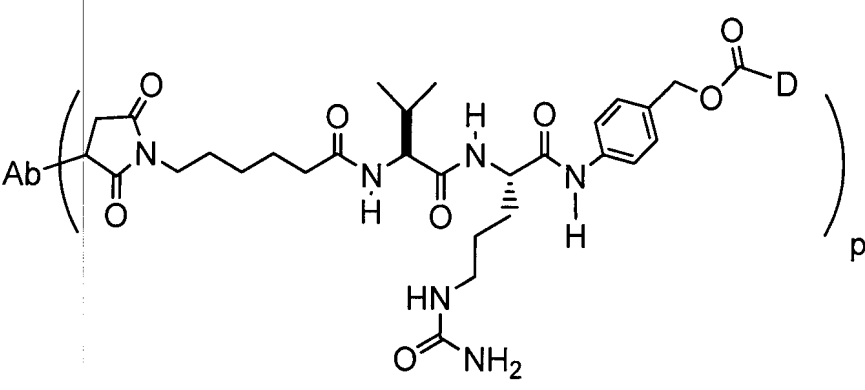
Los componentes enlazadores ejemplares y las combinaciones de los mismos se muestran a continuación en el contexto de los ADC de la Fórmula II:



Val-Cit o VC



MC-val-cit



MC-val-cit-PAB

Los componentes enlazadores, incluyendo las unidades de extensión, espaciadora y de aminoácidos, se pueden sintetizar mediante métodos conocidos en el sector, como los descritos en la patente de EE.UU. N.º 2005-0238649 A1.

Fracciones de fármacos ejemplares

Maitansina y maitansinoides

En algunas realizaciones, un inmunoconjugado comprende un anticuerpo de la invención conjugado con una o más moléculas de maitansinoides. Los maitansinoides son inhibidores mitóticos que actúan inhibiendo la polimerización de la tubulina. La maitansina se aisló por primera vez del arbusto de África oriental *Maytenus serrata* (patente de EE.UU. N.º 3896111). Posteriormente, se descubrió que determinados microbios también producían maitansinoides, como el maitansinol y los ésteres de C-3 maitansinol (patente de EE.UU. N.º 4.151.042). El maitansinol sintético y sus derivados y análogos se describen, por ejemplo, en las patentes de EE.UU. N.º 4.137.230; 4.248.870; 4.256.746; 4.260.608; 4.265.814; 4.294.757; 4.307.016; 4.308.268; 4.308.269; 4.309.428; 4.313.946; 4.315.929; 4.317.821; 4.322.348; 4.331.598; 4.361.650; 4.364.866; 4.424.219; 4.450.254; 4.362.663 y 4.371.533.

Las fracciones de fármacos maitansinoides son fracciones de fármacos que resultan atractivas para la elaboración de conjugados de anticuerpos con fármacos por sus siguientes características: (i) son relativamente accesibles en lo que se refiere a su preparación mediante fermentación, modificación química o derivación de productos de fermentación, (ii) son fáciles de someter a derivación, con grupos funcionales adecuados para conjugación a través de los enlazadores no disulfuro con anticuerpos, (iii) poseen estabilidad en plasma, y (iv) resultan eficaces frente a distintas líneas celulares tumorales.

Los compuestos de maitansina aptos para uso como fracciones de fármacos maitansinoides son bien conocidos en la materia y se pueden aislar de fuentes naturales según métodos conocidos o se pueden producir mediante técnicas de ingeniería genética (véase Yu y col., (2002) PNAS 99:7968-7973). El maitansinol y los análogos del maitansinol también se pueden preparar de forma sintética mediante métodos conocidos.

A continuación se citan algunas formas de realización ejemplares de fracciones de fármacos maitansinoides: DM1; DM3; y DM4, se detallan en la presente memoria descriptiva.

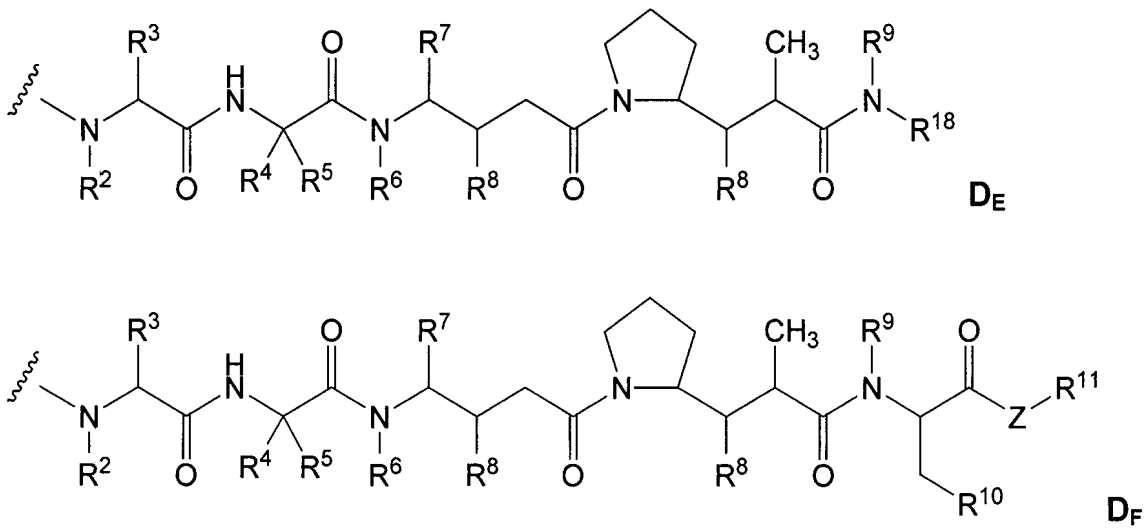
Auristatinas y dolastatinas

En algunas formas de realización, un inmunoconjugado comprende un anticuerpo de la invención conjugado con dolastatina o un análogo o derivado peptídico de la dolastatina, por ejemplo, una auristatina (patentes de EE.UU. N.º 5635483; 5780588). Se ha establecido que las dolastatinas y las auristatinas interfieren con la dinámica de microtúbulos, la hidrólisis GTP, y la división nuclear

y celular (Woyke y col., (2001) *Antimicrob. Agents and Chemother.* 45(12):3580-3584) y tiene actividad antineoplásica (patente de EE.UU. N.º 5663149) y antifúngica (Pettit y col., (1998) *Antimicrob. Agents Chemother.* 42:2961-2965). La fracción del fármaco auristatina o dolastatina puede estar unida al anticuerpo a través de los extremos terminales N (amino) o C (carboxil) de la fracción péptido del fármaco (documento WO 02/088172).

Entre las formas de realización ejemplares de auristatina se incluyen las fracciones DE y DF de fármacos de monometilauristatina enlazados al extremo N-terminal, descritas en Senter y col., *Proceedings of the American Association for Cancer Research*, Volume 45, Abstract Number 623, presentada el 28 de marzo de 2004, cuyo contenido se incorpora expresamente en su totalidad a modo de referencia.

Una fracción peptídica de un fármaco se puede seleccionar entre las Fórmulas DE and DF siguientes:



donde la línea ondulada de DE y DF indica el sitio de enlace covalente a un anticuerpo o a un componente enlazador a anticuerpo, e independientemente en cada ubicación:

- R² se selecciona entre H y C₁-C₈ alquilo;
- R³ se selecciona entre H, C₁-C₈ alquilo, C₃-C₈ carbociclo, arilo, C₁-C₈ alquilo-arilo, C₁-C₈ alquilo-(C₃-C₈ carbociclo), C₃-C₈ heterociclo y C₁-C₈ alquilo-(C₃-C₈ heterociclo);
- R⁴ se selecciona entre H, C₁-C₈ alquilo, C₃-C₈ carbociclo, arilo, C₁-C₈ alquilo-arilo, C₁-C₈ alquilo-(C₃-C₈ carbociclo), C₃-C₈ heterociclo y C₁-C₈ alquilo-(C₃-C₈ heterociclo);
- R⁵ se selecciona entre H y metilo;

98

o R^4 y R^5 forman conjuntamente un anillo carbocíclico y tienen la fórmula $-(CR^aR^b)_n$ donde R^a y R^b se seleccionan independientemente entre H, C_1 - C_8 alquilo y C_3 - C_8 carbociclo, y n se selecciona entre 2, 3, 4, 5 y 6;

R^6 se selecciona entre H y C_1 - C_8 alquilo;

R^7 se selecciona entre H, C_1 - C_8 alquilo, C_3 - C_8 carbociclo, arilo, C_1 - C_8 alquilo-arilo, C_1 - C_8 alquilo- $(C_3$ - C_8 carbociclo), C_3 - C_8 heterociclo y C_1 - C_8 alquilo- $(C_3$ - C_8 heterociclo);

cada R^8 se selecciona independientemente entre H, OH, C_1 - C_8 alquilo, C_3 - C_8 carbociclo y O- $(C_1$ - C_8 alquilo);

R^9 se selecciona entre H y C_1 - C_8 alquilo;

R^{10} se selecciona entre arilo o C_3 - C_8 heterociclo;

Z es O, S, NH o NR^{12} , donde R^{12} es C_1 - C_8 alquilo;

R^{11} se selecciona entre H, C_1 - C_{20} alquilo, arilo, C_3 - C_8 heterociclo, $-(R^{13}O)_m$ - R^{14} , o $-(R^{13}O)_m$ -CH(R^{15})₂;

m es un número entero comprendido entre 1 y 1000;

R^{13} es C_2 - C_8 alquilo;

R^{14} es H o C_1 - C_8 alquilo;

cada R^{15} es independientemente H, COOH, $-(CH_2)_n$ -N(R^{16})₂, $-(CH_2)_n$ -SO₃H, o $-(CH_2)_n$ -SO₃- C_1 - C_8 alquilo;

cada R^{16} es independientemente H, C_1 - C_8 alquilo, o $-(CH_2)_n$ -COOH;

R^{18} se selecciona entre $-C(R^8)_2$ -C(R^8)₂-arilo, $-C(R^8)_2$ -C(R^8)₂-(C_3 - C_8 heterociclo), y $-C(R^8)_2$ -C(R^8)₂-(C_3 - C_8 carbociclo); y

m es un número entero comprendido entre 0 y 6.

En una forma de realización R^3 , R^4 y R^7 son independientemente isopropilo o sec-butilo y R^5 es -H o metilo. En una forma ejemplar de realización, R^3 y R^4 son isopropilo, R^5 es -H, y R^7 es sec-butilo.

En otra forma de realización, R^2 y R^6 son metilo y R^9 es -H.

En otra forma de realización, cada R^8 es -OCH₃.

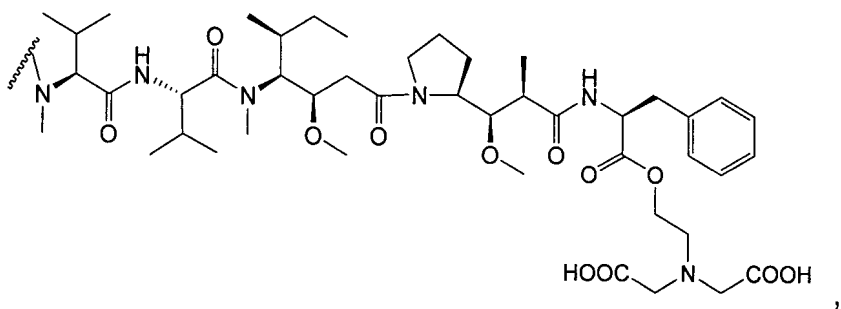
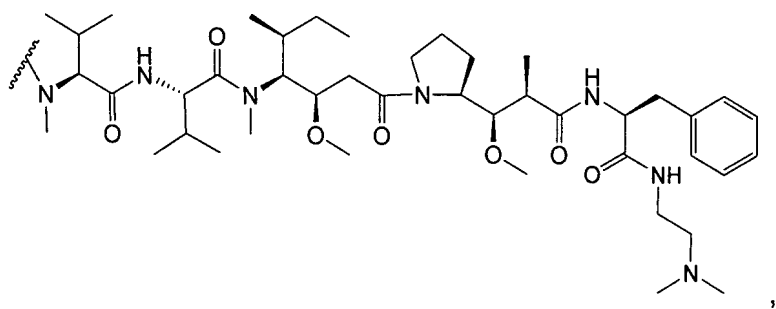
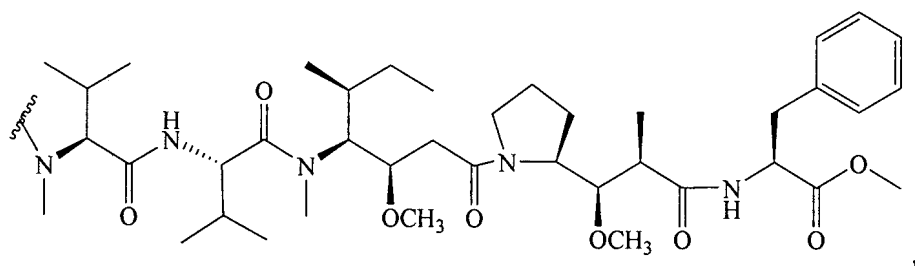
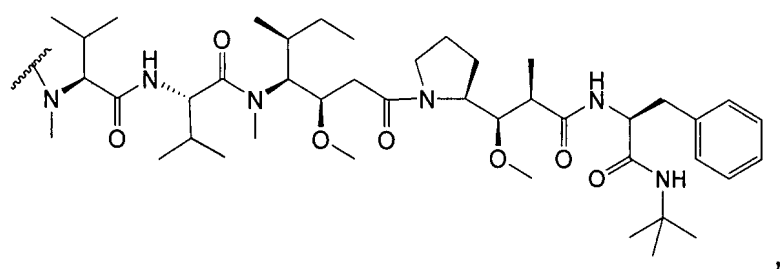
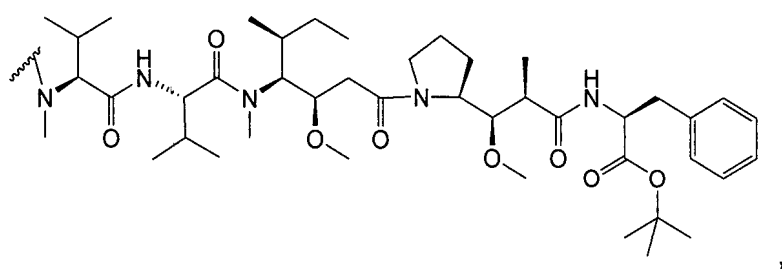
En una forma ejemplar de realización, R^3 y R^4 son isopropilo, R^2 y R^6 son metilo, R^5 es -H, R^7 es sec-butilo, cada R^8 es -OCH₃ y R^9 es -H.

En una forma de realización, Z es -O- o -NH-.

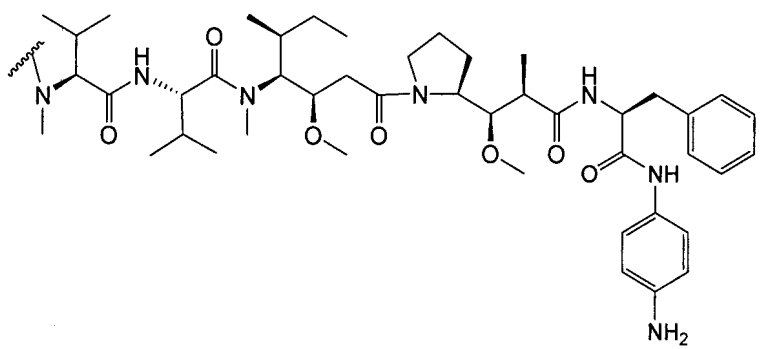
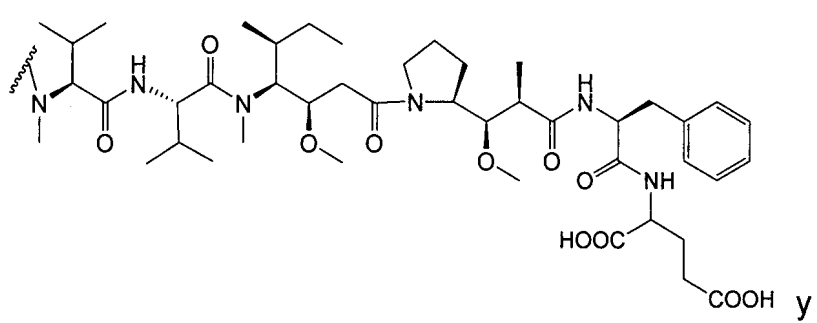
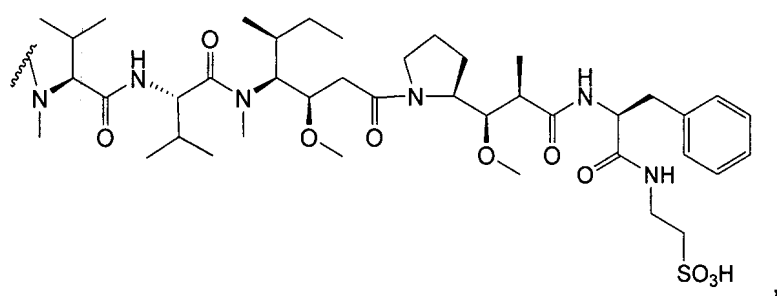
En una forma de realización, R^{10} es arilo.

En una forma ejemplar de realización, R^{10} es -fenilo.



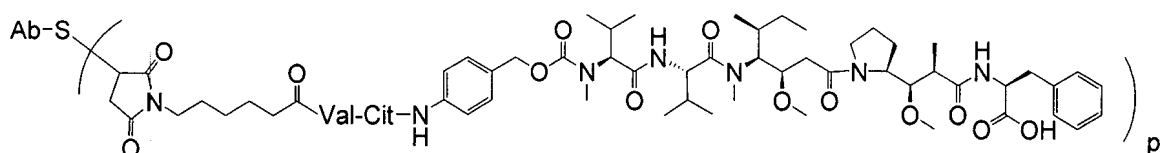


107

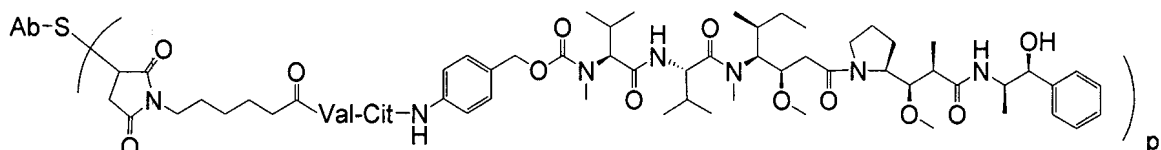


En un aspecto, los grupos hidrofílicos que incluyen, entre otros, ésteres de glicol trietileno (TEG), como se muestra anteriormente, se pueden unir a la fracción del fármaco en R^{11} . Sin unión mediante una teoría concreta, los grupos hidrofílicos ayudan a la internalización y no aglomeración de la fracción del fármaco.

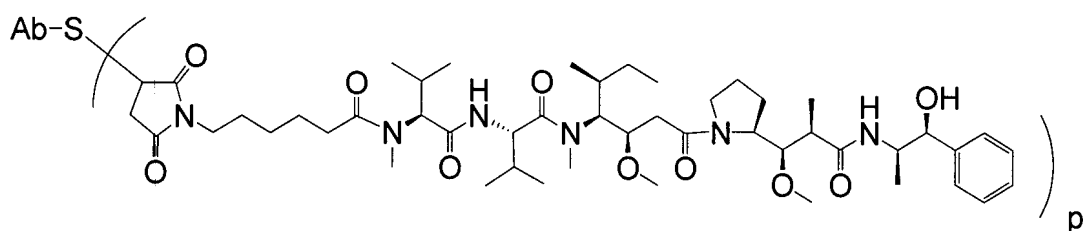
Las formas ejemplares de realización de los ADC de la Fórmula I que comprenden una auristatina/dolastatina o un derivado de la misma se describen en la patente de EE.UU. N.º 2005-0238649 A1 y en Doronina y col. (2006) *Bioconjugate Chem.* 17:114-124, que se incorpora expresamente en la presente memoria descriptiva a modo de referencia. Formas ejemplares de realización de los ADC de Fórmula I que comprenden MMAE o MMAF y diversos componentes enlazadores tienen las siguientes estructuras y abreviaturas (donde “Ab” es un anticuerpo; p está comprendido entre 1 y aproximadamente 8, “Val-Cit” es un dipéptido valina-citrulina; y “S” es un átomo de sulfuro).



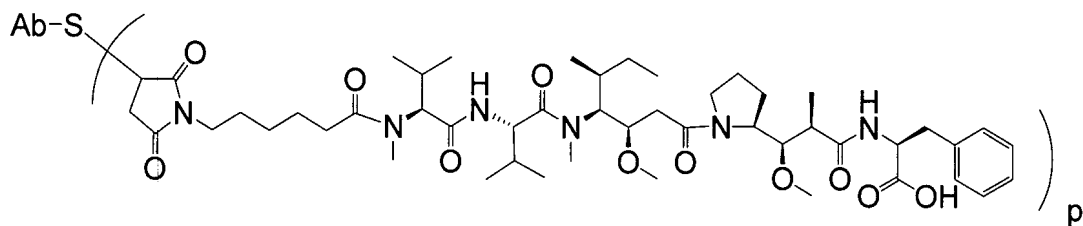
Ab-MC-vc-PAB-MMAF



Ab-MC-vc-PAB-MMAE



Ab-MC-MMAE



Ab-MC-MMAF

Las formas de realización ejemplares de los ADC de la Fórmula I que comprenden MMAF y varios componentes enlazadores incluyen, además, Ab-MC-PAB-MMAF y Ab-PAB-MMAF. Es interesante señalar que se ha demostrado que los inmunoconjugados que comprenden MMAF unido a un anticuerpo mediante un enlazador que no sea proteolíticamente escindible poseen una actividad similar a la de los inmunoconjugados que comprenden MMAF unido a un anticuerpo mediante un enlazador proteolíticamente escindible. Véase Doronina y col., (2006) *Bioconjugate Chem.* 17:114-124. En estas sustancias, se cree que la liberación del fármaco se efectúa mediante la degradación del anticuerpo en la célula. Id.

Por lo general, las porciones de fármacos basadas en péptidos pueden prepararse formando un enlace peptídico entre uno o más aminoácidos y/o fragmentos de péptidos. Estos enlaces peptídicos pueden prepararse, por

ejemplo, de acuerdo con el método de síntesis de fase líquida (véase E. Schröder y K. Lübke, “*The Peptides*”, volumen 1, págs. 76-136, 1965, Academic Press) que es bien conocido en el campo de la química de péptidos. Las fracciones de fármacos auristatina/dolastatina pueden prepararse de acuerdo con los métodos siguientes: patente de EE.UU. N.º 2005-0238649 A1; patente de EE.UU. N.º 5635483; patente de EE.UU. N.º 5780588; Pettit y col., (1989) *J. Am. Chem. Soc.* 111:5463-5465; Pettit y col., (1998) *Anti-Cancer Drug Design* 13:243-277; Pettit, G.R., y col., *Synthesis*, 1996, 719-725; Pettit y col., (1996) *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* 15:859-863; y Doronina (2003) *Nat. Biotechnol.* 21(7):778-784.

En concreto, las fracciones de fármacos auristatina/dolastatina de la fórmula D_F, como MMAF y derivados de la misma, se pueden preparar usando métodos descritos en la patente de EE.UU. N.º 2005-0238649 A1 y Doronina et al. (2006) *Bioconjugate Chem.* 17:114-124. Las fracciones de fármacos auristatina/dolastatina de la fórmula D_E, como MMAE y derivados de las mismas, se pueden preparar usando métodos descritos en Doronina et al. (2003) *Nat. Biotech.* 21:778-784. Las fracciones del enlazador a fármacos MC-MMAF, MC-MMAE, MC-vc-PAB-MMAF y MC-vc-PAB-MMAE se pueden sintetizar convenientemente mediante métodos habituales, por ejemplo, como se describe en Doronina y col., (2003) *Nat. Biotech.* 21:778-784, y la publicación de la Solicitud de patente de EE.UU. N.º 2005/0238649 A1, y, luego conjugar con un anticuerpo de interés.

Concentración del fármaco

La concentración del fármaco se representa mediante p y es el promedio de fracciones de fármaco por anticuerpo en una molécula de la Fórmula I. La concentración del fármaco puede oscilar entre 1 y 20 fracciones de fármaco (D) por anticuerpo. Los ADC de la Fórmula I incluyen conjuntos de anticuerpos conjugados con una variedad de fracciones de fármaco, de 1 a 20. El promedio de fracciones de fármaco por anticuerpo en preparaciones de ADC procedentes de reacciones de la conjugación se puede determinar mediante medios convencionales, como espectroscopia de masas, ensayo ELISA y HPLC. También se puede determinar la distribución cuantitativa de ADC en función de p. En algunos ejemplos, la separación, purificación y determinación del ADC homogéneo, donde p es un valor determinado de ADC con otras concentraciones de fármaco se puede lograr por métodos como HPLC de fase reversa o electroforesis.

En el caso de algunos conjugados de anticuerpos con fármacos, p puede verse limitado por el número de sitios de unión en el anticuerpo. Por ejemplo, cuando la unión es un tiol de la cisteína, como en las formas de realización ejemplares anteriores, puede que un anticuerpo sólo tenga uno o varios grupos tiol de la cisteína, o puede tener sólo uno o varios grupos tiol suficientemente reactivos a través de los cuales se puede unir un enlazador. En algunas formas de realización, una concentración más alta de fármaco, por ejemplo, $p > 5$, puede causar agregación, insolubilidad, toxicidad o pérdida de permeabilidad celular de determinados conjugados de anticuerpos con fármacos. En ciertas formas de realización, la concentración de fármaco para un ADC de la invención oscila entre 1 y aproximadamente 8; entre aproximadamente 2 y aproximadamente 6; entre aproximadamente 3 y aproximadamente 5; entre aproximadamente 3 y aproximadamente 4; entre aproximadamente 3,1 y aproximadamente 3,9; entre aproximadamente 3,2 y aproximadamente 3,8; entre aproximadamente 3,2 y aproximadamente 3,7; entre aproximadamente 3,2 y aproximadamente 3,6; entre aproximadamente 3,3 y aproximadamente 3,8; entre aproximadamente 3,3 y aproximadamente 3,7. De hecho, se ha demostrado que para determinados ADC, la proporción óptima de fracciones de fármaco por anticuerpo puede ser inferior a 8 y puede estar entre 2 y aproximadamente 5. Véase la patente de EE.UU. N.º 2005-0238649 A1 (íntegramente incorporada en la presente memoria descriptiva a modo de referencia).

En ciertas formas de realización, un número menor al máximo teórico de fracciones de fármacos se conjuga con un anticuerpo durante una reacción de conjugación. Un anticuerpo puede contener, por ejemplo, residuos de lisina que no reaccionan con el enlazador a fármaco intermedio o el reactivo del enlazador, como se señala más adelante. Solamente los grupos de lisina más reactivos pueden reaccionar con un reactivo enlazador de aminos. Por lo general, los anticuerpos no contienen muchos grupos tioles de cisteína libres y reactivos que se puedan unir a una fracción de fármaco; de hecho, la mayoría de los residuos tiol de cisteína en anticuerpos están en forma de puentes disulfuro. En ciertas formas de realización, un anticuerpo se puede reducir con un agente reductor como ditioneitol (DTT) o tricarboniletilfosfina (TCEP), en condiciones totales o parciales de reducción, para generar grupos tiol de cisteína reactivos. En ciertas formas de realización, un anticuerpo está sujeto a condiciones desnaturalizantes para revelar grupos nucleofílicos reactivos como lisina o cisteína.

La concentración (proporción fármaco/anticuerpo) de un ADC se puede controlar de distintas formas, por ejemplo: (i) al limitar el exceso molar del enlazador a fármaco intermedio o reactivo enlazador del anticuerpo, (ii) al limitar el tiempo o la temperatura de reacción de la conjugación y (iii) mediante condiciones de reducción parciales o limitadas para la modificación del tiol de la cisteína, (iv) al generar mediante técnicas recombinantes la secuencia de aminoácido del anticuerpo de manera tal que el número y la posición de los residuos de cisteína se modifique gracias al control del número y/o posición de las uniones de enlazador-fármaco (por ejemplo, thioMab o thioFab preparado como se describe en la presente memoria descriptiva y en el documento WO2006/034488 (íntegramente incorporado en la presente memoria descriptiva a modo de referencia)).

Hay que comprender que, cuando más de un grupo nucleofílico reacciona con un enlazador a fármaco intermedio o a un reactivo enlazador seguido por el reactivo de la fracción del fármaco, el producto resultante es una mezcla de compuestos de ADC con una distribución de una o más fracciones de fármaco unidas a un anticuerpo. El promedio de fármacos por anticuerpo se puede calcular a partir de la mezcla mediante un ensayo ELISA dual con anticuerpos, que sea específico para el anticuerpo y específico para el fármaco. Las moléculas de ADC individuales se pueden identificar en la mezcla mediante espectroscopia de masas y separar mediante HPLC, por ejemplo, cromatografía de interacción hidrófoba (véase, por ejemplo, Hamblett, K.J., y col., *Effect of drug loading on the pharmacology, pharmacokinetics, and toxicity of an anti-CD30 antibody-drug conjugate*, Abstract No. 624, American Association for Cancer Research, 2004 Annual Meeting, March 27-31, 2004, Proceedings of the AACR, Volume 45, March 2004; Alley, S.C., y col., *Controlling the location of drug attachment in antibody-drug conjugates*, Abstract No. 627, American Association for Cancer Research, 2004 Annual Meeting, March 27-31, 2004, Proceedings of the AACR, Volume 45, March 2004). En ciertas formas de realización, un ADC homogéneo con un único valor de concentración se puede aislar de la mezcla de la conjugación mediante electroforesis o cromatografía.

Algunos métodos de preparación de inmunoconjugados

Un ADC de la formula I se pueden preparar por varios medios, empleando reacciones químicas orgánicas, condiciones y reactivos conocidos por los expertos, como: (1) una reacción de un grupo nucleofílico de un anticuerpo con

un agente enlazador bivalente, para formar un Ab-L, mediante una unión bivalente, seguida de la reacción con una fracción del fármaco D; y (2) una reacción de un grupo nucleofílico de una fracción del fármaco con un reactivo enlazador bivalente, para formar D-L, mediante un enlace covalente, seguido de la reacción con un grupo nucleofílico del anticuerpo. Los métodos ejemplares de preparación de un ADC de la Fórmula I por medio de la última vía se describen en la patente de EE.UU. N.º 20050238649 A1, que se incorpora expresamente a la presente memoria descriptiva a modo de referencia.

Los grupos nucleofílicos en los anticuerpos incluyen entre otros: (i) grupos amino N-terminal, (ii) grupos amino de la cadena lateral, por ejemplo lisina, (iii) grupos tiol de la cadena lateral, por ejemplo cisteína y (iv) grupos amino o hidroxilo de azúcares donde el anticuerpo es glicosilado. Los grupos amino, tiol e hidroxilo son nucleofílicos y son capaces de reaccionar para formar uniones covalentes con grupos electrofílicos en las fracciones del enlazador y los reactivos enlazadores, que incluyen: (i) ésteres activos como los ésteres NHS, los ésteres HOBt, haloformos y haluro de ácido; (ii) haluros de alquilo y bencilo como las haloacetamidas; (iii) aldehídos, cetonas, carboxilo y grupos maleimidos. Ciertos anticuerpos contienen bisulfuros de intercadena reducible, es decir, puentes de cisteína. Se puede hacer que los anticuerpos sean reactivos para la conjugación con reactivos del enlazador mediante tratamiento con un agente reductor como DTT (ditiotreitól) o tricarboniletilfosfina (TCEP), de forma que el anticuerpo quede total o parcialmente reducido. Por lo tanto, cada puente de cisteína formará, en teoría, dos nucleófilos tiol reactivos. De manera alternativa, los grupos sulfidrilos adicionales pueden introducirse en los anticuerpos a través de la modificación de los residuos de lisina, por ejemplo, mediante reacción de residuos de lisina con 2-iminotiolano (reactivo de Traut) lo que da lugar a la conversión de una amina en un tiol. Los grupos tiol reactivos pueden introducirse en un anticuerpo mediante la introducción de uno, dos, tres, cuatro o mas residuos de cisteína (por ejemplo, preparando variantes de anticuerpos que comprendan uno o más residuos de aminoácidos de cisteínas no nativas).

Los conjugados de anticuerpos con fármacos de la invención también se pueden producir mediante reacción entre un grupo electrofílico en un anticuerpo, como un grupo carbonilo cetona o aldehído, con un grupo nucleofílico en un fármaco o reactivo enlazador. Entre los grupos nucleofílicos útiles en un reactivo enlazador están hidracida, oxima, amina, hidrazina, tiosemicarbazona, carboxilato

de hidrazina y arilhidrazida. En una forma de realización, un anticuerpo se modifica para introducir fracciones electrofílicas que puedan reaccionar con sustituyentes nucleofílicos en el fármaco o reactivo enlazador. En otra forma de realización, los azúcares de los anticuerpos glicosilados pueden oxidarse, por ejemplo, con reactivos oxidantes de periodato, a fin de formar grupos cetonas o aldehídos, los cuales pueden reaccionar con el grupo amina de los reactivos enlazadores o las fracciones del fármaco. Los grupos resultantes de amina base de Schiff pueden formar un enlace estable, o pueden reducirse, por ejemplo, mediante los reactivos de hidruro de boro para formar enlaces amina estables. En una forma de realización, la reacción de la porción carbohidratada de un anticuerpo glicosilado, ya sea con galactosa oxidasa o con metaperiodato de sodio, puede producir grupos de carbonilo (aldehídos y cetonas) en el anticuerpo que pueden reaccionar con los grupos apropiados en el fármaco (técnicas de bioconjugado de Hermanson). En otra forma de realización, los anticuerpos que contienen residuos de serina o treonina N-terminal pueden reaccionar con metaperiodato de sodio, lo que da lugar a la producción de un aldehído en lugar del primer aminoácido (Geoghegan y Stroh, (1992) *Bioconjugate Chem.* 3:138-146; patente de EE.UU. N.º 5362852). Este aldehído se puede hacer que reaccione con un fragmento de fármaco o un nucleófilo enlazador.

Los grupos nucleofílicos en una fracción del fármaco incluyen los siguientes compuestos: los grupos amino, tiol, hidroxilo, hidracida, oxima, hidracina, tiosemicarbazona, carboxilato de hidracina y aril-hidracida, capaces de reaccionar para formar enlaces covalentes con grupos electrofílicos en las fracciones enlazadoras y reactivos enlazadores, que incluyen: (i) ésteres activos como los ésteres NHS, los ésteres HOBt, haloformos y haluro de ácido; (ii) haluros de alquilo y bencilo como las haloacetamidas; (iii) aldehídos, cetonas, carboxilo y grupos maleimidos.

Los compuestos de la invención contemplan expresamente el ADC preparado con los reactivos reticulares siguientes: BMPS, EMCS, GMBS, HBVS, LC-SMCC, MBS, MPBH, SBAP, SIA, SIAB, SMCC, SMPB, SMPH, sulfo-EMCS, sulfo-GMBS, sulfo-KMUS, sulfo-MBS, sulfo-SIAB, sulfo-SMCC y sulfo-SMPB y SVSB (succinimidil-(4-vinilsulfona)benzoata) que está comercializado (por ejemplo, por Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL., EE.UU; véanse páginas 467-498, 2003-2004 Applications Handbook and Catalog).

Los inmunoconjugados que comprenden un anticuerpo y un agente citotóxico se pueden también realizar utilizando una variedad de agentes de unión a proteína bifuncionales como por ejemplo N-succinimidil-3-(2-piridilditio) propionato (SPDP), succinimidil-4-(N-maleimidometil) ciclohexano-1-carboxilato (SMCC), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (como el dimetiladipimidato HCl), ésteres activos (por ejemplo, disuccinimidil suberato), aldehídos (por ejemplo, glutaraldehídos), compuestos bis-azido (como bis (p-azidobenzoil) hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (como bis-(p-diazoniobenzoil)-etilenodiamina), diisocianatos (por ejemplo, 2,6-diisocianato de tolueno) y compuestos bis-activos de fluoruro (como 1,5-difluoruro-2,4-dinitrobenceno). Por ejemplo, una inmunotoxina de ricina se puede preparar tal y como se describe en Vitetta y col., *Science*, 238:1098 (1987). El ácido triaminopentaacético 1-isotiocianatobencil-3-metildietileno marcado con carbono 14 (MX-DTPA) es un ejemplo de agente quelante para la conjugación de un radionucleótido a un anticuerpo. Véase el documento WO94/11026.

Alternativamente, se puede realizar una fusión de proteínas que contengan un anticuerpo y un agente citotóxico, por ejemplo, mediante técnicas recombinantes o síntesis de péptidos. Una molécula de ADN recombinante puede incluir regiones que codifiquen el anticuerpo y las porciones citotóxicas del conjugado, ya sea adyacente uno a otro o en forma separada por una región que codifica un péptido de enlace, el cual no destruye las propiedades deseadas del conjugado.

En otra forma de realización, un anticuerpo puede conjugarse con un "receptor" (como la estreptavidina) y actuar previamente contra el tumor, donde se administra al paciente el conjugado receptor del anticuerpo, luego, se elimina de la circulación el conjugado no unido, utilizando un agente de eliminación, y posteriormente se administra un "ligando" (por ejemplo, la avidina) que se conjuga con un agente citotóxico (por ejemplo, un radionucleótido).

2. Inmunoconjugados ejemplares – Conjugados de anticuerpo con fármacos

Preparación de anticuerpos anti-CD22 diseñados con cisteína

El ADN que codifica una variante de la secuencia de aminoácidos de los anticuerpos CD22 diseñados con cisteína y anticuerpos anti-CD22 parentales de la invención se prepara mediante diversos métodos, entre los cuáles se encuentra el aislamiento de una fuente natural (en el caso de variantes de la

secuencia de los aminoácidos), preparación por mutagénesis dirigida al lugar (o mediada por oligonucleótido) (Carter (1985) y col., *Acids Res.* 13:4431-4443; Ho y col., (1989) *Gene* (Amst.) 77:51-59; Kunkel y col., (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:488; Liu y col., (1998) *J. Biol. Chem.* 273:20252-20260), *PCR mutagénesis* (Higuchi, (1990) en *PCR Protocols*, págs. 177-183, Academic Press; Ito y col., (1991) *Gene* 102:67-70; Bernhard y col., (1994) *Bioconjugate Chem.* 5:126-132; y Vallette y col., (1989) *Nuc. Acids Res.* 17:723-733), y mutagénesis por inserción de un casete (Wells y col., (1985) *Gene* 34:315-323) de un ADN preparado anteriormente que codifica el polipéptido. Los protocolos de mutagénesis, kits y reactivos se encuentran comercialmente disponibles, por ejemplo, Kit de mutagénesis dirigido a múltiples sitios QuikChange® (Stratagene, La Jolla, CA). Las mutaciones individuales también se generan mediante mutagénesis dirigida por oligonucleótido utilizando plásmidos de ADN de doble cadena como una plantilla mediante mutagénesis basada en PCR (Sambrook y Russel, (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3ª edición; Zoller y col., (1983) *Methods Enzymol.* 100:468-500; Zoller, M.J. y Smith, M. (1982) *Nucl. Acids Res.* 10:6487-6500). También se pueden construir variantes de anticuerpos recombinantes mediante la manipulación de un fragmento de restricción o mediante PCR-extensión solapada con oligonucleótidos sintéticos. Los cebadores mutagénicos codifican la(s) sustitución(es) de codones de cisteína. Se pueden utilizar técnicas de mutagénesis estándar para generar ADN que codifique dichos anticuerpos diseñados con cisteína mutante (Sambrook y col., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989; y Ausubel y col., *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing y Wiley-Interscience, New York, N.Y., 1993).

Se puede utilizar la tecnología de presentación en fagos (McCafferty y col., (1990) *Nature* 348:552-553) para producir anticuerpos humanos anti-CD22 y fragmentos de anticuerpos *in vitro*, del repertorio de genes de dominios variables (V) de inmunoglobulina de donantes no inmunizados. De acuerdo con esta técnica, los genes de dominios V de los anticuerpos se clonan en pauta de lectura con un gen proteico con revestimiento mayor o menor de un bacteriófago filamentoso, como el M13 o fd, y se presentan como fragmentos de anticuerpos funcionales en la superficie de la partícula del fago. Debido a que la partícula filamentosa contiene una copia del ADN monocatenario del genoma del fago, las

selecciones que se basan en las propiedades funcionales del anticuerpo también conducen a la selección del gen que codifica el anticuerpo que exhibe esas propiedades. Por lo tanto, el fago imita algunas de las propiedades de las células B (Johnson y col., (1993) *Current Opinion in Structural Biology* 3:564-571; Clackson y col., (1991) *Nature*, 352:624-628; Marks y col., (1991) *J. Mol. Biol.* 222:581-597; Griffith y col., (1993) *EMBO J.* 12:725-734; patente de EE.UU. N.º 5565332; patente de EE.UU. N.º 5573905; patente de EE.UU. N.º 5567610; patente de EE.UU. N.º 5229275).

Los anticuerpos anti-CD22 se pueden sintetizar químicamente utilizando metodología de síntesis de oligopéptidos conocida o se pueden preparar y purificar mediante tecnología recombinante. Se puede producir una secuencia de aminoácidos apropiada, o partes de la misma, mediante síntesis directa de péptidos utilizando técnicas de fase sólida (Steward y col., *Solid-Phase Peptide Synthesis*, (1969) W.H. Freeman Co., San Francisco, CA; Merrifield, (1963) *J. Am. Chem. Soc.*, 85:2149-2154). La síntesis de proteínas *in vitro* se puede realizar utilizando técnicas manuales o mediante automatización. La síntesis automatizada durante la fase sólida se puede lograr, por ejemplo, empleando aminoácidos protegidos con t-BOC o Fmoc y utilizando un sintetizador de péptidos de Applied Biosystems (Foster City, CA) siguiendo las instrucciones el fabricante. Diversas porciones del anticuerpo anti-CD22 o el polipéptido CD22 se pueden sintetizar químicamente de manera separada y combinar utilizando métodos químicos o enzimáticos para producir el anticuerpo anti-CD22 o el polipéptido CD22 deseados.

Se han desarrollado varias técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpos. Tradicionalmente, estos fragmentos se obtenían mediante digestión proteolítica de anticuerpos intactos (Morimoto y col., (1992) *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 24:107-117; y Brennan y col., *Science*, 229:81), o se producían directamente mediante células huésped recombinantes. Los fragmentos de anticuerpos anti-CD22 Fab, Fv y ScFv pueden expresarse todos en *E. coli* y secretarse a partir de *E. coli*, lo que permite la fácil producción de grandes cantidades de estos fragmentos. Los fragmentos de anticuerpos se pueden aislar de las bibliotecas de fagos descritas en la presente memoria descriptiva. Como alternativa, los fragmentos Fab'-SH pueden recuperarse directamente de *E. coli* y unirse químicamente para formar fragmentos F(ab')₂ (Carter y col., (1992) *Bio/Technology* 10:163-167) o se pueden aislar directamente de cultivos de

células huésped recombinantes. Los anticuerpos anti-CD22 pueden ser un fragmento Fv de cadena única (scFv) (documento WO 93/16185; patente de EE.UU. N.º 5571894; patente de EE.UU. N.º 5587458). El fragmento del anticuerpo anti-CD22 también puede ser un “anticuerpo lineal” (patente de EE.UU. N.º 5641870). Estos fragmentos de anticuerpos lineales pueden ser monoespecíficos o biespecíficos.

La siguiente descripción está relacionada principalmente con la producción de anticuerpos anti-CD22 mediante células de cultivo transformadas o transfectadas con un vector que contiene ácido nucleico que codifica el anticuerpo anti-CD22. Se pueden obtener anticuerpos anti-CD22 que codifican el ADN de una biblioteca de ADNc preparada con tejido que se cree que posee el ARNm del anticuerpo anti-CD22 y que lo expresa a un nivel detectable. Por consiguiente, el anticuerpo anti-CD22 humano o el ADN del polipéptido CD22 se pueden obtener fácilmente de una biblioteca de ADNc preparada a partir de tejido humano. El gen que codifica el anticuerpo anti-CD22 también se puede obtener de una biblioteca genómica o mediante los procedimientos sintéticos conocidos (por ejemplo, síntesis automatizada del ácido nucleico).

Los métodos de diseño, selección y preparación de la invención permiten la creación de anticuerpos anti-CD22 diseñados con cisteína que reaccionan con funcionalidad electrofílica. Estos métodos además permiten compuestos de conjugados de anticuerpos tales como compuestos de conjugados de anticuerpos con fármacos (ADC) con moléculas de fármaco en puntos designados, diseñados y selectivos. Los residuos reactivos de cisteína en la superficie de un anticuerpo permiten específicamente conjugar una fracción del fármaco utilizando un grupo tiol reactivo, por ejemplo, maleimida o haloacetil. La reactividad nucleofílica de la funcionalidad tiol de un residuo cys con un grupo maleimido es aproximadamente 1000 veces mayor en comparación con cualquier otra funcionalidad aminoácida en una proteína, como por ejemplo, el grupo amino de residuos de lisina o el grupo amino N-terminal. La funcionalidad tiol específica en los reactivos iodoacétiles y maleimidos puede reaccionar con grupos aminos, sin embargo, se requieren tiempos de reacción mayores a pH (>9,0) y más prolongados (Garman, 1997, *Non-Radioactive Labelling: A Practical Approach*, Academic Press, London). Se puede calcular la cantidad de tiol libre en una proteína mediante la prueba estándar de Ellman. La inmunoglobulina M es un ejemplo de un pentámero con enlazador disulfuro, mientras que la inmunoglobulina G es un ejemplo de una

proteína con puentes disulfuros internos que unen las subunidades. En proteínas como ésta, se requiere la reducción de las uniones disulfuro con un reactivo como ditioneitol (DTT) o selenol (Singh y col., (2002) *Anal. Biochem.* 304:147-156) para generar el tiol libre reactivo. Este método puede producir pérdida de la estructura terciaria del anticuerpo o especificidad de unión a antígeno.

El ensayo Pheselector (ELISA de fagos para seleccionar tioles reactivos) permite la detección de grupos de cisteína reactivos en anticuerpos en un formato de ELISA de fagos, ayudando de este modo en el diseño de los anticuerpos diseñados con cisteína (documento WO 2006/034488). El anticuerpo diseñado con cisteína se recubre en las superficies de los pocillos, seguido de incubación con partículas del fago, adición del anticuerpo secundario marcado con HRP y detección de la absorbencia. Las proteínas mutantes que reproducen en imágenes de fagos se pueden monitorear de manera rápida y sólida, y con un alto rendimiento. Las bibliotecas de anticuerpos diseñados con cisteína se pueden producir y estar sujetas a selección de unión utilizando el mismo método para diferenciar de forma apropiada los puntos reactivos de incorporación libre de Cys de bibliotecas aleatorias de proteínas-fagos de anticuerpos u otras proteínas. Esta técnica incluye proteínas mutantes que reaccionan con cisteína representadas en fagos con un reactivo de afinidad o un grupo indicador que también es reactivo del tiol.

El ensayo PHESELECTOR permite detectar grupos tiol reactivos en anticuerpos. Un ejemplo de este método es la identificación de la variante A121C. Se puede buscar eficazmente la molécula completa de Fab para identificar más variantes de ThioFab con grupos tiol reactivos. Se empleó un parámetro, área superficial accesible, para identificar y cuantificar la accesibilidad del solvente a los residuos de aminoácidos en un polipéptido. El área superficial accesible puede expresarse como la superficie ($\text{\AA}^2$) que puede entrar en contacto con una molécula disolvente, por ejemplo, agua. El espacio ocupado por el agua es aproximadamente como una esfera con un radio de 1,4 $\text{\AA}$. El software está disponible libremente o se puede adquirir mediante licencia (Secretaría CCP4, Daresbury Laboratory, Warrington, WA4 4AD, Reino Unido, Fax: (+44) 1925 603825, o por Internet: www.ccp4.ab.uk/dist/html/INDEX.html) como el CCP4 Suite de programas de cristalografía que utiliza algoritmos para calcular el área superficial accesible de cada aminoácido de un proteína con coordenadas conocidas derivadas de la cristalografía de rayos X ("The CCP4 Suite: Programs

for Protein Crystallography" (1994) *Acta. Cryst.* D50:760-763). Dos módulos ejemplares de software que realizan cálculos del área superficial accesible son "AREAIMOL" y "SURFACE", basados en los algoritmos de B. Lee y F.M. Richards (1971) *J. Mol. Biol.* 55:379-400. AREAIMOL define el área superficial accesible al solvente de una proteína como el locus del centro de una esfera de prueba (que representa una molécula de solvente) mientras que rueda sobre la superficie Van der Waals de la proteína. AREAIMOL calcula el área superficial accesible del solvente generando puntos superficiales en una esfera extendida sobre cada átomo (a una distancia del centro del átomo igual a la suma del átomo y los radios de la prueba) y eliminando los que se encuentran dentro de las esferas equivalentes asociadas a átomos adyacentes. AREAIMOL define el área superficial accesible al solvente de átomos en un archivo PDB coordinado y resume el área a la que puede acceder el residuo, la cadena y la molécula en su totalidad. Las áreas accesibles (o diferencias del área) para átomos individuales se pueden escribir en un archivo de salida pseudo-PDB. AREAIMOL asume un único radio para cada elemento y sólo reconoce un número limitado de elementos diferentes.

AREAIMOL y SURFACE brindan información sobre áreas accesibles absolutas; es decir, el número de Angstroms cuadrados (Å). El área superficial accesible se calcula mediante referencia a un estado estándar relevante para un aminoácido dentro de un polipéptido. El estado de referencia es el tripéptido Gly-X-Gly, donde X es el aminoácido de interés y el estado de referencia debe ser una conformación "extendida"; es decir, como las que se encuentran en cadenas beta. La conformación extendida maximiza la accesibilidad de X. Un área accesible calculada se divide por el área accesible en un estado de referencia de un tripéptido Gly-X-Gly y brinda el cociente, que es la accesibilidad al área superficial. El porcentaje de accesibilidad es igual a la accesibilidad al área superficial multiplicado por 100. Otro algoritmo ejemplar para calcular la accesibilidad al área superficial se basa en el módulo SOLV del programa xsae (Broker, C., F. Hoffman-LaRoche, Basel), que calcula la accesibilidad al área superficial de un residuo de aminoácido a una esfera de agua basada en coordenadas de rayos X de un polipéptido. El área superficial accesible para cada aminoácido en un anticuerpo se puede calcular utilizando información disponible sobre la estructura del cristal (Eigenbrot y col., (1993) *J Mol Biol.* 229:969-995).

Se aísla el ADN que codifica los anticuerpos diseñados con cisteína y se secuencia utilizando procedimientos convencionales (por ejemplo, usando sondas oligonucleotídicas capaces de unirse específicamente a los genes que codifican las cadenas pesadas y ligeras de anticuerpos murinos). Las células de hibridoma sirven como fuente de dicho ADN. Una vez aislado, el ADN se puede colocar en vectores de expresión, que después se transfectan en células huésped como por ejemplo células *E. coli*, células COS de monos, células de ovario de hámster chino (CHO) u otras células huésped de mamíferos, tales como células de mieloma (patente de EE.UU. N.º 5807715; patente de EE.UU. N.º 2005/0048572; patente de EE.UU. N.º 2004/0229310) que, de otro modo, no producen la proteína del anticuerpo, para obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales en las células huésped recombinantes.

Luego del diseño y la selección, los anticuerpos diseñados con cisteína, por ejemplo, ThioFabs diseñados con los residuos de Cys altamente reactivos e independientes, se pueden reproducir por: (i) expresión en un sistema bacteriano, por ejemplo, *E. coli* (Skerra y col., (1993) *Curr. Opinion in Immunol.* 5:256-262; Plückthun (1992) *Immunol. Revs.* 130:151-188) o un sistema de cultivo de células de mamíferos (documento WO 01/00245), por ejemplo, células de ovario de hámster chino (CHO); y (ii) purificación utilizando técnicas comunes de purificación de proteína (Lowman y col., (1991) *J. Biol. Chem.* 266(17):10982-10988).

Los grupos tiol de cisteína diseñada reaccionan con reactivos enlazadores electrofílicos y enlazadores a fármaco intermedios para formar conjugados de anticuerpos diseñados con cisteína con fármacos y otros anticuerpos marcados diseñados con cisteína. Los residuos de cisteína de los anticuerpos diseñados con cisteína, y que se encuentran en los anticuerpos parentales, que están emparejados y forman enlaces disulfuros de la intercadena e intracadena, no tienen ningún grupo tiol reactivo (a menos que se traten con un agente reductor) y no reaccionan con reactivos enlazadores electrofílicos o enlazadores a fármaco intermedios. El residuo de cisteína recientemente diseñado puede seguir siendo independiente y reaccionar con, es decir, conjugarse a, un reactivo enlazador electrofílico o un enlazador a fármaco intermedio, tal como un fármaco-maleimida. Entre los enlazadores a fármaco intermedios se encuentran: MC-MMAE, MC-MMAF, MC-vc-PAB-MMAE y MC-vc-PAB-MMAF. Las posiciones de estructura de los residuos diseñados con cisteína de las cadenas pesadas y ligeras se

enumeran de acuerdo con un sistema de numeración secuencial. Este sistema de numeración secuencial se relaciona con el sistema de numeración de Kabat (Kabat y col., (1991) *Sequences of Proteins of Immunologicla Interest*, 5th Ed, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD) que comienza en el extremo N-terminal, pero se diferencia del esquema de numeración de Kabat (fila inferior) mediante inserciones marcadas con a, b, c. Utilizando el sistema de numeración Kabat, la secuencia lineal real de aminoácidos puede contener menos aminoácidos o aminoácidos adicionales que correspondan a un acortamiento de una FR o CDR del domino variable o a una inserción en ellas. Los diferentes puntos de la cadena pesada diseñada con cisteína se identifican mediante los esquemas de numeración secuencial y de numeración de Kabat.

En una forma de realización, el anticuerpo anti-CD22 diseñado con cisteína se prepara mediante un proceso que comprende:

- (a) sustitución de uno o más residuos de aminoácidos de un anticuerpo anti-CD22 parental por cisteína; y
- (b) determinación de la reactividad del tiol del anticuerpo anti-CD22 diseñado con cisteína mediante la reacción de dicho anticuerpo con un reactivo del tiol.

El anticuerpo diseñado con cisteína puede ser más reactivo que el anticuerpo parental con el reactivo del tiol.

Los residuos de aminoácidos sin cisteína pueden situarse en las cadenas pesada o ligera, o en los dominios constante o variable. Los fragmentos de anticuerpos, por ejemplo, Fab, también pueden diseñarse con uno o más aminoácidos con cisteína que reemplacen los aminoácidos del fragmento del anticuerpo para formar fragmentos del anticuerpo diseñados con cisteína.

Otra forma de realización de la invención proporciona un método de preparación (realización) de un anticuerpo anti-CD22 diseñado con cisteína, que comprende:

- (a) introducción de uno o más aminoácidos con cisteína en un anticuerpo anti-CD22 parental para generar el anticuerpo anti-CD22 diseñado con cisteína; y
- (b) determinación de la reactividad del tiol del anticuerpo diseñado con cisteína con un reactivo del tiol;

donde el anticuerpo diseñado con cisteína es más reactivo que el anticuerpo parental con el reactivo del tiol.

El paso (a) del método de preparación de un anticuerpo diseñado con cisteína puede comprender:

- (i) mutagenización de una secuencia de ácido nucleico que codifica el anticuerpo diseñado con cisteína;
- (ii) expresión del anticuerpo diseñado con cisteína; y
- (iii) aislamiento y purificación del anticuerpo diseñado con cisteína.

El paso (b) del método de preparación de un anticuerpo diseñado con cisteína puede comprender la expresión de dicho anticuerpo en una partícula de virus seleccionada de un fago o una partícula fagémida.

El paso (b) del método de preparación de un anticuerpo diseñado con cisteína también puede comprender:

- (i) reacción del anticuerpo diseñado con cisteína con un reactivo de afinidad del tiol para generar un anticuerpo diseñado con cisteína y marcado por afinidad; y
- (ii) medición de la unión del anticuerpo diseñado con cisteína y marcado por afinidad a un medio de captura.

Otra forma de realización de la invención es un método de monitoreo de anticuerpos diseñados con cisteína con aminoácidos con cisteína altamente reactivos e independientes para determinar la reactividad del tiol. Este método comprende:

- (a) introducción de uno o más aminoácidos con cisteína en un anticuerpo parental para generar un anticuerpo diseñado con cisteína;
- (b) reacción del anticuerpo diseñado con cisteína con un reactivo de afinidad del tiol para generar un anticuerpo diseñado con cisteína y marcado por afinidad; y
- (c) medición de la unión del anticuerpo diseñado con cisteína y marcado por afinidad a un medio de captura; y
- (d) determinación de la reactividad del tiol del anticuerpo diseñado con cisteína con el reactivo del tiol.

El paso (a) del método de monitoreo de un anticuerpo diseñado con cisteína puede comprender:

- (i) mutagenización de una secuencia de ácido nucleico que codifica el anticuerpo diseñado con cisteína;
- (ii) expresión del anticuerpo diseñado con cisteína; y
- (iii) aislamiento y purificación del anticuerpo diseñado con cisteína.

El paso (b) del método de monitoreo de anticuerpos diseñados con cisteína puede comprender la expresión del anticuerpo diseñado con cisteína en una partícula de virus seleccionada de un fago o una partícula fagémida.

El paso (b) del método de monitoreo de un anticuerpo diseñado con cisteína también puede comprender:

(i) reacción del anticuerpo diseñado con cisteína con un reactivo de afinidad del tiol para generar un anticuerpo diseñado con cisteína y marcado por afinidad; y

(ii) medición de la unión del anticuerpo diseñado con cisteína y marcado por afinidad a un medio de captura.

Diseño con cisteína de las variantes de 10F4 IgG anti-CD22

La cisteína se introdujo en la posición 118 de la cadena pesada (numeración EU) (equivalente a la posición 121 de la cadena pesada, numeración secuencial) a los anticuerpos anti-CD22 monoclonales parentales quiméricos de longitud completa por medio de los métodos de diseño con cisteína que se describen en la presente memoria descriptiva.

El anticuerpo parental "std anti-CD22 Hu 10F4v3 Fc" (secuencia de cadena pesada: identificador de secuencia n.º: 88, secuencia de cadena ligera: identificador de secuencia n.º: 87, Figura 5B) se diseñó con cisteína para proporcionar "A118C tio hu anti-CD22 10F4v3" (secuencia de cadena pesada: identificador de secuencia n.º: 92, secuencia de cadena ligera: identificador de secuencia n.º: 91, Figura 17), "S400C tio hu anti-CD22 10F4v3" (secuencia de cadena pesada: identificador de secuencia n.º: 93, secuencia de cadena ligera: identificador de secuencia n.º: 91, Figura 17), o "V205C tio anti-CD22 10F4v3" (secuencia de cadena pesada: identificador de secuencia n.º: 88, secuencia de cadena ligera: identificador de secuencia n.º: 91, Figuras 5B y 17).

Estos anticuerpos monoclonales diseñados con cisteína se expresaron en células de ovarios de hámster chino (CHO) por medio de la fermentación transitoria en medios que contienen 1 mM de cisteína.

Anticuerpos anti-CD22 diseñados con cisteína y marcados

Los anticuerpos anti-CD22 diseñados con cisteína pueden ubicarse específicamente o acoplarse eficazmente con un reactivo del tiol. El reactivo del tiol puede ser un reactivo enlazador multifuncional, un reactivo de captura, es decir con afinidad, marcado (por ejemplo, un reactivo enlazador de biotina), una marca de detección (por ejemplo, un reactivo fluoróforo), un reactivo de

inmovilización de la fase sólida (por ejemplo, SEPHAROSE™, polistiereno o vidrio) o un enlazador a fármaco intermedio. Un ejemplo de reactivo del tiol es la N-etilmaleimida (NEM). En una forma de realización ejemplar, la reacción de un ThioFab con un reactivo enlazador de biotina proporciona un ThioFab biotinilado por medio del cual se puede detectar y evaluar la presencia y la reactividad del residuo diseñado con cisteína. La reacción de un ThioFab con un reactivo enlazador multifuncional proporciona un ThioFab un enlazador funcionalizado que puede reaccionar aún más con un reactivo de fracciones de fármacos u otra etiqueta. La reacción de un ThioFab con un enlazador a fármaco intermedio genera un conjugado de ThioFab con fármacos.

Los métodos ejemplares descritos en la presente memoria descriptiva pueden aplicarse en general a la identificación y producción de anticuerpos, y más generalmente, a otras proteínas mediante la aplicación de las fases de diseño y detección descritas en la presente memoria descriptiva.

Dicho método puede aplicarse a la conjugación de otros reactivos del tiol en la que el grupo reactivo es, por ejemplo, una maleimida, una iodoacetamida, un piridil disulfuro u otra molécula de conjugación de los reactivos del tiol (Haugland, 2003, *Molecular Probes Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals*, Molecular Probes, Inc.; Brinkley, 1992, *Bioconjugate Chem.* 3:2; Garman, 1997, *Non-Radioactive Labelling: A Practical Approach*, Academic Press, London; Means (1990) *Bioconjugate Chem.* 1:2; Hermanson, G. en *Bioconjugate Techniques* (1996) Academic Press, San Diego, págs. 40-55, 643-671). El reactivo del tiol puede ser una fracción de fármaco, un fluoróforo tal como un tinte fluorescente como la fluoresceína o rodamina, un agente quelante de metales para la radioterapia o el diagnóstico por imágenes, una marca peptidil o no peptidil, o una marca de detección, o un agente modificador de la eliminación, como por ejemplo, muchos isómeros del polietilenglicol, un péptido que se une a un tercer componente u otro carbohidrato o agente lipofílico.

Utilización de anticuerpos anti-CD22 diseñados con cisteína

Los anticuerpos anti-CD22 diseñado con cisteína y sus conjugados pueden utilizarse como agentes de diagnóstico o terapéuticos. La presente invención proporciona además métodos para prevenir, controlar, tratar o mejorar uno o más síntomas asociados a un trastorno relacionado con las células B. Particularmente, la presente invención proporciona métodos para prevenir, controlar, tratar o mejorar uno o más síntomas asociados a un trastorno de proliferación celular,

como el cáncer, por ejemplo, linfoma, linfoma no Hodgkins (NHL), NHL agresivo, NHL agresivo recurrente, NHL indolente recurrente, NHL refractario, NHL indolente refractario, leucemia linfocítica crónica (LLC), linfoma linfocítico de células pequeñas, leucemia, leucemia de células pilosas (LCP), leucemia linfocítica aguda (LLA) y linfoma de células del manto. La presente invención además proporciona métodos para diagnosticar un trastorno relacionado con el CD22 o una predisposición a desarrollar dicho trastorno, así como también los métodos para identificar anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de anticuerpos que preferentemente se unen a polipéptidos CD22 asociados a las células B.

Otra forma de realización de la presente invención está destinada a la utilización de un anticuerpo anti-CD22 diseñado con cisteína para la preparación de un medicamento útil en el tratamiento de una enfermedad que responde a un trastorno asociado con las células B.

Anticuerpos conjugados con fármacos diseñados con cisteína (conjugados de anticuerpo-tio con fármacos)

Otro aspecto de la invención es un compuesto de conjugados de anticuerpos con fármacos que comprende un anticuerpo anti-CD22 diseñado con cisteína (Ab) y un grupo del fármaco auristatina (D) en la que el anticuerpo diseñado con cisteína se une por medio de uno o más aminoácidos sin cisteína y de una porción de enlazador (L) a D, el compuesto que posee Fórmula I.



donde p equivale a 1, 2, 3 ó 4 y en donde el anticuerpo diseñado con cisteína se prepara mediante un proceso que involucra la sustitución de uno o más residuos de aminoácidos de un anticuerpo anti-CD22 parental por uno o más aminoácidos sin cisteína.

La Figura 10 muestra las formas de realización de conjugados de un anticuerpo anti-CD22 diseñado con cisteína con fármacos (ADC), donde una fracción del fármaco auristatina se une a un grupo diseñado con cisteína en: La cadena ligera (LC-ADC); la cadena pesada (HC-ADC) y la región Fc (Fc-ADC).

Entre las posibles ventajas de los conjugados de anticuerpos anti-CD22 diseñados con cisterna con fármacos se pueden mencionar: mayor seguridad (mayor índice terapéutico), parámetros de farmacocinética mejorados, se conservan los enlaces disulfuros de las inter-cadenas del anticuerpo que pueden estabilizar el conjugado y conservar su conformación de unión activa, se definen

los sitios de conjugación de fármacos y la preparación de conjugados de anticuerpos diseñados con cisterna con fármacos a partir de la conjugación de anticuerpos diseñados con cisteína con reactivos enlazadores de fármacos permite elaborar un producto más homogéneo.

Enlazadores

Por “enlazador”, “unidad de enlace” o “enlace” se entiende una fracción química que comprende un enlace covalente o una cadena de átomos que unen covalentemente un anticuerpo a una fracción de un fármaco. En varias formas de realización, un enlazador se especifica como L. Un “enlazador” (L) es una fracción bifuncional o multifuncional que se puede utilizar para unir una o más fracciones de fármacos (D) y una unidad de anticuerpos (Ab) para formar un conjugado de anticuerpos con fármacos (ADC) de Fórmula I. Los conjugados de anticuerpos con fármacos (ADC) pueden prepararse convenientemente utilizando un enlazador que posee funcionalidad reactiva para unirse al fármaco y al anticuerpo. Un tiol de cisteína de un anticuerpo diseñado con cisteína (Ab) puede formar un enlace con un grupo electrofílico funcional de un reactivo enlazador, una fracción del fármaco o un enlazador a fármaco intermedio.

En un aspecto, un enlazador posee un sitio reactivo que posee un grupo electrofílico que es reactivo a una cisteína nucleofílica presente en un anticuerpo. El tiol de cisteína del anticuerpo reacciona con un grupo electrofílico en un enlazador y forma un enlace covalente a un enlazador. Los grupos electrofílicos útiles comprenden, entre otros, los grupos de maleimidas y haloacetamidas.

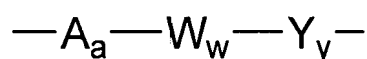
Los enlazadores incluyen un radical divalente, como un alquildiil, un arileno, un heteroarileno, fracciones como: $-(CR_2)_nO(CR_2)_n-$, unidades repetidoras de alquiloxi (por ejemplo, polietilenoxi, PEG, polimetileneoxi) y alquilamino (por ejemplo, polietileneamino, Jeffamine™); y éster diácido y amidas como succinato, succinamida, diglicolato, malonato y caproamida.

Los anticuerpos diseñados con cisteína reaccionan con reactivos enlazadores o enlazadores a fármaco intermedios, con grupos electrofílicos funcionales como la maleimida o α -halo carbonilo, según el método de conjugación descrito en la página 766 de Klussman y col., (2004), *Bioconjugate Chemistry* 15(4):765-773 y según el protocolo del ejemplo x.

El enlazador puede estar formado por uno o más componentes enlazadores. Los componentes de enlace ejemplares incluyen: 6-maleimidocaproilo (“MC”), maleimidopropanoilo (“MP”), valina-citrulina (“val-cit” o

“vc”), alanina-fenilalanina (“ala-phe” o “af”), p-aminobensiloxycarbonil (“PAB”), N-Succinimidil 4-(2-piridiltio) pentanoato (“SPP”), N-Succinimidil 4-(N-maleimidometil) ciclohexano-1 carboxilato (“SMCC”), N-Succinimidil (4-yodo-acetil) aminobenzoato (“SIAB”) y etilenoxi $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$, como una o más unidades repetidoras (“EO” o “PEO”). Los componentes enlazadores adicionales son conocidos en la materia y algunos se describen en la presente memoria descriptiva.

En una forma de realización, el enlazador L de un ADC posee la fórmula:



en la que:

-A- es una unidad de extensión unida covalentemente a un tiol de cisteína del anticuerpo (Ab),

a es 0 ó 1,

cada -W- es independientemente una unidad de aminoácidos,

w es independientemente un número entero que oscila entre 0 y 12,

-Y- es una unidad espaciadora unida covalentemente a una fracción de fármaco e

y es 0, 1 ó 2.

Unidad de extensión

La unidad de extensión (-A-), cuando está presente, es capaz de unir una unidad de anticuerpos a una unidad de aminoácidos (-W-). Al respecto, un anticuerpo (Ab) tiene un grupo funcional que puede formar un enlace con un grupo funcional de una unidad de extensión. Los grupos funcionales útiles que pueden estar presentes en un anticuerpo, ya sea naturalmente o través de la manipulación química incluyen, entre otros, el sulfidrilo (-SH), amino, hidroxilo, carboxi, el grupo de hidróxilos anoméricos de un carbohidrato y el carboxil. En un aspecto, los grupos funcionales de los anticuerpos son los sulfidrilos o aminos. Los grupos de sulfidrilos pueden generarse mediante la reducción de un enlace disulfuro intramolecular de un anticuerpo. Alternativamente, los grupos sulfidrilos se pueden generar a partir de la reacción de un grupo amino de una fracción de lisina de un anticuerpo utilizando 2-iminotiolano (reactivo de Traut) u otro reactivo que produzca sulfidrilo. En una forma de realización, un anticuerpo (Ab) posee un grupo tiol sin cisteína que puede formar un enlace con un grupo electrofílico funcional de una unidad de extensión. Las unidades de extensión ejemplares en los conjugados de Fórmula I se describen en las Fórmulas II y III, en las que Ab-, -

W-, -Y-, -D, w e y son como se definió anteriormente y R^{17} es un radical divalente seleccionado de $(CH_2)_r$, C_3-C_8 carbociclilo, $O-(CH_2)_r$, arileno, $(CH_2)_r$ -arileno, -arileno- $(CH_2)_r$, $(CH_2)_r$ -(C_3-C_8 carbociclilo), (C_3-C_8 carbociclilo)- $(CH_2)_r$, C_3-C_8 heterociclilo, $(CH_2)_r$ -(C_3-C_8 heterociclilo), -(C_3-C_8 heterociclilo)- $(CH_2)_r$, $-(CH_2)_rC(O)NR^b(CH_2)_r$, $-(CH_2CH_2O)_r$, $-(CH_2CH_2O)_r-CH_2-$, $-(CH_2)_rC(O)NR^b(CH_2CH_2O)_r$, $-(CH_2)_rC(O)NR^b(CH_2CH_2O)_r-CH_2-$, $-(CH_2CH_2O)_rC(O)NR^b(CH_2CH_2O)_r$, $-(CH_2CH_2O)_rC(O)NR^b(CH_2CH_2O)_r-CH_2-$ y $-(CH_2CH_2O)_rC(O)NR^b(CH_2)_r$; donde R^b es H, C_1-C_6 alquilo, fenilo o bencilo y r es independientemente un número entero que oscila entre 1 y 10.

El arileno incluye radicales de hidrocarburo aromático divalente de entre 6 y 20 átomos de carbono derivados de la eliminación de dos átomos de hidrógeno del sistema del anillo aromático. Los grupos de arileno típicos incluyen, entre otros, radicales derivados del benceno, benceno sustituido, naftaleno, antraceno, bifenilo, y similares.

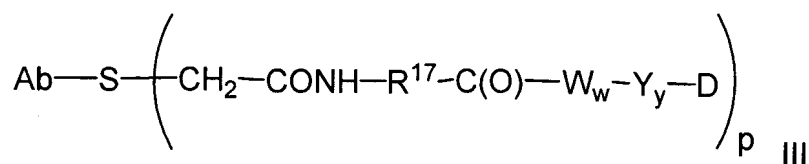
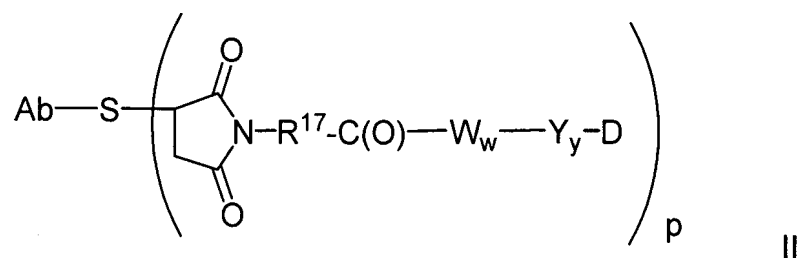
Los grupos heterociclicos incluyen un sistema de anillos en el que uno o más átomos en anillo es un heteroátomo, por ejemplo, nitrógeno, oxígeno y sulfuro. El radical heterociclo comprende de 1 a 20 átomos de carbono y de 1 a 3 heteroátomos seleccionados entre N, O, P y S. Un heterociclo puede ser un monociclo con 3 a 7 anillos (de 2 a 6 átomos de carbono y de 1 a 3 heteroátomos seleccionados entre N, O, P y S) o un biciclo con 7 a 10 anillos (de 4 a 9 átomos de carbono y de 1 a 3 heteroátomos seleccionados entre N, O, P y S), por ejemplo: un sistema biciclo [4,5], [5,5], [5,6] o [6,6]. Los heterociclos se describen en Paquette, Leo A.; *Principles of Modern Heterocyclic Chemistry* (W.A. Benjamin, New York, 1968), especialmente en los capítulos 1, 3, 4, 6, 7 y 9; *The Chemistry of Heterocyclic Compounds, A series of Monographs* (John Wiley y Sons, New York, 1950 a nuestros días), particularmente en los volúmenes 13, 14, 16, 19 y 28; y *J. Am. Chem. Soc.* (1960) 82:5566.

Ejemplos de heterociclos son piridil, dihidropiridil, tetrahidropiridil (piperidil), tiazolil, tetrahidrotiofeno, tetrahidrotiofeno de azufre oxidado, pirimidinil, furanil, tienil, pirrolil, pirazolil, imidazolil, tetrazolil, benzofuranil, tianaftalenil, indolil, indolenil, quinolinil, isoquinolinil, benzimidazolil, piperidinil, 4-piperidonil, pirrolidinil, 2-pirrolidonil, pirrolinil, tetrahidrofuranil, bis-tetrahidrofuranil, tetrahidropiranil, bis-tetrahidropiranil, tetrahidroquinolinil, tetrahidroisoquinolinil, decahidroquinolinil, octahidroisoquinolinil, azocinil, triazinil, 6H-1,2,5-tiadiazinil, 2H,6H-1,5,2-ditiazinil, tienil, tiantrenil, piranil, isobenzofuranil, chromenil, xantenil, fenoxatinil, 2H-pirrolil,

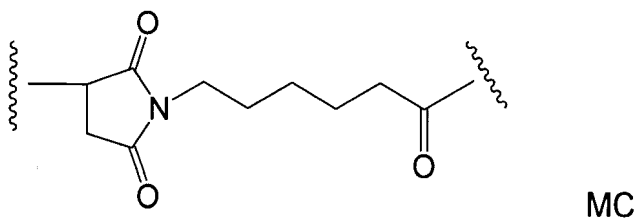
isotiazolil, isoxazolil, pirazinil, piridazinil, indolizinil, isoindolil, 3H-indolil, 1H-indazolil, purinil, 4H-quinolizinil, ftalazinil, naftiridinil, quinoxalinil, quinazolinil, cinnolinil, pteridinil, 4Ah-carbazolil, carbazolil, β -carbolinil, fenantridinil, acridinil, pirimidinil, fenantrolinil, fenazinil, fenotiazinil, furazanil, fenoxazinil, isochromanil, chromanil, imidazolidinil, imidazolinil, pirazolidinil, pirazolinil, piperazinil, indolinil, isoindolinil, quinuclidinil, morfolinil, oxazolidinil, benzotriazolil, benzisoxazolil, oxindolil, benzoxazolinil e isatinoil, entre otros.

Los grupos carbociclicos incluyen un anillo saturado o insaturado con entre 3 y 7 átomos de carbono como monociclo o entre 7 y 12 átomos de carbono como biciclo. Los carbociclos monociclicos tienen de 3 a 6 átomos en anillo y aún con más frecuencia 5 ó 6 átomos en anillo. Los carbociclos bicíclicos tienen de 7 a 12 átomos en anillo, por ejemplo, dispuestos como un sistema biciclo [4,5], [5,5], [5,6] o [6,6] o de 9 a 10 átomos en anillo dispuestos como un sistema biciclo [5,6] o [6,6]. Ejemplos de carbociclos monocíclicos incluyen ciclopropil, ciclobutil, ciclopentil, 1-ciclopent-1-enil, 1-ciclopent-2-enil, 1-ciclopent-3-enil, ciclohexil, 1-ciclohex-1-enil, 1-ciclohex-2-enil, 1-ciclohex-3-enil, cicloheptil y ciclooctil.

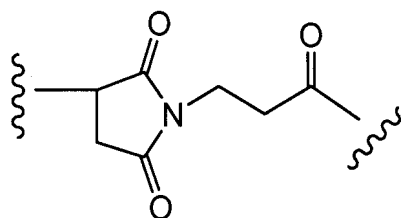
Se debe comprender a partir de todas las formas de realización ejemplares de ADC de Fórmula I, como II-VI, que aún cuando no se lo denote expresamente, entre 1 y 4 fracciones de fármacos se unen a un anticuerpo ($p = 1-4$), dependiendo de la cantidad de residuos diseñados con cisteína.



Una unidad de extensión ilustrativa de Fórmula II deriva de maleimida-caproila (MC) donde R^{17} es $-(\text{CH}_2)_5-$:

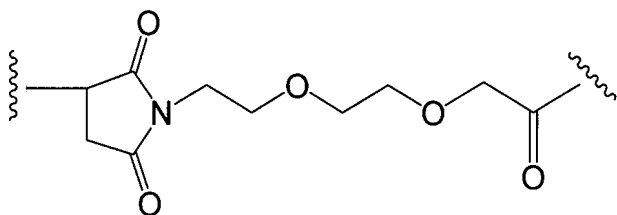


Una unidad de extensión ilustrativa de Fórmula II y deriva de maleimida-propanoilo (MP) donde R^{17} es $-(CH_2)_2-$:

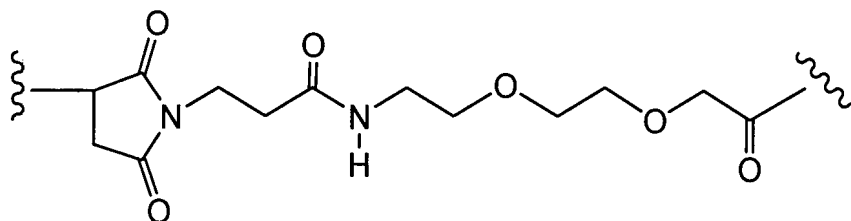


MP

Otra unidad de extensión ilustrativa de Fórmula II en la que R^{17} es $-(CH_2CH_2O)_r-CH_2-$ y r es 2:

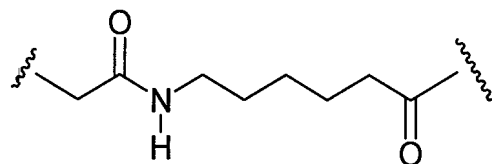


Otra unidad de extensión ilustrativa de Fórmula II en la que R^{17} es $-(CH_2)_rC(O)NR^b(CH_2CH_2O)_r-CH_2-$ donde R^b es H y cada r es 2:

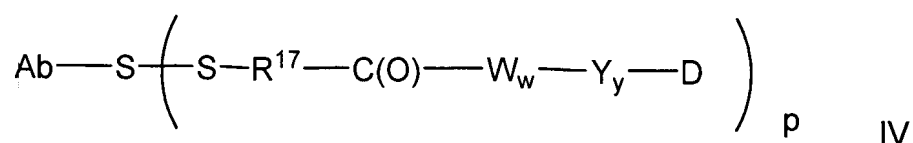


MPEG

Una unidad de extensión ilustrativa de Fórmula III en la que R^{17} es $-(CH_2)_5-$:

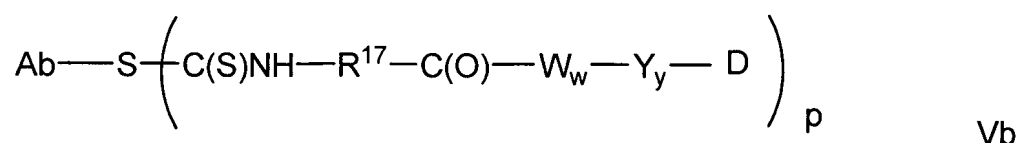
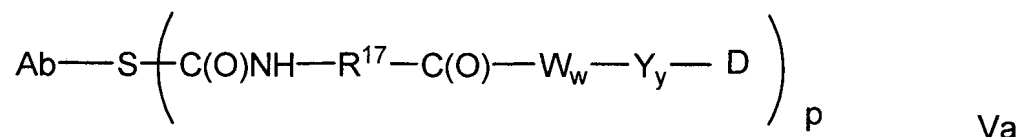


En otra forma de realización, la unidad de extensión se une al anticuerpo anti-CD22 diseñado con cisteína mediante un enlace disulfuro entre el átomo de sulfuro diseñado con cisteína del anticuerpo y un átomo de sulfuro de la unidad de extensión. Una unidad de extensión representativa de esta forma de realización se describe en la Fórmula IV, en la que R^{17} , Ab-, -W-, -Y-, -D, w e y son tal cual se definieron anteriormente.



En otra forma de realización, el grupo reactivo de la unidad de extensión contiene un grupo funcional de reactivos de tiol que pueden formar un enlace con un tiol sin cisteína de un anticuerpo. Entre los ejemplos de los grupos funcionales

que reaccionan con el tiol se pueden mencionar, entre otros, la maleimida, α -haloacetil, éteres activados como los ésteres de succinimida, ésteres de 4-nitrofenil, ésteres de pentafluorofenil, ésteres de tetrafluorofenil, anhídridos, cloruros de ácidos, fluoruro sulfonyl, isocianatos e isotiocianatos. Unidades de extensión representativas de esta forma de realización se describen en la Fórmula Va y Vb en la que R^{17} -, Ab-, -W-, -Y-, -D, w e y son tal cual se definieron anteriormente.



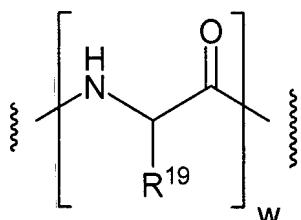
En otra forma de realización, el enlazador puede ser de tipo dendrítico para facilitar el enlace covalente de más de una fracción de fármacos a un anticuerpo mediante una fracción de enlazador multifuncional ramificado (Sun y col., (2002) *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 12:2213-2215; Sun y col., (2003) *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 11:1761-1768; King (2002) *Tetrahedron Letters* 43:1987-1990). Los enlazadores dendríticos pueden incrementar la proporción molar de un fármaco a un anticuerpo, es decir, la concentración, que se relaciona con la potencia del ADC. Por lo tanto, cuando un conjugado de anticuerpos con fármacos sólo contiene un grupo de tioles de cisteína reactiva, se pueden unir muchísimas fracciones de fármaco a través de un enlazador dendrítico.

Unidad de aminoácidos

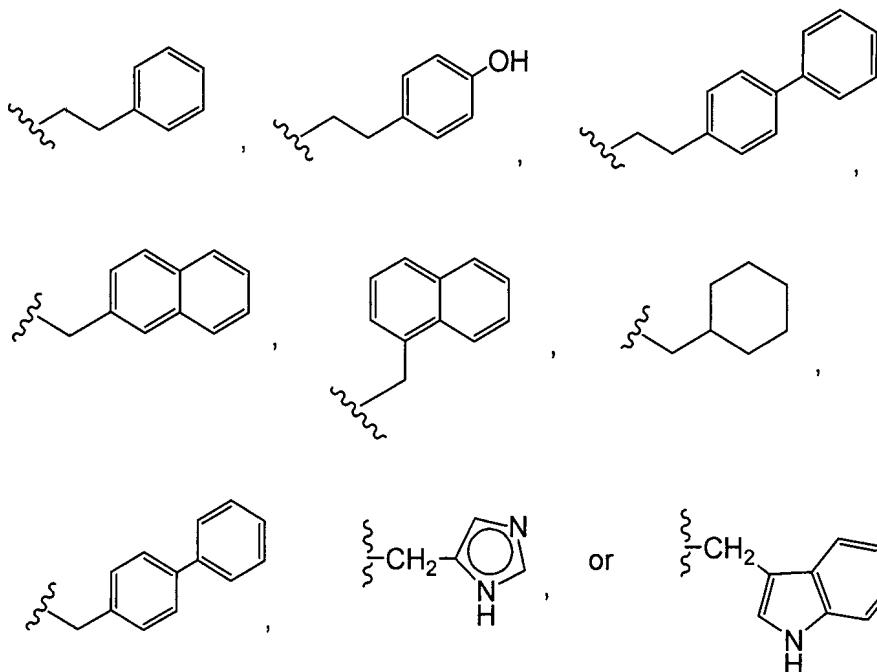
El enlazador puede incluir residuos de aminoácidos. La unidad de aminoácidos (-W_w-), cuando está presente, une el anticuerpo (Ab) con la fracción de fármaco (D) del conjugado de anticuerpo diseñado con cisteína con fármacos (ADC) de la invención.

W_w- es una unidad dipéptida, tripéptida, tetrapéptida, pentapéptida, hexapéptida, heptapéptida, octapéptida, nonapéptida, decapéptida, undecapéptida o dodecapéptida. Los residuos de aminoácidos que comprenden la unidad de aminoácidos incluyen aquellos que se producen de forma natural, así como también los aminoácidos menores y los análogos de aminoácidos que no se producen de forma natural, como la citrulina. Cada unidad -W- tiene

independientemente la fórmula que se muestra a continuación entre corchetes; w es un número entero que oscila entre 0 y 12.



donde R^{19} es hidrógeno, metilo, isopropilo, isobutilo, secbutil, bencilo, p-hidroxibencilo, $-\text{CH}_2\text{OH}$, $-\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SCH}_3$, $-\text{CH}_2\text{CONH}_2$, $-\text{CH}_2\text{COOH}$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CONH}_2$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$, $-(\text{CH}_2)_3\text{NHC}(=\text{NH})\text{NH}_2$, $-(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2$, $-(\text{CH}_2)_3\text{NHCOCH}_3$, $-(\text{CH}_2)_3\text{NHCHO}$, $-(\text{CH}_2)_4\text{NHC}(=\text{NH})\text{NH}_2$, $-(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2$, $-(\text{CH}_2)_4\text{NHCOCH}_3$, $-(\text{CH}_2)_4\text{NHCHO}$, $-(\text{CH}_2)_3\text{NHCONH}_2$, $-(\text{CH}_2)_4\text{NHCONH}_2$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{NH}_2$, 2-piridilmetil-, 3-piridilmetil-, 4-piridilmetil-, fenilo, ciclohexil,



Cuando R^{19} es otro elemento que no sea hidrógeno, el átomo de carbono al cual R^{19} se une es quiral. Cada átomo de carbono al cual R^{19} se une es independiente en la configuración (S) o (R) o una mezcla racémica. Por lo tanto, las unidades de aminoácidos pueden ser enantioméricamente puras, racémicas o diastereoméricas.

Las unidades de aminoácidos $-\text{W}_w-$ ejemplares incluyen un dipéptido, un tripéptido, un tetrapéptido o un pentapéptido. Los dipéptidos ejemplares incluyen: valina-citrulina (vc o val-cit), alanina-fenilalanina (af o ala-phe). Los tripéptidos

ejemplares incluyen: glicina-valina-citrulina (gly-val-cit) y glicina-glicina-glicina (gly-gly-gly). Los residuos de aminoácidos que comprenden un componente enlazador de aminoácidos incluyen aquellos que se producen de forma natural, tales como los aminoácidos menores y los análogos de aminoácidos que no se producen de forma natural, como la citrulina.

La unidad de aminoácidos puede separarse enzimáticamente por una o más enzimas, incluyendo una proteasa asociada a un tumor, para liberar la fracción de fármaco (-D), que en una forma de realización se le incorpora un protón *in vivo* en la liberación para proporcionar un fármaco (D). Los componentes enlazadores de aminoácidos pueden designarse y optimizarse en su selectividad para la escisión enzimática mediante una enzima específica, por ejemplo, una proteasa asociada a un tumor, catepsina B, C y D o una proteasa plasmina.

Unidad espaciadora

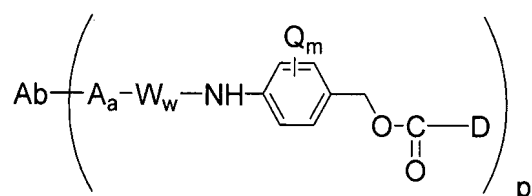
La unidad espaciadora ($-Y_y-$), cuando se encuentra presente ($y = 1$ ó 2), une una unidad de aminoácidos ($-W_w-$) a una fracción de fármaco (D) cuando una unidad de aminoácidos se encuentra presente ($w = 1-12$). Alternativamente, la unidad espaciadora une la unidad de extensión a la fracción de fármaco cuando la unidad de aminoácidos no está presente. La unidad espaciadora también une la fracción de fármaco a la unidad de anticuerpos cuando la unidad de aminoácidos y la unidad de extensión no están presentes ($w, y = 0$). Las unidades espaciadoras son de dos tipos generales: autoinmoladoras y no autoinmoladoras. Una unidad espaciadora no autoinmoladora es aquella en la que la totalidad o parte de la unidad espaciadora se mantiene unida a la fracción de fármaco después de la escisión, particularmente enzimática, de una unidad de aminoácidos del conjugado de anticuerpos con fármacos o del enlazador de fracciones de fármaco. Cuando un ADC con una unidad espaciadora de glicina-glicina o una unidad espaciadora de glicina sufre una escisión enzimática a través de una proteasa asociada a una célula tumoral, una proteasa asociada a una célula cancerosa o una proteasa asociada a un linfocito, una fracción de fármaco de glicina-glicina o una fracción de fármaco de glicina se separa de $Ab-A_a-Ww-$. En una forma de realización, una reacción de hidrólisis independiente se produce dentro de la célula diana, lo cual separa el enlace de la fracción de fármaco de la glicina y libera el fármaco.

En otra forma de realización, $-Y_y-$ es una unidad de p-aminobencilcarbamoil (PAB) cuya porción de fenileno se sustituye por Q_m , donde Q es $-C_1-C_8$ alquilo, $-O-$ (C_1-C_8 alquilo), $-halógeno-$, $-nitro$ o $-ciano$ y m es un número entero que oscila entre 0 y 4.

Las formas de realización ejemplares de una unidad espaciadora no autoimmoladoras son: $-Gly-Gly-$; $-Gly-$; $-Ala-Phe-$; $-Val-Cit-$.

En una forma de realización, se proporciona un enlazador de fracciones de fármaco o un ADC en el que la unidad espaciadora está ausente ($y=0$) o está una de sus sales o disolventes farmacéuticamente aceptables.

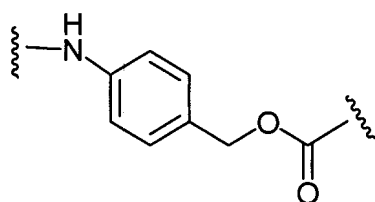
Alternativamente, un ADC que contiene una unidad espaciadora autoinmoladora puede liberar $-D$. En una forma de realización, $-Y-$ es un grupo PAB unido a $-W_w-$ a través del átomo de nitrógeno del amino del grupo PAB y está conectado directamente a $-D$ a través de un carbonato, carbamato o grupo de éteres, donde el ADC posee la estructura ejemplar:



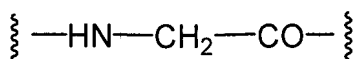
donde Q es $-C_1-C_8$ alquilo, $-O-(C_1-C_8$ alquilo), $-halógeno-$, $-nitro$ o $-ciano$; m es un número entero que oscila entre 0 y 4, y p oscila entre 1 y 4.

Otros ejemplos de espaciadores autoinmoladores incluyen, entre otros, compuestos aromáticos que se asemejan electrónicamente al grupo PAB, como los derivados del 2-aminoimidazol-5-metanol (Hay y col., (1999) *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 9:2237), análogos de PAB heterocíclicos (patente de EE.UU. N.º 2005/0256030), beta-glucorónido (documento WO 2007/011968) y orto- o para-aminobencilacetales. Se pueden utilizar espaciadores que se sometan a ciclización tras hidrólisis de la unión amida, como amidas de ácido 4-aminobutírico sustituido y no sustituido (Rodrigues y col., (1995) *Chemistry Biology* 2: 223); sistemas de anillo biciclo[2.2.1] y biciclo[2.2.2] sustituidos adecuadamente (Storm y col. (1972) *J. Amer. Chem. Soc.*, 94:5815) y amidas de ácido 2-aminofenilpropiónico (Amsberry y col., (1990) *J. Org. Chem.*, 55:5867). La eliminación de fármacos con aminas que se sustituyen en la glicina (Kingsbury y col. (1984) *J. Med. Chem.* 27:1447) también es un ejemplo de espaciadores autoinmoladores útiles en los ADC.

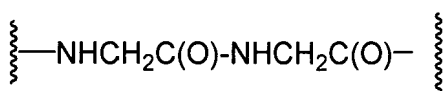
Las Fórmulas X-XII representan las unidades espaciadoras ejemplares (-Y_y-).



X



XI

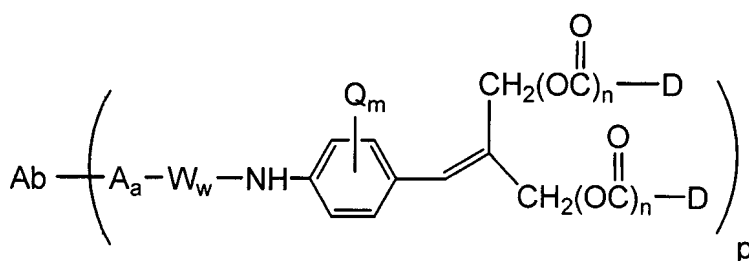


XII

Enlazadores dendríticos

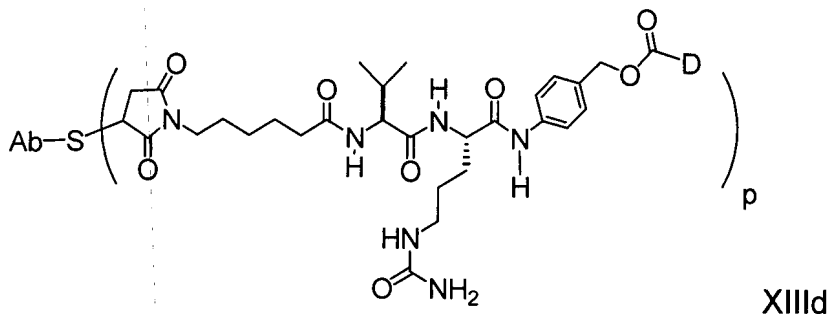
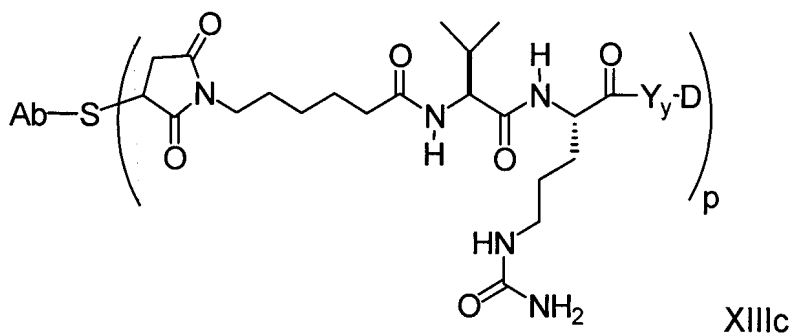
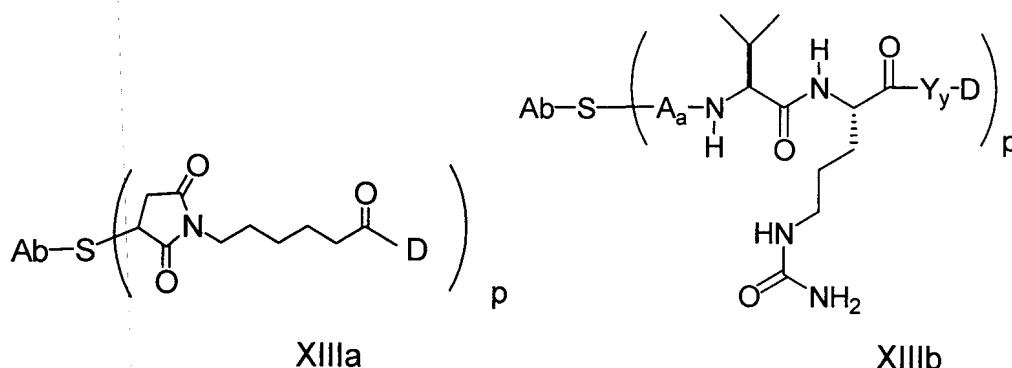
En otra forma de realización, el enlazador L puede ser de tipo dendrítico para facilitar el enlace covalente de más de una fracción de fármacos a un anticuerpo a través de una fracción de enlazador multifuncional ramificado (Sun y col., (2002) *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 12:2213-2215; Sun y col., (2003) *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 11:1761-1768). Los enlazadores dendríticos pueden incrementar la proporción molar de un fármaco a un anticuerpo, es decir, la concentración, que se relaciona con la potencia del ADC. Por lo tanto, cuando un conjugado de anticuerpos con fármacos sólo contiene un grupo de tioles de cisteína reactiva, se pueden unir muchísimas fracciones de fármaco a través de un enlazador dendrítico. Entre las formas de realización ejemplares de enlazadores dendríticos ramificados se puede mencionar 2,6-bis(hidroximetil)-p-cresol y unidades de dendrímeros de 2,4,6-tris(hidroximetil)-fenol (documento WO 2004/01993; Szalai y col., (2003) *J. Amer. Chem. Soc.* 125:15688-15689; Shamis y col., (2004) *J. Amer. Chem. Soc.* 126:1726-1731; Amir y col., (2003) *Angew. Chem. Int. Ed.* 42:4494-4499).

En una forma de realización, una unidad espaciadora es una unidad ramificada de bis(hidroximetil)estireno (BHMS), que se puede utilizar para incorporar y liberar múltiples fármacos, que posean la siguiente estructura:

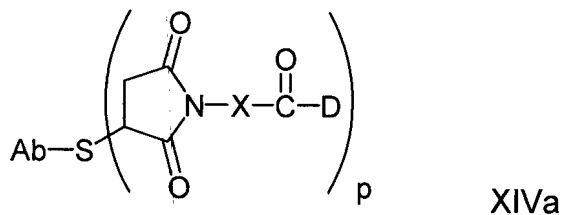


que compenda una unidad de dendrímeros de 2-(4-aminobencilideno)propano-1,3-diol (documento WO 2004/043493; de Groot y col., (2003) *Agnew. Chem. Int. Ed.* 42:4490-4494), donde Q es -C₁-C₈ alquilo, -O-(C₁-C₈ alquilo), -halógeno, -nitro o -ciano; m es un número entero que oscila entre 0 y 4; n es 0 ó 1 y p oscila entre 1 y 4.

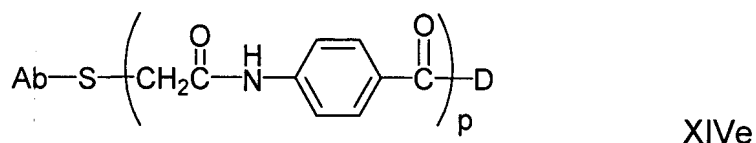
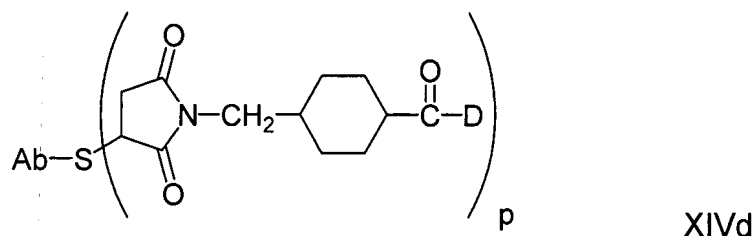
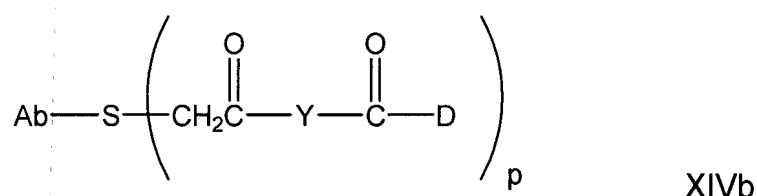
Formas de realización ejemplares de los compuestos de conjugados de anticuerpos con fármacos de Fórmula I incluyen XIIIa (MC), XIIIb (val-cit), XIIIc (MC-val-cit) y XIId (MC-val-cit-PAB):



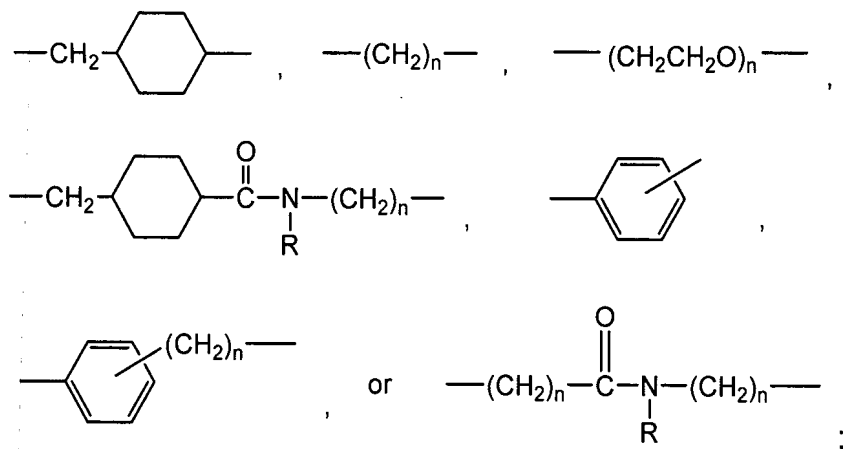
Otras formas de realización ejemplares de los compuestos de conjugados de anticuerpos con fármacos de Fórmula Ia incluyen XIV a-e:



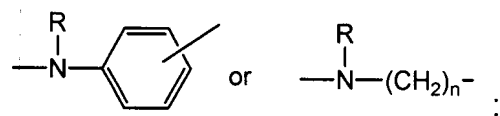
213



donde X es:



Y es:



y R es independientemente H o C₁-C₆ alquilo y n oscila entre 1 y 12.

En otra forma de realización, un enlazador posee un grupo funcional reactivo que posee un grupo nucleofílico reactivo a un grupo electrofílico presente en un anticuerpo. Algunos de los grupos electrofílicos útiles en un anticuerpo incluyen, entre otros, los grupos carbonilos de aldehídos y acetonas. El heteroátomo de un grupo nucleofílico de un enlazador puede reaccionar con un grupo electrofílico en un anticuerpo y formar un enlace covalente a una unidad de anticuerpos. Entre los grupos nucleofílicos útiles en un enlazador se puede

214

mencionar la hidracida, oxima, amina, hidracina, tiosemicarbazona, carboxilato de hidracina y aril-hidracida. El grupo electrofílico en un anticuerpo proporciona un sitio conveniente para la unión con un enlazador.

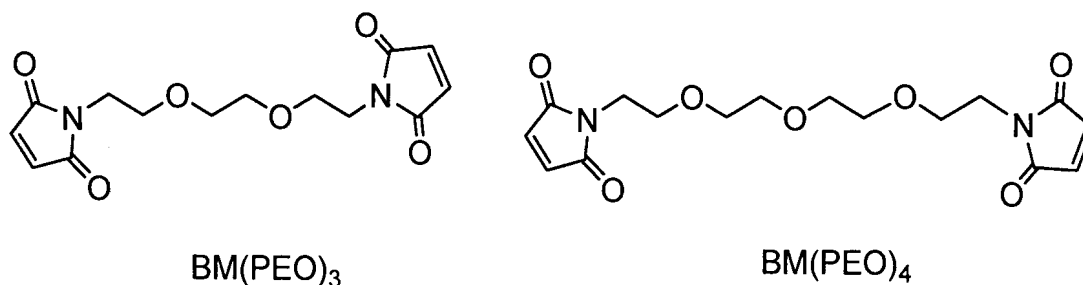
Por lo general, los enlazadores tipo péptidos pueden prepararse formando un enlace peptídico entre uno o más aminoácidos o fragmentos de péptidos. Estos enlaces peptídicos pueden prepararse, por ejemplo, de acuerdo con el método de síntesis de fase líquida (véase E. Schröder y K. Lübke (1965) *The Peptides*, volumen 1, págs. 76-136, Academic Press) que es bien conocido en el campo de la química de péptidos. Los enlazadores intermedios pueden ensamblarse con cualquier combinación o secuencia de reacciones incluyendo unidades espaciadoras, de extensión y de aminoácidos. Las unidades espaciadoras, de extensión y de aminoácidos pueden utilizar grupos funcionales reactivos que sean de naturaleza electrofílicos, nucleofílicos o sin radicales. Los grupos funcionales reactivos incluyen, entre otros, los carboxilos, hidroxilos, para-nitrofenilcarbonato, isotiocianato y grupos salientes como O-mesil, O-tosil, -Cl, -Br, -I o maleimida.

En otra forma de realización, el enlazador puede sustituirse con grupos que modularon la solubilidad o reactividad. Por ejemplo, un sustituto cargado, como el sulfonato ($-\text{SO}_3^-$) o amonio, puede incrementar la solubilidad en agua del reactivo y facilitar la reacción de unión del reactivo enlazador con el anticuerpo o la fracción de fármacos, o facilitar la reacción de unión de Ab-L (enlazador a anticuerpo intermedio) con D o D-L (enlazador a fármaco intermedio) con Ab, dependiendo de la ruta sintética empleada para preparar el ADC.

Reactivos enlazadores

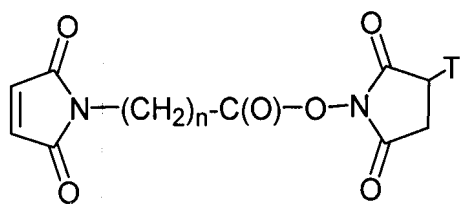
Los conjugados del anticuerpo y la auristatina se pueden realizar utilizando una variedad de reactivos enlazadores bifuccionales, como por ejemplo N-succinimidil-3-(2-piridilditio) propionato (SPDP), succinimidil-4-(N-maleimidometil) ciclohexano-1-carboxilato (SMCC), iminotiolano (IT), derivados bifuccionales de imidoésteres (como el dimetiladipimidato HCl), ésteres activos (por ejemplo, disuccinimidil suberato), aldehídos (por ejemplo, glutaraldehídos), compuestos bis-azido (como bis (p-azidobenzoil) hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (como bis-(p-diazoniobenzoil)-etilenodiamina), diisocianatos (por ejemplo, 2,6-diisocianato de tolueno) y compuestos bis-activos de fluoruro (como 1,5-difluoruro-2,4-dinitrobenceno).

Los conjugados de anticuerpos con fármacos también pueden prepararse con reactivos enlazadores: BMPEO, BMPS, EMCS, GMBS, HBVS, LC-SMCC, MBS, MPBH, SBAP, SIA, SIAB, SMPB, SMPH, sulfo-EMCS, sulfo-GMBS, sulfo-KMUS, sulfo-MBS, sulfo-SIAB, sulfo-SMCC y sulfo-SMPB, y SVSB (succinimidil-(4-vinilsufona)benzoato), incluyendo reactivos de bis-maleimida: DTME, BMB, BMDB, BMH, BMOE, BM(PEO)₃, y BM(PEO)₄, comercializados por Pierce Biotechnology, Inc., Departamento de Atención al cliente, P.O. Box 117, Rockford, IL. 61105 EE.UU, EE.UU 1-800-874-3723, Internacional +815-968-0747. Los reactivos de bis-maleimida permiten la unión de un grupo tiol de un anticuerpo diseñado con cisteína a una fracción de fármaco, etiqueta o enlazador intermedio que contenga tiol, de manera secuencial o simultánea. Otros grupos funcionales además de la maleimida, que son reactivos con un grupo tiol de un anticuerpo diseñado con cisteína, fracción de fármaco, etiqueta o enlazador intermedio incluyen la iodoacetamida, bromoacetamida, vinilpiridina, disulfuro, piridil disulfuro, isocianato e isotiocianato.

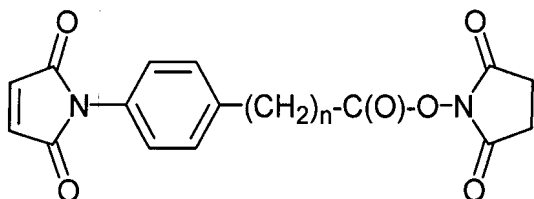


Los reactivos enlazadores útiles también se pueden obtener a través de otras fuentes comerciales, tal como Molecular Biosciences Inc. (Boulder, CO) o se pueden sintetizar según los procedimientos descritos en Toki y col., (2002) *J. Org. Chem.* 67:1866-1872; Walker, M.A. (1995) *J. Org. Chem.* 60:5352-5355; Frisch y col., (1996) *Bioconjugate Chem.* 7:180-186; la patente de EE.UU. N.º 6214345; el documento WO 02/088172; la patente de EE.UU. N.º 2003130189; la patente de EE.UU. N.º 2003096743; el documento WO 03/026577; el documento WO 03/043583 y el documento WO 04/032828.

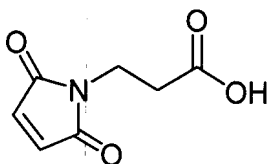
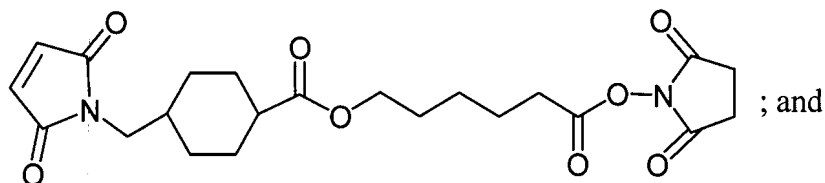
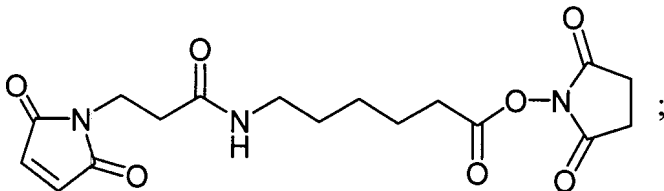
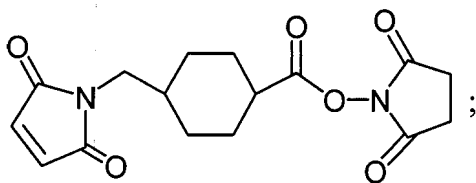
Las unidades de extensión de fórmula (IIIa) pueden introducirse en un enlazador mediante la reacción de los siguientes reactivos enlazadores con el extremo N-terminal de una unidad de aminoácidos:



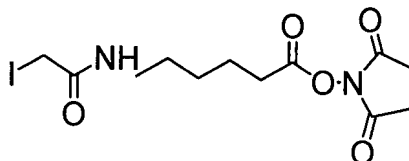
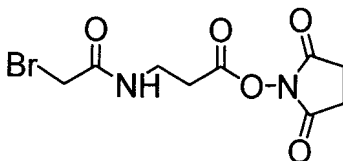
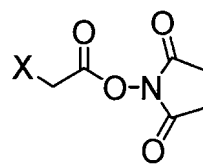
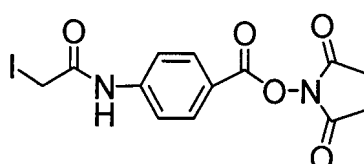
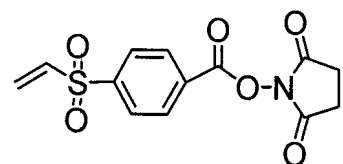
donde n es un número entero que oscila entre 1 y 10, y T es H o $-SO_3Na$;



donde n es un número entero que oscila entre 0 y 3;

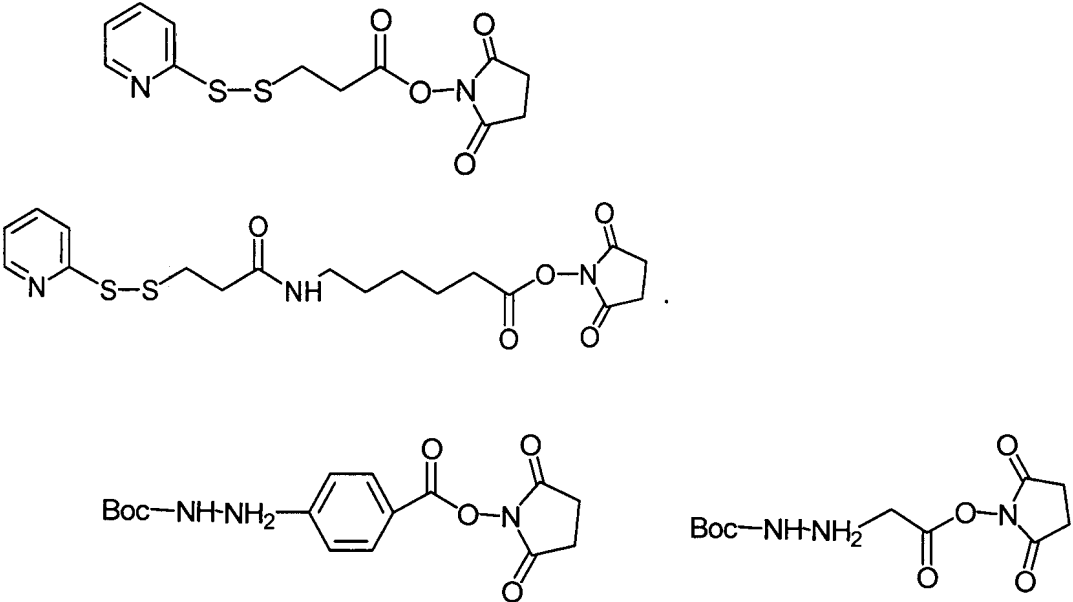


Las unidades de extensión pueden introducirse en un enlazador mediante la reacción de los siguientes reactivos bifuncionales con el extremo N-terminal de una unidad de aminoácidos.

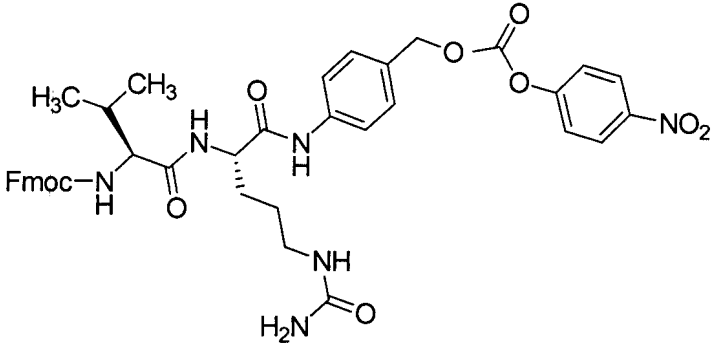


donde X es Br o I .

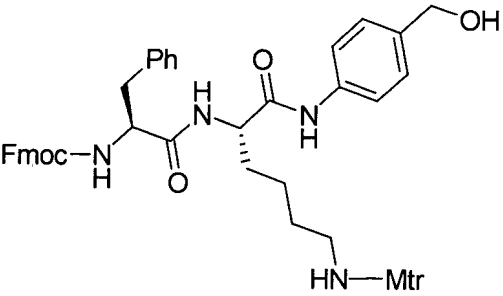
Las unidades de extensión de la fórmula también pueden introducirse en un enlazador mediante la reacción de los siguientes reactivos bifuncionales con el extremo N-terminal de una unidad de aminoácidos.



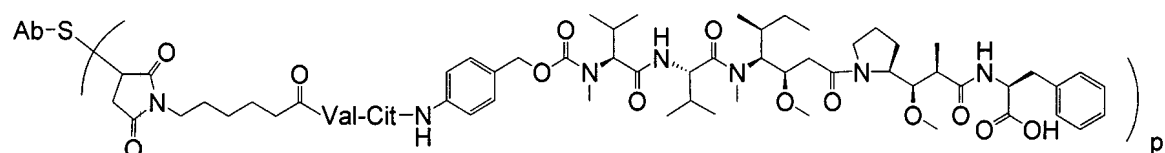
Un reactivo enlazador de dipéptidos valina-citrulina (val-cit or vc) ejemplar que posee una unidad de extensión de maleimida y un espaciador autoinmolador para-aminobencilcarbamoil (PAB) posee la siguiente estructura:



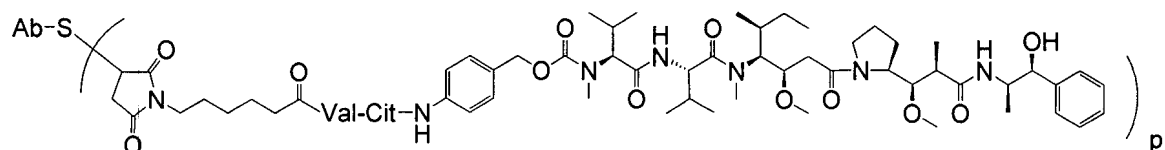
Un reactivo enlazador de dipéptidos phe-lys(Mtr, mono-4-metoxitritil) ejemplar que posee una unidad de extensión de maleimida y una unidad espaciadora autoinmoladora PAB pueden prepararse según Dubowchik y col., (1997) *Tetrahedron Letters*, 38:5257-60 y posee la siguiente estructura:



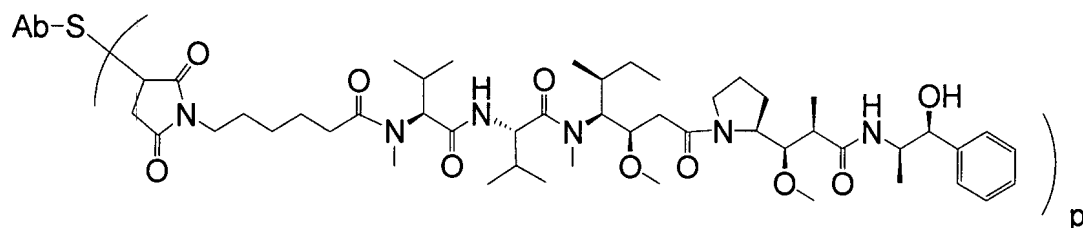
Los compuestos de conjugados de anticuerpos con fármacos ejemplares de la invención incluyen:



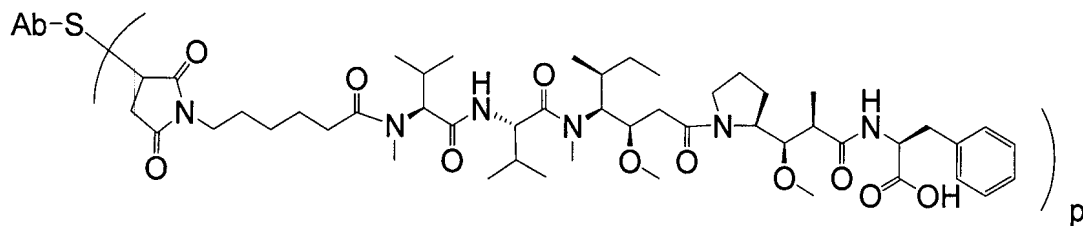
Ab-MC-vc-PAB-MMAF



Ab-MC-vc-PAB-MMAE



Ab-MC-MMAE



Ab-MC-MMAF

Donde Val es valina, Cit es citrulina, p es 1, 2, 3 ó 4 y Ab es anticuerpo anti-CD22 diseñado con cisteína.

Preparación de conjugados de anticuerpos anti-CD22 diseñados con cisteína con fármacos

Los ADC de la formula I se pueden preparar por varios medios, empleando reacciones químicas orgánicas, condiciones y reactivos conocidos por los expertos, como: (1) una reacción de un grupo de cisteínas de un anticuerpo diseñado con cisteína con un agente enlazador, para formar un enlazador a anticuerpo intermedio Ab-L, mediante un enlace covalente, seguida de la reacción con una fracción del fármaco D activado; y (2) una reacción de un grupo nucleofílico de una fracción del fármaco con un reactivo enlazador, para formar un

enlazador a fármacos intermedio D-L, mediante un enlace covalente, seguido de la reacción con el grupo de cisteínas de un anticuerpo diseñado con cisteína. Los métodos de conjugación (1) y (2) pueden emplearse con una variedad de anticuerpos diseñados con cisteína, fracciones de fármacos y enlazadores para preparar conjugados de anticuerpos con fármacos de Fórmula I.

Los grupos tiol de cisteína del anticuerpo son nucleofílicos y son capaces de reaccionar para formar enlaces covalentes con grupos electrofílicos en los reactivos enlazadores y los enlazadores a fármacos intermedios, que incluyen: (i) ésteres activos como los ésteres NHS, los ésteres HOBt, haloformos y haluros de ácido; (ii) haluros de alquilo y bencilo como las haloacetamidas; (iii) aldehídos, cetonas, carboxilo y grupos maleimidos, y (iv) disulfuros, incluyendo piridil disulfuros, mediante un intercambio de sulfuros. Los grupos nucleofílicos en una fracción del fármaco incluyen los siguientes compuestos: los grupos amino, tiol, hidroxilo, hidracida, oxima, hidracina, tiosemicarbazona, carboxilato de hidracina y aril-hidracida, capaces de reaccionar para formar enlaces covalentes con grupos electrofílicos en las fracciones enlazadoras y reactivos enlazadores.

Los anticuerpos diseñados con cisteína pueden convertirse en reactivos para conjugarse con reactivos enlazadores mediante el tratamiento con un agente reductor como DTT (reactivo de Cleland, ditioneitol) o TCEP (tris(2-carboxietil)fosfino hidrocloreto; Getz y col., (1999) *Anal. Biochem.* Vol. 273:73-80; Soltec Ventures, Beverly, MA), seguido de reoxidación para reformar los enlaces disulfuros de la intercadena e intracadena (Ejemplo x). Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales diseñados con cisteína de longitud completa (ThioMab) expresados en las células CHO se reducen con un exceso de TCEP de aproximadamente 50 veces durante 3 horas a 37 °C para reducir los enlaces disulfuros en los aductos de cisteínas, que pueden formarse entre los residuos de cisteína introducidos recientemente y la cisteína presente en el medio de cultivo. El ThioMab reducido se diluye y se carga en la columna HiTrap S en acetato sódico 10 mM, pH 5, y se eluye con PBS que contiene cloruro de sodio 0,3 M. Los enlaces disulfuros se restablecieron entre los residuos de cisteína presentes en el Mab parental con sulfato de cobre (CuSO_4) acuoso diluido (200 nM) a temperatura ambiente, durante toda la noche. Alternativamente, el ácido dehidroascórbico (DHAA) es un oxidante eficaz para restablecer los grupos disulfuros de la intracadena del anticuerpo diseñado con cisteína después de reducir la escisión de aductos de cisteína. Se pueden utilizar otros oxidantes, es

decir agentes oxidantes, y condiciones oxidantes, que son bien conocidos en la materia. La oxidación al aire del ambiente también es eficaz. Este paso de reoxidación leve y parcial forma eficazmente disulfuros de intracadenas con una alta fidelidad y conserva los grupos tiol de los residuos de cisteína introducidos recientemente. Se agregó y mezcló un exceso de aproximadamente 10 veces del enlazador a fármaco intermedio, como por ejemplo, MC-vc-PAB-MMAE, y se lo dejó reposar durante aproximadamente una hora a temperatura ambiente para lograr una conjugación y formar el conjugado de anticuerpo anti-CD22 10F4v3 con fármacos. La mezcla de conjugación se filtró en gel y se cargó y eludió a través de una columna HiTrap S para eliminar el exceso del enlazador a fármaco intermedio y otras impurezas.

La Figura 12 muestra el proceso general para preparar un anticuerpo diseñado con cisteína expresado desde el cultivo celular para la conjugación. Cuando el medio de cultivo celular contiene cisteína, los aductos de disulfuros pueden formarse entre los aminoácidos con cisteína introducidos recientemente y las cisteínas del medio. Estos aductos de cisteínas, que se muestran como un círculo en el ThioMab ejemplar (izquierda) en la Figura 12, deben reducirse para generar anticuerpos reactivos diseñados con cisteína para la conjugación. Los aductos de cisteínas, supuestamente junto con varios enlaces disulfuros de intercadenas, se escinden de manera reduccionista para obtener una forma reducida del anticuerpo con agentes reductores tal como TCEP. Los enlaces disulfuros de intercadenas entre residuos de cisteína emparejados se reforman bajo condiciones de oxidación parcial con sulfato de cobre, DHAA o con la exposición al oxígeno del ambiente. Los residuos de cisteína introducidos recientemente, diseñados e independientes permanecen disponibles para la reacción con los reactivos enlazadores o los enlazadores a fármacos intermedios para formar los conjugados de anticuerpos de la invención. Los ThioMab expresados en las líneas celulares de mamíferos dan lugar a cys conjugados externamente aducidos a un cys diseñado mediante una formación de unión –S-S-. Por lo tanto, los ThioMab purificados se tratan con los procedimientos de reducción y reoxidación, tal como se describen en el Ejemplo x, para producir ThioMab reactivos. Estos ThioMab se utilizan para conjugarse con fármacos citotóxicos que contienen maleimidos, con fluoróforos y con otras marcas.

Métodos de detección

Otra forma de realización de la presente invención se dirige a un método para determinar la presencia de un polipéptido CD22 en una muestra que se cree que contiene el polipéptido CD22. El método comprende exponer la muestra a un anticuerpo anti-CD22 diseñado con cisterna, o el conjugado de anticuerpo con fármaco del mismo, que se une al polipéptido CD22, y determinar si el anticuerpo anti-CD22 diseñado con cisterna, o el conjugado de anticuerpo con fármacos del mismo, se une al polipéptido CD22 en la muestra, en la que la presencia de dicha unión indica la presencia del polipéptido CD22 en la muestra. Opcionalmente, la muestra puede contener células (que pueden ser cancerosas) que se sospeche que puedan expresar el polipéptido CD22. El anticuerpo anti-CD22 diseñado con cisterna, o el conjugado de anticuerpo con fármaco del mismo, que se utiliza en el método pueden opcionalmente marcarse de forma detectable, unirse a un soporte sólido, etc.

Otra forma de realización de la presente invención se dirige a un método para diagnosticar la presencia de un tumor en un mamífero. Este método comprende (a) establecer un contacto entre una muestra de prueba que contenga células del tejido obtenidas de un mamífero y un anticuerpo anti-CD22 diseñado con cisteína o, el conjugado de anticuerpo con fármaco del mismo, que se une a un polipéptido CD22, y (b) detectar la formación de un complejo entre el anticuerpo anti-CD22 diseñado con cisterna, o el conjugado de anticuerpo con fármaco del mismo, y el polipéptido CD22 en la muestra de prueba, en la que la formación de un complejo indica la presencia de un tumor en el mamífero. Opcionalmente, el anticuerpo anti-CD22 diseñado con cisterna, o el conjugado de anticuerpo con fármaco del mismo, se marca de forma detectable, se une a un soporte sólido, etc. o la muestra de prueba de las células del tejido se obtiene de un individuo que se sospecha que tienen un tumor canceroso.

Metabolitos de los conjugados de anticuerpos con fármacos

También se encuentran dentro del campo de esta invención los productos metabólicos *in vivo* de los compuestos de los ADC descritos en la presente memoria descriptiva, hasta el punto que estos productos son novedosos e imperceptibles hasta el momento. Dichos productos pueden originarse, por ejemplo, de la oxidación, reducción, hidrólisis, amidación, esterificación, escisión enzimática, y similares, de los compuestos administrados. Por consiguiente, la invención incluye compuestos novedosos e imperceptibles producidos mediante un proceso que comprende establecer un contacto entre un compuesto de esta

invención y un mamífero durante un periodo de tiempo suficiente para producir un producto metabólico de dicho compuesto.

Por lo general, los productos metabolitos se identifican al preparar un ADC radiomarcado (por ejemplo, ^{14}C o ^3H) que se administra parenteralmente a un animal, como por ejemplo, una rata, un ratón, un cobaya, un mono, o a un humano en una dosis detectable (por ejemplo, mayor a 0,5 mg/kg aproximadamente) y permitir el tiempo suficiente para que se produzca el metabolismo (por lo general, aproximadamente entre 30 segundos y 30 horas) y aislar sus productos de conversión de la orina, sangre u otras muestras biológicas. Estos productos se aíslan fácilmente ya que están marcados (otros se aíslan mediante el uso de anticuerpos capaces de unir epítopos que sobreviven en el metabolito). Las estructuras de los metabolitos se determinan de manera convencional, por ejemplo, mediante espectrometría de masas (MS), cromatografía líquida/espectrometría de masas (LC/MS) o resonancia magnética nuclear (NMR). En general, el análisis de metabolitos se realiza de la misma manera que los estudios convencionales del metabolismo de fármacos que son bien conocidos por los expertos en la materia. Los productos de conversión, siempre que no se encuentren *in vivo*, son útiles en los ensayos de diagnóstico para establecer las dosis terapéuticas de los compuestos de ADC de la invención.

Formulaciones farmacéuticas

Administración de los conjugados de anticuerpos con fármacos, incluyendo el conjugado de anticuerpo-tio con fármacos

Los conjugados de anticuerpos con fármacos (ADC), incluyendo el conjugado de anticuerpo tio con fármacos (TDC), de la invención pueden administrarse mediante cualquier vía adecuada según la afección que deba tratarse. Por lo general, los ADC se administrarán parenteralmente, es decir, por infusión, por vía subcutánea, intramuscular, intravenosa, intradérmica, intratecal o epidural.

Para el tratamiento de estos cánceres, en una forma de realización, el conjugado de anticuerpo con fármacos se administra por infusión intravenosa. La dosis que se administra por infusión varía aproximadamente entre $1\text{ }\mu\text{g}/\text{m}^2$ y $10.000\text{ }\mu\text{g}/\text{m}^2$ por dosis, por lo general, una dosis semanal de un total de una, dos, tres o cuatro dosis. Alternativamente, el rango de dosis es aproximadamente de entre $1\text{ }\mu\text{g}/\text{m}^2$ y aproximadamente $1000\text{ }\mu\text{g}/\text{m}^2$, aproximadamente $1\text{ }\mu\text{g}/\text{m}^2$ y

aproximadamente 800 $\mu\text{g}/\text{m}^2$, aproximadamente 1 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ y aproximadamente 600 $\mu\text{g}/\text{m}^2$, aproximadamente 1 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ y aproximadamente 400 $\mu\text{g}/\text{m}^2$, aproximadamente 10 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ y aproximadamente 500 $\mu\text{g}/\text{m}^2$, aproximadamente 10 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ y aproximadamente 300 $\mu\text{g}/\text{m}^2$, aproximadamente 10 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ y aproximadamente 200 $\mu\text{g}/\text{m}^2$, y aproximadamente 1 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ y aproximadamente 200 $\mu\text{g}/\text{m}^2$. La dosis puede administrarse una vez al día, una vez a la semana, varias veces a la semana, pero menos de una vez al día; varias veces al mes, pero menos de una vez al día; varias veces al mes, pero menos de una vez por semana; una vez al mes o intermitentemente para aliviar los síntomas de la enfermedad. La administración puede continuar en cualquiera de los intervalos mencionados anteriormente hasta lograr la remisión del tumor o los síntomas del linfoma de la leucemia que se trata. La administración puede continuar después de lograr la remisión o el alivio de los síntomas, siempre que dicha remisión o alivio se mantengan debido a la administración continua.

La invención también proporciona un método para aliviar una enfermedad autoinmune, que comprende la administración al paciente con la enfermedad autoinmune de una cantidad terapéuticamente eficaz de conjugado de anticuerpo 10F4 humanizado con fármacos de cualquiera de las formas de realización precedentes. En las formas de realización preferentes, el anticuerpo se administra por vía intravenosa o subcutánea. El conjugado de anticuerpo con fármacos se administra por vía intravenosa con una dosis que varía entre aproximadamente 1 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ y aproximadamente 100 mg/m^2 por dosis, y en una forma de realización específica, la dosis es de entre 1 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ y aproximadamente 500 $\mu\text{g}/\text{m}^2$. La dosis puede administrarse una vez al día, una vez a la semana, varias veces a la semana, pero menos de una vez al día; varias veces al mes, pero menos de una vez al día; varias veces al mes, pero menos de una vez por semana; una vez al mes o intermitentemente para aliviar los síntomas de la enfermedad. La administración puede continuar en cualquiera de los intervalos mencionados anteriormente hasta lograr el alivio de los síntomas de la enfermedad autoinmune que se trata. La administración puede continuar después de lograr el alivio de los síntomas, siempre que dicho alivio se mantenga debido a la administración continua.

La invención también proporciona un método de tratamiento de un trastorno de las células B que comprende la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo humanizado 10F4 de cualquiera de las

formas de realización precedente a un paciente que padece un trastorno de células B, tal como un trastorno proliferativo de células B (incluyendo, entre otros, el linfoma y la leucemia) o una enfermedad autoinmune, dicho anticuerpo no está conjugado con una molécula citotóxica ni con una molécula detectable. Por lo general, el anticuerpo se administrará con una dosis que varía entre $1 \mu\text{g}/\text{m}^2$ y aproximadamente $1000 \text{ mg}/\text{m}^2$.

En un aspecto, la invención además proporciona formulaciones farmacéuticas que comprenden al menos un anticuerpo anti-CD22 de la invención, al menos un inmunoconjugado de éste o al menos un conjugado de anticuerpo anti-CD22 con fármacos de la invención, o todos los anteriores. En algunas formas de realización, una formulación farmacéutica comprende 1) un anticuerpo anti-CD22, un conjugado de anticuerpo anti-CD22 con fármacos o un inmunoconjugado de éste, o todos los anteriores, y 2) un vehículo farmacéuticamente aceptable. En algunas formas de realización, una formulación farmacéutica comprende 1) un anticuerpo anti-CD22 o un inmunoconjugado de éste, o ambos, y opcionalmente 2) al menos un agente terapéutico adicional.

Las formulaciones farmacéuticas que comprenden un anticuerpo, inmunoconjugado o un conjugado de anticuerpo anti-CD22 con fármacos de la invención se preparan para su almacenamiento mezclando el anticuerpo o el conjugado de anticuerpo con fármacos que tenga el grado de pureza deseado con vehículos, excipientes o estabilizadores opcionales que sean fisiológicamente aceptables (*Remington's Pharmaceutical Sciences* 16.^a edición, Osol, A. Ed. (1980)), en forma de formulaciones acuosas, liofilizadas u otras formulaciones liofilizadas. Los vehículos, excipientes o estabilizadores aceptables no son tóxicos para los receptores en todas las dosis y concentraciones empleadas, e incluyen soluciones tamponadas tales como fosfato, citrato, histidina y otros ácidos orgánicos; antioxidantes que incluyen ácido ascórbico y metionina; conservantes (como por ejemplo, cloruro amonio de octadecildimetilbencilo; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio, cloruro de benzetonio; alcohol bencilo, fenol o butilo benzil alcohol; alquilo parabeno como el metal o propel parabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); bajo peso molecular (menos de 10 residuos) polipéptidos; proteínas, como cera albúmina, gelatina, o inmunoglobulinas; polímeros hidroilicos como la polivinilpirrolidone; aminoácidos como glicerina, glutamina, asparagina, histidina, arginina, o lisina; monosacaridos, disacáridos y otros carbohidratos que incluyen glucosa, manosa, o dextrinas;

0

agentes quelantes como la EDTA; azúcares como sucrosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contra-iones de formación salina como el sodio; complejos metálicos (por ejemplo, complejos Zn-proteína); y/o tensoactivos no surfactantes como TWEEN™, PLURONICS™ o polietilenglicol (PEG). Las formulaciones farmacéuticas para administración *in vivo* deben ser, por lo general, estériles. Esto se logra mediante la filtración a través de membranas de filtración estériles.

Los principios activos también se pueden atrapar en microcápsulas preparadas, por ejemplo, mediante técnicas de coacervación o polimerización interfacial, por ejemplo, hidroximetilcelulosa o microcápsulas de gelatina y poli-(metilmetacrilato), respectivamente, en sistemas de administración de fármacos coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas), o en macroemulsiones. Dichas técnicas se dan a conocer en *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 16.^a edición, Oslo, A., Ed. (1980).

Se pueden elaborar preparaciones de liberación controlada. Ejemplos adecuados de preparaciones de liberación controlada incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el anticuerpo o inmunoconjugado de la invención, cuyas matrices están en forma de elementos moldeados, por ejemplo, películas o microcápsulas. Ejemplos de matrices de liberación controlada incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli-(2-hidroxietil-metacrilato), o poli-(vinilalcohol)), poliláctidos (patente de EE.UU. N.º 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutámico e γ etil-L-glutamato, acetato de etilenvinilo no degradable, copolímeros degradables de ácido glicólico-ácido láctico como por ejemplo LUPRON DEPOT™ (microesferas inyectables compuestas por copolímeros de ácido glicólico-ácido láctico y acetato de leuprolida) y ácido poli-D-(-)-3-hidroxibutírico. Mientras que los polímeros como el acetato de etilenvinilo y el ácido glicólico-ácido láctico permiten la liberación de moléculas por un período de 100 días, ciertos hidrogeles liberan proteínas durante períodos de tiempo menores. Cuando los anticuerpos o inmunoconjugados encapsulados permanecen en el organismo durante un largo periodo de tiempo, pueden desnaturalizarse o agregarse como resultado de la exposición a la humedad a 37 °C, resultando en una pérdida de la actividad biológica y en posibles cambios en la inmunogenicidad. Es posible concebir estrategias racionales para su estabilización dependiendo del mecanismo que intervenga. Por ejemplo, si se descubre que el mecanismo de agregación es de formación de

uniones intermoleculares S-S mediante el intercambio tio-disulfuro, se puede lograr la estabilización mediante la modificación de los residuos sulfhidrilos, liofilizando soluciones ácidas, controlando la humedad, utilizando aditivos adecuados y desarrollando composiciones de matrices de polímeros específicas.

Tratamientos de conjugados de anticuerpos con fármacos

Se contempla que el conjugado de anticuerpo con fármacos (ADC) de la presente invención puede utilizarse para tratar diversas enfermedades o trastornos, como por ejemplo, aquellos caracterizados por la sobreexpresión de un antígeno tumoral. Las afecciones o trastornos hiperproliferativos ejemplares incluyen tumores benignos y malignos, leucemia y neoplasias linfoides. Otros incluyen trastornos neuronales, gliales, astrocitales, hipotalámicos, glandulares, macrofágicos, epitetales, estromales, blastocéllicos, inflamatorios, angiogénicos e inmunológicos, incluyendo los autoinmunes.

Los componentes del ADC que se identifican en los modelos animales y ensayos con células pueden evaluarse en estudios clínicos de humanos y primates mayores con tumores. Se pueden diseñar estudios clínicos con humanos para evaluar la eficacia del anticuerpo monoclonal anti-CD22 o el inmunoconjugado de la invención en pacientes con trastornos proliferativos de células B, incluyendo, entre otros, el linfoma, linfoma no Hodgkins (LNH), LNH agresivo, LNH agresivo recurrente, LNH indolente recurrente, LNH refractario, LNH indolente refractario, leucemia linfocítica crónica (LLC), linfoma linfocítico de células pequeñas, leucemia, leucemia de células pilosas (LCP), leucemia linfocítica aguda (LLA) y linfoma de células del manto. El estudio clínico se puede diseñar para evaluar la eficacia de un ADC en combinación con regímenes terapéuticos conocidos, tales como la radiación o la quimioterapia, o ambas, que implican agentes quimioterapéuticos o citotóxicos conocidos.

Por lo general, la enfermedad o el trastorno que debe tratarse es una enfermedad hiperproliferativa, como por ejemplo, un trastorno proliferativo o un cáncer de células B, o ambos. En la presente memoria descriptiva, los ejemplos de cáncer que se tratarán incluyen, entre otros, trastornos proliferativos de células B que se seleccionan a partir del linfoma, linfoma no Hodgkins (LNH), LNH agresivo, LNH agresivo recurrente, LNH indolente recurrente, LNH refractario, LNH indolente refractario, leucemia linfocítica crónica (LLC), linfoma linfocítico de células pequeñas, leucemia, leucemia de células pilosas (LCP), leucemia linfocítica aguda (LLA) y linfoma de células del manto.

El cáncer puede comprender células que expresan CD22 para que los ADC de la presente invención sean capaces de unirse a las células cancerosas. Existen diversos ensayos diagnósticos/prognósticos para determinar la expresión de CD22 en el cáncer. En una forma de realización, la sobreexpresión de CD22 puede analizarse mediante un ensayo inmunohistoquímico (IHC). Las secciones de tejido de una biopsia tumoral embebidas en parafina pueden someterse a un ensayo IHC y evaluarse según el criterio de intensidad de tinción proteínica de CD22 con respecto al grado de tinción y la proporción de las células tumorales examinadas.

Para la prevención o tratamiento de la enfermedad, la dosis adecuada del ADC dependerá del tipo de enfermedad que se tratará, tal como se define anteriormente, la gravedad y el curso de la enfermedad, si la molécula se administra para fines preventivos o terapéuticos, la terapia anterior, la historia clínica del paciente y la respuesta al anticuerpo, y la discreción del médico tratante. La molécula se administra adecuadamente al paciente una vez o en una serie de tratamientos. Dependiendo del tipo y la gravedad de la enfermedad, una dosis inicial candidata para la administración en un paciente es de aproximadamente 1 µg/kg a 15 mg/kg (por ejemplo, 0,1-20 mg/kg) de la molécula, ya sea, por ejemplo, mediante una o más administraciones separadas o mediante una infusión continua. Una dosis diaria típica podría oscilar entre aproximadamente 1 µg/kg y 100 mg/kg o más, dependiendo de los factores mencionados anteriormente. Una dosis ejemplar de ADC que se administrará al paciente varía entre 0,1 y aproximadamente 10 mg/kg del peso del paciente.

Para administraciones repetidas durante varios días o más, dependiendo de la enfermedad, el tratamiento se mantiene hasta que se produzca la supresión deseada de los síntomas de la misma. Un ejemplo de la pauta posológica es la administración de una dosis inicial de carga de aproximadamente 4 mg/kg, seguida de una dosis de mantenimiento semanal de aproximadamente 2 mg/kg de un anticuerpo anti-ErbB2. Otras pautas posológicas pueden ser útiles. El progreso de este tratamiento se controla fácilmente mediante técnicas y ensayos convencionales.

Terapia combinada

Un conjugado de anticuerpo con fármacos (ADC) de la invención puede combinarse en una formulación farmacéutica combinada o una pauta posológica como una terapia combinada, con un segundo componente con propiedades

antineoplásicas. El segundo compuesto de la formulación farmacéutica combinada o la pauta posológica tiene preferentemente actividades complementarias al ADC de la combinación para que no se afecten de manera adversa entre sí.

El segundo compuesto puede ser un agente quimioterapéutico, un agente citotóxico, una citoquina, un agente inhibidor del crecimiento, un agente antihormonal o un cardioprotector, o todos los anteriores. Dichas moléculas están presentes en combinación en cantidades que son eficaces para el fin que se pretende. Una composición farmacéutica que contiene un ADC de la invención también puede tener una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente quimioterapéutico tal como un inhibidor que forma tubulina, un inhibidor de la topoisomerasa o un aglutinante a ADN.

En un aspecto, el primer compuesto es un ADC anti-CD22 de la invención y el segundo compuesto es un anticuerpo anti-CD20 (ya sea un anticuerpo desnudo o un ADC). En una forma de realización del segundo compuesto es el anticuerpo anti-CD20 rituximab (Rituxan®) o 2H7 (Genentech, Inc., South San Francisco, CA). Otros anticuerpos útiles para inmunoterapia combinada con los ADC anti-CD22 de la invención incluyen, entre otros, los anti-VEGF (por ejemplo, Avastin®).

Otros regímenes terapéuticos pueden combinarse con la administración de un agente antineoplásico identificado según esta invención, incluyendo, entre otros, la radioterapia, trasplantes de médula ósea o sangre periférica, un agente citotóxico, un agente quimioterapéutico o un agente inhibidor del crecimiento, o todos los anteriores. En una de estas formas de realización, un agente quimioterapéutico es un agente o una combinación de agentes, como por ejemplo, ciclofosfamida, hidroxidaunorubicina, adriamicina, doxorubicina, vincristina (Oncovin™), prednisolona, CHOP, CVP o COP, o inmunoterapéuticos tales como anti-CD20 (por ejemplo, Rituxan®) o anti-VEGF (por ejemplo, Avastin®). La terapia combinada puede administrarse como un régimen simultáneo o secuencial. Cuando se administra de manera secuencial, la combinación puede administrarse en dos o más administraciones. La administración combinada incluye la coadministración, utilizando formulaciones separadas o una única formulación farmacéutica, y la administración consecutiva en cualquier orden, en la que preferentemente exista un período en el cuál ambos (o todos los) agentes activos ejerzan simultáneamente sus actividades biológicas.

En una forma de realización, el tratamiento con un ADC supone la administración combinada de un agente antineoplásico identificado en la presente memoria descriptiva y uno o más agentes quimioterapéuticos o agentes inhibidores del crecimiento, incluida la coadministración de un cóctel de diferentes agentes quimioterapéuticos. Entre los agentes quimioterapéuticos están los taxanos (como paclitaxel y docetaxel) o antibióticos a base de antraciclina, o ambos. La preparación y programaciones de la dosis de dichos agentes quimioterapéuticos se pueden utilizar de acuerdo con las instrucciones del fabricante o como lo determine empíricamente el médico cualificado. La preparación y programación de la dosis para dicha quimioterapia también se describen en "*Chemotherapy Service*", (1992) Ed., M.C. Perry, Williams y Wilkins, Baltimore, Md.

Las dosis adecuadas para cualquiera de los agentes coadministrados antes mencionados son aquellas que se utilizan actualmente y pueden disminuirse debido a la acción combinada (sinergia) del agente identificado recientemente y otros agentes o tratamientos quimioterapéuticos.

La terapia combinada puede proporcionar "sinergia" y ser "sinérgico", es decir, el efecto que se logra cuando los ingredientes activos utilizados en conjunto es mayor a la suma de los efectos que se obtienen del uso de los componentes por separado. Se puede obtener un efecto sinérgico cuando los ingredientes activos se: (1) coformulan y administran simultáneamente en una formulación combinada de dosis unitaria; (2) se administran de manera alternada o paralela como formulaciones separadas; o (3) mediante algún otro régimen. Cuando se administran en una terapia alterna, se puede obtener un efecto sinérgico cuando los compuestos se administran secuencialmente, por ejemplo, mediante diferentes inyecciones en jeringas separadas. En general, durante la terapia alternada, se administra una dosis eficaz de cada ingrediente activo de manera secuencial, es decir, en serie, mientras que en la terapia combinada, las dosis eficaces de dos o más ingredientes activos se administran juntas.

Metabolitos de los conjugados de anticuerpos con fármacos

También se encuentran dentro del campo de esta invención los productos metabólicos *in vivo* de los compuestos de los ADC descritos en la presente memoria descriptiva, hasta el punto que estos productos son novedosos e imperceptibles hasta el momento. Dichos productos pueden originarse, por ejemplo, de la oxidación, reducción, hidrólisis, amidación, esterificación, escisión

enzimática, y similares, de los compuestos administrados. Por consiguiente, la invención incluye compuestos novedosos e imperceptibles producidos mediante un proceso que comprende establecer un contacto entre un compuesto de esta invención y un mamífero durante un periodo de tiempo suficiente para producir un producto metabólico de dicho compuesto.

Por lo general, los productos metabolitos se identifican al preparar un ADC radiomarcado (por ejemplo, ^{14}C o ^3H) que se administra parenteralmente a un animal, como por ejemplo, una rata, un ratón, un cobaya, un mono, o a un humano en una dosis detectable (por ejemplo, mayor a 0,5 mg/kg aproximadamente) y permitir el tiempo suficiente para que se produzca el metabolismo (por lo general, aproximadamente entre 30 segundos y 30 horas) y aislar sus productos de conversión de la orina, sangre u otras muestras biológicas. Estos productos se aíslan fácilmente ya que están marcados (otros se aíslan mediante el uso de anticuerpos capaces de unir epítomos que sobreviven en el metabolito). Las estructuras de los metabolitos se determinan de manera convencional, por ejemplo, mediante espectrometría de masas (MS), cromatografía líquida/espectrometría de masas (LC/MS) o resonancia magnética nuclear (NMR). En general, el análisis de metabolitos se realiza de la misma manera que los estudios convencionales del metabolismo de fármacos que son bien conocidos por los expertos en la materia. Los productos de conversión, siempre que no se encuentren *in vivo*, son útiles en los ensayos de diagnóstico para establecer las dosis terapéuticas de los compuestos de ADC de la invención.

Otros métodos de utilización de anticuerpos anti-CD22 e inmunoconjugados

Métodos diagnósticos y métodos de detección

En un aspecto, los anticuerpos anti-CD22 y los inmunoconjugados de la invención son útiles para detectar la presencia de CD22 en una muestra biológica. Por "detectar" se entiende en la presente memoria descriptiva una detección cuantitativa o cualitativa. En ciertas formas de realización, una muestra biológica comprende una célula o un tejido. En ciertas formas de realización, estos tejidos incluyen tejidos normales o cancerosos, o ambos, que expresan CD22 a niveles más altos que en otros tejidos, por ejemplo, células B o tejidos asociados a las células B, o ambos.

En un aspecto, la invención proporciona un método de detección de la presencia de CD22 en una muestra biológica. En ciertas formas de realización, el

método comprende establecer un contacto de la muestra biológica con un anticuerpo anti-CD22 en condiciones que faciliten la unión del anticuerpo anti-CD22 a CD22 y detectar si se ha formado un complejo entre el anticuerpo anti-CD22 y CD22.

En un aspecto, la invención proporciona un método para diagnosticar un trastorno asociado a un aumento de la expresión de CD22. En ciertas formas de realización, el método supone poner en contacto una célula de prueba con un anticuerpo anti-CD22; determinar el nivel de expresión (bien cuantitativo o cualitativo) de CD22 por la célula de prueba mediante la detección de la unión del anticuerpo anti-CD22 a CD22; y comparar el nivel de expresión de CD22 por la célula de prueba con el nivel de expresión de CD22 por una célula de control (por ejemplo, una célula normal del mismo origen tisular que la célula de prueba o una célula que exprese CD22 a niveles similares a dicha célula normal), donde un nivel más alto de expresión de CD22 de la célula de prueba con respecto a la célula de control indica la presencia de un trastorno asociado a un aumento de la expresión de CD22. En ciertas formas de realización, la célula de prueba se obtiene a partir de un sujeto que se sospecha que tiene un trastorno asociado a un aumento de la expresión de CD22. En ciertas formas de realización, el trastorno es un trastorno de proliferación celular, como un cáncer o un tumor.

Los trastornos proliferativos celulares ejemplares que pueden diagnosticarse mediante un anticuerpo de la invención incluyen un trastorno de células B o un trastorno proliferativo de células B, o ambos, incluyendo, entre otros, linfoma, linfoma no Hodgkins (LNH), LNH agresivo, LNH agresivo recurrente, LNH indolente recurrente, LNH refractario, LNH indolente refractario, leucemia linfocítica crónica (LLC), linfoma linfocítico de células pequeñas, leucemia, leucemia de células pilosas (LCP), leucemia linfocítica aguda (LLA) y linfoma de células del manto.

En ciertas formas de realización, un método de diagnóstico o detección, como los descritos anteriormente, comprende la detección de la unión de un anticuerpo anti-CD22 a CD22 expresado en la superficie de una célula o en una preparación de membrana obtenida de una célula que exprese CD22 en su superficie. En ciertas formas de realización, el método comprende establecer un contacto de una célula con un anticuerpo anti-CD22 en condiciones que faciliten la unión del anticuerpo anti-CD22 a CD22 y detectar si se ha formado un complejo entre el anticuerpo anti-CD22 y CD22 en la superficie celular. Un ensayo ejemplar

para detectar la unión de un anticuerpo anti-CD22 a CD22 que exprese CD22 en la superficie de una célula es un ensayo "FACS".

Se pueden utilizar otros métodos para detectar la unión de anticuerpos anti-CD22 a CD22. Estos métodos incluyen ensayos de unión a antígeno que son bien conocidos en la materia, como Western blot, radioinmunoensayos, ELISA (ensayos de inmunoabsorción enzimática), inmunoensayos tipo "sandwich", ensayos de inmunoprecipitación, inmunoensayos fluorescentes, inmunoensayos de proteína A y ensayos inmunohistoquímicos (IHC).

En ciertas formas de realización, los anticuerpos anti-CD22 están marcados. Las marcas incluyen marcas o fracciones que se detectan directamente (como etiquetas fluorescentes, cromofóricas, densas en electrones, quimioluminescentes y radioactivas), así como fracciones, como enzimas o ligandos, que se detectan indirectamente, por ejemplo, mediante una reacción enzimática o interacción molecular. Ejemplos de estos marcadores incluyen, entre otros, los radioisótopos ^{32}P , ^{14}C , ^{125}I , ^3H y ^{131}I , fluoróforos como algunos quelantes térreos raros o fluoresceína y sus derivados, rodamina y sus derivados, dansil, umbeliferon, luciferinas, por ejemplo, luciferasa de la luciérnaga y luciferasa bacteriana (patente de EE.UU. N.º 4.737.456), luciferina, 2,3-dihidroftalazinadionas, peroxidasa de rábano picante (HRP), fosfatasa alcalina, beta-galactosidasa, glucoamilasa, lisozima, oxidasas sacáridas, por ejemplo, glucosa oxidasa, galactosa oxidasa y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, oxidasas heterocíclicas como uricasa y xantina oxidasa, acopladas con una enzima que emplea peróxido de hidrógeno para oxidar un precursor de tinte como HRP, lactoperoxidasa o microperoxidasa, biotina/avidina, marcadores rotatorios, marcadores bacteriófagos, radicales libres estables y similares.

En ciertas formas de realización, los anticuerpos anti-CD22 están inmovilizados en una matriz insoluble. La inmovilización supone separar el anticuerpo anti-CD22 de cualquier CD22 que permanezca libre en solución. Tradicionalmente, esto se consigue bien insolubilizando el anticuerpo anti-CD22 antes del procedimiento de ensayo, o bien mediante adsorción en una superficie o matriz insoluble al agua (Bennich y col., patente de EE.UU. N.º 3.720.760), o bien mediante acoplamiento covalente (por ejemplo, usando reticulación con glutaraldehído), o bien mediante insolubilización del anticuerpo anti-CD22 después de la formación de un complejo entre el anticuerpo anti-CD22 y CD22, por ejemplo, mediante inmunoprecipitación.

para detectar la unión de un anticuerpo anti-CD22 a CD22 que exprese CD22 en la superficie de una célula es un ensayo "FACS".

Se pueden utilizar otros métodos para detectar la unión de anticuerpos anti-CD22 a CD22. Estos métodos incluyen ensayos de unión a antígeno que son bien conocidos en la materia, como Western blot, radioinmunoensayos, ELISA (ensayos de inmunoabsorción enzimática), inmunoensayos tipo "sandwich", ensayos de inmunoprecipitación, inmunoensayos fluorescentes, inmunoensayos de proteína A y ensayos inmunohistoquímicos (IHC).

En ciertas formas de realización, los anticuerpos anti-CD22 están marcados. Las marcas incluyen marcas o fracciones que se detectan directamente (como etiquetas fluorescentes, cromofóricas, densas en electrones, quimioluminescentes y radioactivas), así como fracciones, como enzimas o ligandos, que se detectan indirectamente, por ejemplo, mediante una reacción enzimática o interacción molecular. Ejemplos de estos marcadores incluyen, entre otros, los radioisótopos ^{32}P , ^{14}C , ^{125}I , ^3H y ^{131}I , fluoróforos como algunos quelantes térricos raros o fluoresceína y sus derivados, rodamina y sus derivados, dansil, umbeliferon, luciferinas, por ejemplo, luciferasa de la luciérnaga y luciferasa bacteriana (patente de EE.UU. N.º 4.737.456), luciferina, 2,3-dihidroftalazinadionas, peroxidasa de rábano picante (HRP), fosfatasa alcalina, beta-galactosidasa, glucoamilasa, lisozima, oxidasas sacáridas, por ejemplo, glucosa oxidasa, galactosa oxidasa y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, oxidasas heterocíclicas como uricasa y xantina oxidasa, acopladas con una enzima que emplea peróxido de hidrógeno para oxidar un precursor de tinte como HRP, lactoperoxidasa o microperoxidasa, biotina/avidina, marcadores rotatorios, marcadores bacteriófagos, radicales libres estables y similares.

En ciertas formas de realización, los anticuerpos anti-CD22 están inmovilizados en una matriz insoluble. La inmovilización supone separar el anticuerpo anti-CD22 de cualquier CD22 que permanezca libre en solución. Tradicionalmente, esto se consigue bien insolubilizando el anticuerpo anti-CD22 antes del procedimiento de ensayo, o bien mediante adsorción en una superficie o matriz insoluble al agua (Bennich y col., patente de EE.UU. N.º 3.720.760), o bien mediante acoplamiento covalente (por ejemplo, usando reticulación con glutaraldehído), o bien mediante insolubilización del anticuerpo anti-CD22 después de la formación de un complejo entre el anticuerpo anti-CD22 y CD22, por ejemplo, mediante inmunoprecipitación.

977

Cualquiera de las formas de realización anteriores para diagnóstico o detección se pueden llevar a cabo utilizando un inmunoconjugado de la invención en lugar de un anticuerpo anti-CD22 o en adición a él.

Métodos terapéuticos

Un anticuerpo o inmunoconjugado de la invención se pueden usar, por ejemplo, en métodos terapéuticos *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo*. En un aspecto, la invención proporciona métodos para inhibir el crecimiento o la proliferación celular bien *in vivo* o *in vitro* y dicho método comprende la exposición de una célula a un anticuerpo anti-CD22 o un inmunoconjugado del mismo en condiciones que faciliten la unión del inmunoconjugado a CD22. "Inhibir el crecimiento o proliferación celular" supone reducir el crecimiento o proliferación de una célula en al menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% o 100% e incluye inducir la muerte celular. En ciertas formas de realización, la célula es una célula tumoral. En ciertas formas de realización, la célula es una célula B. En ciertas formas de realización, la célula es un xenotrasplante, por ejemplo, como se ejemplifica en la presente memoria descriptiva.

En un aspecto, un anticuerpo o inmunoconjugado de la invención se usa para tratar o prevenir un trastorno proliferativo de células B. En ciertas formas de realización, el trastorno de proliferación celular se asocia a un aumento de la expresión o actividad, o ambas, de CD22. Por ejemplo, en ciertas formas de realización, el trastorno proliferativo de células B se asocia a un aumento de la expresión de CD22 en la superficie de una célula B. En ciertas formas de realización, el trastorno proliferativo de células B es un tumor o cáncer. Los ejemplos de trastornos proliferativos de células B que se tratan mediante anticuerpos o inmunoconjugados de la invención incluyen, entre otros, linfoma, linfoma no Hodgkins (LNH), LNH agresivo, LNH agresivo recurrente, LNH indolente recurrente, LNH refractario, LNH indolente refractario, leucemia linfocítica crónica (LLC), linfoma linfocítico de células pequeñas, leucemia, leucemia de células pilosas (LCP), leucemia linfocítica aguda (LLA) y linfoma de células del manto.

En un aspecto, la invención proporciona métodos para el tratamiento de un trastorno proliferativo de células B que comprende la administración a un sujeto de una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-CD22 o un inmunoconjugado de éste. En ciertas formas de realización, un método para el tratamiento de un trastorno proliferativo de células B supone la administración a un sujeto de una cantidad eficaz de una formulación farmacéutica que comprenda un anticuerpo

274

anti-CD22 o inmunoconjugado anti-CD22 y, opcionalmente, al menos un agente terapéutico adicional, como los que se proporcionan más adelante. En ciertas formas de realización, un método para el tratamiento de un trastorno de proliferación celular supone la administración a un sujeto de una cantidad eficaz de una formulación farmacéutica que comprenda 1) un inmunoconjugado que contenga un anticuerpo anti-CD22 y un agente citotóxico, y, opcionalmente, 2) al menos un agente terapéutico adicional, como los que se proporcionan más adelante.

En un aspecto, al menos algunos de los anticuerpos o inmunoconjugados de la invención se pueden unir a CD22 de especies distintas a la humana. Por consiguiente, los anticuerpos o inmunoconjugados de la invención pueden usarse para unirse a CD22, por ejemplo, en un cultivo celular que contenga CD22, en humanos o en otros mamíferos que tengan un CD22 con el que un anticuerpo o inmunoconjugado de la invención reaccione (por ejemplo, chimpancé, babuino, tití, macaco de Java y macaco de la India, cerdo o ratón). En una forma de realización, un anticuerpo anti-CD22 o inmunoconjugado puede utilizarse para que CD22 actúe sobre las células B al poner en contacto un anticuerpo o inmunoconjugado con CD22 para formar un anticuerpo o complejo antígeno-inmunoconjugado, de manera que una citotoxina conjugada del inmunoconjugado ingrese al interior de la célula. En una forma de realización, el CD22 es CD22 humano.

En una forma de realización, un anticuerpo anti-CD22 o un inmunoconjugado se puede utilizar en un método para unir CD22 en un sujeto que padezca un trastorno asociado a un aumento de la expresión y/o actividad de CD22 y dicho método comprende la administración al sujeto del anticuerpo o inmunoconjugado de forma que, en el sujeto, se una el CD22. En una forma de realización, el anticuerpo o inmunoconjugado unido se internaliza en las células B que expresan CD22. En una forma de realización, CD22 es CD22 humano y el sujeto es un humano. Alternativamente, el sujeto puede ser un mamífero que exprese CD22 al que se une un anticuerpo anti-CD22. Además, el sujeto puede ser un mamífero al que se le ha introducido CD22 (por ejemplo, mediante la administración de CD22 o mediante la expresión de un trasgén que codifique CD22).

Un anticuerpo anti-CD22 o un inmunoconjugado puede administrarse a un humano con fines terapéuticos. Además, un anticuerpo anti-CD22 o un

227

inmunoconjugado puede administrarse a mamíferos no humanos que expresan CD22 con el que el anticuerpo reaccione (por ejemplo, primate, cerdo, rata o ratón) para fines veterinarios o como modelo animal de una enfermedad humana. Sobre esto último, dichos modelos animales pueden ser útiles para evaluar la eficacia terapéutica de los anticuerpos o inmunoconjugados de la invención (por ejemplo pruebas de dosis y periodos de administración).

Los anticuerpos o inmunoconjugados de la invención se pueden usar solos o junto con otras composiciones en un tratamiento. Por ejemplo, un anticuerpo o inmunoconjugado de la invención se puede administrar conjuntamente con al menos un agente terapéutico adicional y/o adyuvante. En ciertas formas de realización, un agente terapéutico adicional es un agente citotóxico, un agente quimioterapéutico o un agente inhibidor del crecimiento. En una de estas formas de realización, un agente quimioterapéutico es un agente o una combinación de agentes, como por ejemplo, ciclofosfamida, hidroxidaunorubicina, adriamicina, doxorubicina, vincristina (Oncovin™), prednisolona, CHOP, CVP o COP, o inmunoterapéuticos tales como anti-CD20 (por ejemplo, Rituxan®) o anti-VEGF (por ejemplo, Avastin®), donde la terapia combinada es útil en el tratamiento de cánceres o trastornos de células B, o ambos, como por ejemplo, trastornos proliferativos de células B, incluyendo, linfoma, linfoma no Hodgkins (NHL), NHL agresivo, NHL agresivo recurrente, NHL indolente recurrente, NHL refractario, NHL indolente refractario, leucemia linfocítica crónica (LLC), linfoma linfocítico de células pequeñas, leucemia, leucemia de células pilosas (LCP), leucemia linfocítica aguda (LLA) y linfoma de células del manto.

Las terapias combinadas descritas anteriormente incluyen administración combinada (en la que los dos o más agentes se incluyen en la misma o en formulaciones separadas), y administración separada, en cuyo caso, la administración del anticuerpo o inmunoconjugado de la invención puede ocurrir con anterioridad, simultáneamente y/o después de la administración de la terapia o terapias adicionales y/o complementarias. Los anticuerpos o inmunoconjugados de la invención se pueden también usar en combinación con radioterapia.

Un anticuerpo o inmunoconjugado de la invención (y agente terapéutico adicional o complementario) puede administrarse por cualquier medio apto, incluyendo las vías parenteral, subcutánea, intraperitoneal, intrapulmonar e intranasal, y, si se desea para tratamiento local, la vía intralesional. Las infusiones parentales incluyen la administración intramuscular, intravenosa, intraarterial,

intraperitoneal y subcutánea. Además, el anticuerpo o inmunoconjugado se administra correctamente mediante infusión de efecto rápido con dosis del anticuerpo o inmunoconjugado cada vez menores. La dosificación puede realizarse mediante cualquier vía adecuada, por ejemplo, mediante inyecciones vía intravenosa o subcutánea, dependiendo en parte de si la administración es breve o crónica.

La composición de anticuerpos o inmunoconjugados de la invención debería formularse, dosificarse y administrarse de una manera consistente empleando una práctica médica adecuada. Los factores a considerar en este contexto incluyen el trastorno específico sometido a tratamiento, el mamífero específico sometido a tratamiento, el estado clínico del paciente, la causa del trastorno, la localización de la administración del agente, el método de administración, la regulación de la administración y otros factores conocidos por los facultativos. El anticuerpo o inmunoconjugado puede formularse opcionalmente con uno o más agentes utilizados actualmente para prevenir o tratar el trastorno en cuestión. La cantidad eficaz de dichos agentes depende de la cantidad de anticuerpo o inmunoconjugado presente en la formulación, el tipo de trastorno o tratamiento, y otros factores ya abordados con anterioridad. Estos son generalmente usados en las mismas dosis y con las mismas vías de administración descritas en la presente memoria descriptiva o aproximadamente entre 1 y 99% de las dosis descritas en la misma, o en cualquier dosis y mediante cualquier vía empírica y clínicamente considerada apropiada.

Para la prevención o tratamiento de la enfermedad, la dosis adecuada de un anticuerpo o inmunoconjugado de la invención (cuando se utiliza aislado o en combinación con uno o más agentes terapéuticos adicionales como los quimioterapéuticos) dependerá del tipo de enfermedad que se tratará, el tipo de anticuerpo o inmunoconjugado, la gravedad y el curso de la enfermedad, de si el anticuerpo o inmunoconjugado se administra para fines preventivos o terapéuticos, la terapia anterior, la historia clínica del paciente y la respuesta al anticuerpo o inmunoconjugado y la discreción del médico tratante. El anticuerpo o inmunoconjugado se administra adecuadamente al paciente una vez o en una serie de tratamientos. Dependiendo del tipo y la gravedad de la enfermedad, una dosis inicial candidata para la administración en un paciente es de aproximadamente 1 µg/kg a 100 mg/kg (por ej. 0,1mg/kg-20mg/kg) de anticuerpo o inmunoconjugado, ya sea, por ejemplo, mediante una o más administraciones

separadas o mediante una infusión continua. Una dosis diaria normal puede oscilar entre aproximadamente 1 µg/kg a 100 mg/kg o más, dependiendo de los factores anteriormente mencionados. Para administraciones repetidas durante varios días o más, dependiendo de la enfermedad, el tratamiento se mantendría, por lo general, hasta que ocurriese una supresión deseada de los síntomas de la misma. Un ejemplo de dosis del anticuerpo o inmunoconjugado se encontraría en el intervalo de aproximadamente 0,05 mg/kg y aproximadamente 10 mg/kg. Por lo tanto, se puede administrar al paciente una o más dosis de aproximadamente 0,5 mg/kg, 2,0 mg/kg, 4,0 mg/kg o 10 mg/kg (o cualquier combinación de las mismas) de anticuerpo o inmunoconjugado. Dichas dosis pueden administrarse de manera intermitente, por ejemplo, una vez por semana o cada tres semanas (por ejemplo, de modo que el paciente reciba aproximadamente de dos a veinte, o por ejemplo, aproximadamente seis dosis del anticuerpo o inmunoconjugado). Se puede administrar una mayor carga de dosis inicial seguida de una o más dosis menores. Un ejemplo de pauta posológica comprende la administración de una dosis inicial aproximada de 4 mg/kg, seguida de una dosis de mantenimiento semanal de aproximadamente 2 mg/kg del anticuerpo. No obstante, también pueden ser útiles otras pautas posológicas. El progreso de este tratamiento se controla fácilmente mediante técnicas y ensayos convencionales.

Ensayos

Los anticuerpos anti-CD22 o inmunoconjugados de la invención pueden caracterizarse por sus propiedades físico-químicas o por sus actividades biológicas, o ambas, mediante varios ensayos conocidos en la especialidad.

Ensayos de actividad

En un aspecto, se proporcionan ensayos para la identificación de anticuerpos anti-CD22 o inmunoconjugados de los mismos con actividad biológica. La actividad biológica puede incluir, por ejemplo, la capacidad de inhibir el crecimiento o proliferación celular (por ejemplo, actividad de "destrucción celular"), o la capacidad de inducir la muerte celular, incluida la muerte celular programada (apoptosis). También se proporcionan anticuerpos o inmunoconjugados con dicha actividad biológica *in vivo* y/o *in vitro*.

En ciertas formas de realización, se comprueba la capacidad de un anticuerpo anti-CD22 o un inmunoconjugado de éste para inhibir el crecimiento o proliferación celular *in vitro*. Los ensayos para la inhibición del crecimiento o proliferación celular son bien conocidos en la materia. Determinados ensayos para

270

la proliferación celular, ejemplificados mediante ensayos “de destrucción de células” descritos en la presente memoria descriptiva, miden la viabilidad celular. Uno de estos ensayos es el ensayo de viabilidad celular por luminiscencia CellTiter-Glo™, que está comercialmente disponible en Promega (Madison, WI). Este ensayo determina el número de células viables en cultivo basado en cuantificación de ATP presente, que indica las células activas metabólicamente. Véase Crouch y col., (1993) *J. Immunol. Meth.* 160:81-88, patente de EE.UU: N.º 6602677. El ensayo puede realizarse en un formato de 96 ó 384 pocillos, lo que hace posible su uso para detección automatizada de alto rendimiento (HTS). Véase Cree y col., (1995) *AntiCancer Drugs* 6:398-404. El procedimiento de este ensayo supone añadir un único reactivo (Reactivo CellTiter-Glo®) directamente a las células en el cultivo. Ello da lugar a lisis celular y generación de una señal luminescente producida por una reacción con luciferasa. La señal luminescente es proporcional a la cantidad de ATP presente, que es directamente proporcional al número de células viables presentes en el cultivo. Los datos se pueden registrar mediante un luminómetro o un dispositivo de captación de imágenes mediante cámara CCD. La producción de luminiscencia se expresa como unidades de luz relativas (RLU).

Otro ensayo para la proliferación celular es el ensayo “MMT” un ensayo colorimétrico que mide la oxidación de bromuro 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium a formazan mediante reductasa mitocondrial. Como el ensayo CellTiter-Glo™, este ensayo indica el número de células metabólicamente activas presentes en un citocultivo. Véase, por ejemplo, Mosmann (1983) *J. Immunol. Meth.* 65:55-63, y Zhang y col. (2005) *Cancer Res.* 65:3877-3882.

En un aspecto, se comprueba la capacidad de un anticuerpo anti-CD22 para inducir muerte celular *in vitro*. Los ensayos para la inducción de la muerte celular son bien conocidos en la materia. En algunas formas de realización, estos ensayos miden, por ejemplo, la pérdida de integridad de la membrana, como se indica mediante absorción de yoduro de propidio (PI), azul de tripan (véase Moore y col. (1995) *Cytotechnology*, 17:1-11), o 7AAD. En un ensayo ejemplar de absorción de PI, las células se cultivan en medio Dulbecco's Modified Eagle Medium (D-MEM):Ham's F-12 (50:50) enriquecido con 10% de FBS inactivado por calor (Hyclone) y 2 mM de L-glutamina. De este modo, el ensayo se realiza en ausencia de complemento e inmunocitos efectores. Las células se siembran a una densidad de 3×10^6 por placa en placas de 100 x 20 mm y se deja que se

emparejen durante la noche. Después el medio se retira y se reemplaza con un medio nuevo solo o que contenga diversas concentraciones del anticuerpo o inmunoconjugado. Las células se incuban durante 3 días. Tras el tratamiento, las monocapas se lavan con PBS y se separan mediante tripsinización. A continuación, las células se centrifugan a 1200 rpm durante 5 minutos a 4 °C; el pellet se resuspende en 3 ml de solución tamponada fría de unión a Ca^{2+} (10 mM Hepes, pH 7,4, 140 mM NaCl, 2,5 mM CaCl_2) y se alicuotan en tubos de 35 mm con filtro de 12 x 75 mm (1 ml por tubo, 3 tubos por grupo de tratamiento) para la eliminación de la agregación celular. Los tubos reciben entonces el PI (10 $\mu\text{g/ml}$). Las muestras se analizan utilizando un citómetro de flujo FACSCAN™ y software FACSCONVERT™ CellQuest (Becton Dickinson). Se identifican así los anticuerpos o inmunoconjugados que inducen niveles estadísticamente significativos de muerte celular, como se determina mediante absorción de PI.

En un aspecto, se comprueba la capacidad de un anticuerpo anti-CD22 o inmunoconjugado para inducir la apoptosis (muerte celular programada) *in vitro*. Un ensayo ejemplar para anticuerpos o inmunoconjugados que inducen la apoptosis es un ensayo de unión a anexina. En un ensayo ejemplar de unión a anexina, las células se cultivan y se siembran en placas tal y como se describe en el párrafo anterior. Después el medio se retira y se reemplaza con un medio nuevo solo o que contenga de 0,001 a 10 $\mu\text{g/ml}$ del anticuerpo o inmunoconjugado. Después de un período de incubación de tres días, las monocapas se lavan con PBS y se separan por tripsinización. Después, las células se centrifugan, se resuspenden en un tampón de unión a Ca^{2+} y se alicuotan en tubos tal y como se describe anteriormente. Después, se añade a los tubos la anexina marcada (por ejemplo, anexina V-FTIC) (1 $\mu\text{g/ml}$). Las muestras se analizan utilizando un citómetro de flujo FACSCAN™ y software FACSCONVERT™ CellQuest (BD Biosciences). Se identifican así los anticuerpos o inmunoconjugados que inducen niveles estadísticamente significativos de unión a anexina con respecto a controles. Otro ensayo ejemplar para anticuerpos o inmunoconjugados que inducen apoptosis es un ensayo colorimétrico ELISA con complejos ADN-histonas para la detección de degradación internucleosomal de ADN genómico. Este ensayo se puede llevar a cabo utilizando, por ejemplo, el Kit ELISA de detección de muerte celular (Roche, Palo Alto, CA).

Las células para uso en cualquiera de los ensayos *in vitro* anteriores incluyen células o líneas celulares que expresan naturalmente CD22 o que se han

240

diseñado para expresar CD22. Estas células incluyen células tumorales que sobreexpresan CD22 con respecto a células normales del mismo origen tisular. Estas células también incluyen líneas celulares (incluidas líneas celulares tumorales) que expresan CD22 y líneas celulares que normalmente no expresan CD22 pero han sido transfectadas con ácido nucleico que codifica CD22.

En un aspecto, se comprueba la capacidad de un anticuerpo anti-CD22 o un inmunoconjugado del mismo para inhibir el crecimiento o proliferación celular *in vivo*. En ciertas formas de realización, se comprueba la capacidad de un anticuerpo anti-CD22 o un inmunoconjugado del mismo para inhibir el crecimiento tumoral *in vivo*. Los sistemas de modelos *in vivo*, como modelos xenotrasplantados, se pueden utilizar para estas pruebas. En un sistema xenotrasplantado ejemplar, las células tumorales humanas se introducen en un animal no humano inmunodeprimido apto, por ejemplo, un ratón SCID. Se administra al animal un anticuerpo o inmunoconjugado de la invención. Se mide la capacidad del anticuerpo o inmunoconjugado para inhibir o reducir el crecimiento tumoral. En ciertas formas de realización del sistema xenotrasplantado anterior, las células tumorales humanas son células tumorales procedentes de un paciente humano. Estas células que son útiles para preparar modelos xenotransplantados incluyen leucemia humana y líneas celulares de linfomas, que incluyen, entre otras, las células BJAB-luc (una línea celular de linfoma de Burkitt EBV-negativa transfectada con el gen indicador de luciferasa), células Ramos (ATCC, Manassas, VA, CRL-1923), células Raji (ATCC, Manassas, VA, CCL-86), células SuDHL-4 (DSMZ, Braunschweig, Germany, AAC 495), células DoHH2 (véase Kluin-Neilemans, H.C. y col., *Leukemia* 5:221-224 (1991), y Kluin-Neilemans, H.C. y col., *Leukemia* 8:1385-1391 (1994)), células Granta-519 (véase Jadayel, D.M. y col., *Leukemia* 11(1):64-72 (1997)). En ciertas formas de realización, las células tumorales humanas se introducen en un animal no humano debidamente inmunodeprimido mediante inyección subcutánea o mediante trasplante en un sitio apto, como panículos adiposos mamarios.

Ensayos de unión y otros ensayos

En un aspecto, se prueba la actividad de unión de un anticuerpo anti-CD22 al antígeno. Por ejemplo, en ciertas formas de realización, se comprueba la capacidad de un anticuerpo anti-CD22 para unirse a CD22 expresado en la superficie de una célula. Para realizar esta prueba puede utilizarse un ensayo FACS.

241

En un aspecto, los ensayos de competición pueden utilizarse para identificar un anticuerpo monoclonal que compite con un anticuerpo murino 10F4.4.1, un anticuerpo humanizado 10F4v1, un anticuerpo humanizado 10F4v3 o un anticuerpo murino 5E8.1.8, o todos los anteriores, para que se unan a CD22. En ciertas formas de realización, este anticuerpo competitivo se une al mismo epítipo (por ejemplo, un epítipo lineal o conformacional) que se une mediante un anticuerpo murino 10F4.4.1, un anticuerpo humanizado 10F4v1, un anticuerpo humanizado 10F4v3 o un anticuerpo murino 5E8.1.8., o todos los anteriores. Entre los ensayos de competición ejemplares se incluyen, entre otros, los ensayos habituales como los indicados en Harlow y Lane (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual* ch.14 (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY). Métodos ejemplares detallados para el mapeo de un epítipo al que se une un anticuerpo se señalan en Morris (1996) "Epitope Mapping Protocols," en *Methods in Molecular Biology* vol. 66 (Humana Press, Totowa, NJ). Se dice que dos anticuerpos se unen al mismo epítipo si cada uno bloquea la unión del otro en un 50% o más.

En un ensayo de competición ejemplar, un CD22 inmovilizado se incuba en una solución que comprenda un primer anticuerpo marcado que se una a CD22 (por ejemplo, un anticuerpo murino 10F4.4.1, un anticuerpo humanizado 10F4v1, un anticuerpo humanizado 10F4v3 o un anticuerpo murino 5E8.1.8.) y un segundo anticuerpo sin marcar del que se comprueba su capacidad para competir con el primero para su unión a CD22. El segundo anticuerpo puede estar presente en un sobrenadante de hibridoma. Como control, se incuba un CD22 inmovilizado en una solución que contenga el primer anticuerpo marcado pero no el segundo anticuerpo no marcado. Tras la incubación en condiciones que favorezcan la unión del primer anticuerpo a CD22, se elimina el anticuerpo no unido sobrante y se mide la cantidad de marcador asociada a CD22 inmovilizado. Si la cantidad de marcador asociada a CD22 inmovilizado es sustancialmente reducida en la muestra de prueba con respecto a la muestra de control, esto indica que el segundo anticuerpo está compitiendo con el primero para la unión a CD22. En ciertas formas de realización, un CD22 inmovilizado está presente en la superficie de una célula o en una preparación de membrana obtenida a partir de una célula que exprese CD22 en su superficie.

En un aspecto, los anticuerpos purificados anti-CD22 se pueden caracterizar además mediante una serie de ensayos que incluyen, entre otros, la

secuenciación del extremo N-terminal, el análisis de aminoácidos, la cromatografía líquida de alta resolución no desnaturizante de exclusión por tamaño (HPLC), la espectrometría de masas, la cromatografía de intercambio iónico y la digestión con papaína.

En una forma de realización, la invención contempla un anticuerpo alterado que tiene algunas, pero no la totalidad, de las funciones efectoras, lo que le convierte en un candidato deseable para muchas aplicaciones en las que la semivida del anticuerpo *in vivo* es importante, pero determinadas funciones efectoras (como complemento y ADCC) son innecesarias o dañinas. En ciertas formas de realización, se miden las actividades Fc del anticuerpo para asegurar que sólo se mantienen las propiedades deseadas. Se pueden llevar a cabo ensayos de citotoxicidad *in vitro* o *in vivo* para confirmar la reducción/disminución de actividades de CDC o ADCC, o ambos. Por ejemplo, los ensayos de unión del receptor Fc (FcR) pueden realizarse para asegurar que el anticuerpo carece de unión a FcγR (por eso es probable que carezca de actividad ADCC), pero conserva la capacidad de unión a FcRn. Las células primarias para mediar en la ADCC, células NK, expresan sólo Fc(RIII, mientras que los monocitos expresan Fc(RI, Fc(RII y Fc(RIII. La expresión del FcR en células hematopoyéticas se resume en la Tabla 3 de la página 464 de Ravetch y Kinet, *Annu. Rev. Immunol.*, 9:457-92 (1991). Se describe un ejemplo de un ensayo *in vitro* para evaluar la actividad ADCC de una molécula de interés en la patente de EE.UU. N.º 5.500.362 ó 5.821.337. Entre las células efectoras útiles para tales ensayos se encuentran las células mononucleares de la circulación periférica (PBMC) y las células asesinas (NK). Como alternativa, o adicionalmente, la actividad de ADCC de la molécula de interés se puede evaluar *in vivo*, por ejemplo, en un modelo animal como el que se desvela en Clynes y col., *PNAS (USA)*, 95:652-656 (1998). También se pueden llevar a cabo los ensayos de unión C1q para confirmar que el anticuerpo no puede unirse al C1q y por ello carece de actividad CDC. A fin de evaluar la activación del complemento, se puede efectuar un ensayo de CDC, por ejemplo, tal como se describe en Gazzano-Santoro y col., *J. Immunol. Methods*, 202:163 (1996). También se pueden realizar la unión de FcRn y eliminación *in vivo*/determinaciones de semivida con el uso de métodos conocidos en la materia.

EJEMPLOS

A continuación se muestran ejemplos de los métodos y composiciones de la invención. A partir de la descripción general proporcionada anteriormente, se entiende que se pueden dar varias formas de realización.

Ejemplo 1: Preparación del anticuerpo monoclonal murino CD22 antihumano

Se prepararon anticuerpos monoclonales murinos capaces de unir específicamente CD22 humano. Los panículos de las patas de ratones hembra BALB/c de seis semanas se inmunizaron con el dominio extracelular CD22 humano marcado con 8 his que carece de los dominios 3 y 4 (identificador de secuencia n.º: 30 (ECD) más la secuencia GRAHHHHHHHH en el extremo C-terminal) o el dominio extracelular CD22 marcado con 8 his que comprende los dominios del 1 al 7 (identificador de secuencia n.º: 28 (ECD) más la marca de secuencia His mencionada anteriormente) en el adyuvante de Ribi. Se administraron inyecciones posteriores de la misma manera a la primera y tercera semana tras las inmunizaciones iniciales. Tres días después de la inyección final, se retiraron y analizaron los ganglios linfáticos poplíteos e inguinales y se realizó una suspensión unicelular al pasar el tejido a través de una gasa de acero. Las células se fusionaron a una proporción 4:1 con mielomas de ratón tal como P3X63-Ag8.653 (ATCC CRL 1580) con alto contenido de glucosa (DMEM) con un 50% p/v de polietilenglicol 4000. A continuación, las células fusionadas se colocaron sobre una placa a una densidad de 2×10^5 por pocillo en placas de cultivo de tejido de 96 pocillos. Después de 24 horas, se agregó un medio HAT selectivo (hipoxantina/aminopterina/timidina, Sigma, #H0262). Quince días después de la fusión, se evaluaron los sobrenadantes de células de crecimiento para comprobar la presencia de anticuerpos específicos para el CD22 humano mediante un ensayo de inmunoabsorción enzimática (ELISA).

Se seleccionaron anticuerpos monoclonales murinos antihumanos CD22 10F4.4.1 (mu 10F4) y 5E8.1.8 (mu 5E8) para someterlos a un estudio basado en ensayos con células y ensayos en placas que indicaron que los anticuerpos se unen específicamente al CD22 humano. Los ensayos se describen en los siguientes párrafos.

Ensayo ELISA: La detección del anticuerpo anti-CD22 mediante el ensayo ELISA se realizó de la siguiente manera; todas las incubaciones se realizan a temperatura ambiente. Las placas de prueba (pocillos Nunc) se recubrieron durante 2 horas con CD22 purificado en 50 mM de tampón de carbonato de sodio,

274

pH 9,6, después se bloquearon con 0,5% de albúmina de suero bobino en solución salina fosfatada (PBS) durante 30 minutos, y se lavaron cuatro veces con PBS con un 0,05% de Tween 20 (PBST). Se agregaron los sobrenadantes de anticuerpos, se incubaron durante dos horas con agitación y después se lavaron cuatro veces con PBST. Las placas se desarrollaron al agregar 100 µl por pocillo de una solución que contiene 10 mg de o-fenilendiamina dihidrocloruro (Sigma, #P8287) y 10 ml de una solución al 30% de peróxido de hidrógeno en 25 ml de tampón de citrato de fosfato, pH 5,0, y se incuban durante 15 minutos. La reacción se detiene al agregar 100 µl por pocillo de ácido sulfúrico de 2,5 M. Los datos se obtienen mediante la lectura de las placas en un lector de placas ELISA automatizado a una absorbancia de 490 nm.

Ejemplo 2: Ensayo FACS para analizar los anticuerpos monoclonales CD22 antihumanos (MAbs).

Las células CHO que expresan CD22 humano en la superficie se incubaron con un sobrenadante del hibridoma anti-CD22 en 100 µl de tampón FACS (0,1% de BSA, 10 mM de azida sódica en PBS, pH 7,4) durante 30 minutos a 4 °C y se lavaron una vez con el tampón FACS. La cantidad de unión a anti-CD22 se determinó mediante la incubación de una alícuota de la mezcla de anticuerpos y células con un anti-IgG de ratón en cabra o conejo conjugado con FITC policlonal (Accurate Chem. Co., Westbury, NY) (para anticuerpos de prueba murinos) o IgG antihumano de cabra o conejo (para anticuerpos humanizados) durante 30 minutos a 4 °C y se lavó tres veces con el tampón FACS.

Ejemplo 3: Preparación de anticuerpos anti-CD22 humanizados

Se generaron anticuerpos 10F4 humanizados en donde los residuos de aminoácidos de la región hipervariable (HVR) (llamadas indistintamente regiones determinantes de la complementariedad o CRD) se modificaron a través de mutagénesis dirigida al sitio (Kunkel y col., *Methods Enzymol.* (1987), 154:367-382) para obtener dos variantes, 10F4v1 humanizado y 10F4v2 humanizado (también llamados en la presente memoria descriptiva "10F4v1," "hu10F4v1," "10F4v2" o "hu10F4v2," respectivamente). Una tercera versión, 10F4v3 humanizado ("10F4v3" o "hu10Fv3"), que se utiliza en algunos estudios descritos en la presente memoria descriptiva, tiene las mismas secuencias de aminoácidos de la cadena ligera y pesada para la proteína madura que hu10F4v2, pero comprende una secuencia de señal diferente en el vector utilizado para la expresión de la proteína.

247

La humanización del anticuerpo murino 10F4 se realizó tal como se detalla en la presente memoria descriptiva. En resumen, las regiones hipervariables de las cadenas ligera y pesada del 10F4 murino se clonaron en secuencias de estructuras de consenso modificadas para generar las secuencias de aminoácidos de regiones variables de la cadena ligera y pesada, tal como se muestran en la Figura 2A y 2B. Las secuencias de estructuras de la cadena ligera y pesada alternativas que pueden utilizarse como secuencias de estructuras de anticuerpos de la invención se muestran en las Figuras 3 y 4.

Para la humanización del anticuerpo 10F4 se utilizó un vector (pV0350-2B) fagémido que representa un Fab-g3 monovalente con dos estructuras de lectura abierta bajo el control del promotor *phoA*, particularmente como se describe en Lee y col., *J. Mol. Biol.* 340:1073-93 (2004). La primera estructura de lectura abierta comprende la secuencia de señal termoestable STII *E. coli* para la secreción de proteínas fusionada con los dominios VL y CH1 de la secuencia de la cadena ligera del aceptor. La segunda estructura de lectura comprende la secuencia de señal STII fusionada con los dominios VH y CH1 de la secuencia de la cadena pesada del aceptor seguido de una proteína P3 de revestimiento menor truncada.

Los dominios VH y VL del 10F4 murino (identificador de secuencia n.º: 89 y 90, respectivamente) se alinearon con el dominio de la VH de consenso del subgrupo III humano (huIII) (identificador de secuencia n.º: 24) y el dominio kappa de consenso humano (huK1) (identificador de secuencia n.º: 25), respectivamente. Las secuencias de aminoácidos de las regiones hipervariables (HVR, denominadas indistintamente en la presente memoria descriptiva regiones de determinación de complementariedad (CDR)) del MAb 10F4 murino CD22 antihumano se insertaron en las secuencias de estructuras de consenso tal como se indica a continuación. Las HVR de la cadena ligera (HVR-L1 (posiciones 24-34 de la numeración de Kabat), HVR-L2 (posiciones 50-56 de la numeración de Kabat) y HVR-L3 (posiciones 89-97 de la numeración de Kabat)) del anticuerpo murino 10F4 se diseñaron en una secuencia de estructuras de consenso del anticuerpo kappa I humano (huKI) para producir la cadena ligera humanizada 10F4v1 (identificador de secuencia n.º: 2B). Las HVR de la cadena pesada (HVR-H1 (posiciones 26-35 de la numeración de Kabat), HVR-H2 (posiciones 49-65 de la numeración de Kabat) y HVR-H3 (posiciones 95-102 de la numeración de Kabat)) del anticuerpo murino 10F4 se diseñaron en un dominio de VH de

21

consenso del subgrupo III humano (humIII) modificado que difiere de la secuencia humIII en tres posiciones: R71A, N73T y L78A se utilizaron (véase Carter y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:4285 (1992)) para producir la región variable de la cadena pesada 10F4v1 humanizada (identificador de secuencia n.º: 16, Figura 2A). La ingeniería genética de las HVR en las estructuras del aceptor se realizó mediante mutagénesis según el método de Kunkel utilizando un oligonucleótido individual para cada región hipervariable. La secuencia de cada clon se determinó mediante técnicas estándares de secuenciación de ADN. Las regiones hipervariables y estructurales que se muestran en las Figuras 2A y 2B se enumeran según la numeración de Kabat (Kabat y col., (1991), mencionado anteriormente). Las cadenas ligera y pesada se secuenciaron y las secuencias de aminoácidos de las regiones variables (incluyendo las HVR y las regiones estructurales (FR)) de huKI, humIII, murino 10F4, 10F4v1 humanizado y 10F4v2 humanizado se muestran en Figuras 2A y 2B. El anticuerpo humanizado 10F4v3 tiene una secuencia de aminoácidos idéntica al 10F4v2.

Las moléculas de ácidos nucleicos que codifican variantes de las secuencias de aminoácidos del anticuerpo, fragmento de anticuerpo o dominios de la VL o VH se preparan mediante una variedad de procedimientos conocidos en la materia. Estos procedimientos incluyen el aislamiento de una fuente natural (en el caso de variantes de las secuencias de aminoácidos producidas de forma natural) o la preparación por mutagénesis mediada por oligonucleótidos (o dirigida al sitio), la mutagénesis dirigida mediante PCR y la mutagénesis por inserción de un casete de una variante preparada anteriormente o una versión no variante del anticuerpo, fragmento de anticuerpo o dominios de la VL o VH. Por ejemplo, se pueden crear bibliotecas actuando sobre posiciones aminocídicas accesibles del VL en el VH, y opcionalmente en una o más CDR, para sustitución de aminoácidos por variantes de aminoácidos utilizando el método Kunkel. Véase, por ejemplo, Kunkel y col., *Methods Enzymol.* (1987), 154:367-382 y los ejemplos de la presente memoria descriptiva. La generación de secuencias aleatorizadas también se describe más adelante en los ejemplos.

La secuencia de oligonucleótidos incluye uno o más de los conjuntos de codones diseñados para una posición concreta en una región CDR (HVR) o FR de un polipéptido de la invención. Un conjunto de codones es un grupo de distintas secuencias de tripletes de nucleótidos usados para codificar variantes de aminoácidos deseadas. Los conjuntos de codones se pueden representar

243

mediante símbolos para designar a nucleótidos concretos o a mezclas equimolares de nucleótidos, como se muestra a continuación según el código IUB.

CÓDIGOS IUB

- G Guanina
- A Adenina
- T Timina
- C Citosina
- R (A o G)
- Y (C o T)
- M (A o C)
- K (G o T)
- S (C o G)
- W (A o T)
- H (A o C o T)
- B (C o G o T)
- V (A o C o G)
- D (A o G o T)
- N (A o C o G o T)

Por ejemplo, en el conjunto de codones DVK, D puede ser los nucleótidos A o G o T; V puede ser A o G o C; y K puede ser G o T. Este conjunto de codones puede presentar 18 codones diferentes y puede codificar los aminoácidos Ala, Trp, Tyr, Lys, Thr, Asn, Lys, Ser, Arg, Asp, Glu, Gly y Cys.

Se pueden sintetizar conjuntos de cebadores u oligonucleótidos utilizando métodos estándar. Es posible sintetizar un conjunto de oligonucleótidos mediante síntesis durante la fase sólida, por ejemplo, que contiene secuencias que representan todas las posibles combinaciones de tripletes de nucleótidos proporcionadas por el conjunto de codones y que codificará el grupo deseado de aminoácidos. La síntesis de oligonucleótidos con “degeneración” de los nucleótidos seleccionados en determinadas posiciones es bien conocida en la materia. Estos conjuntos de nucleótidos con determinados conjuntos de codones pueden sintetizarse mediante sintetizadores de ácidos nucleicos comercializados (disponibles, por ejemplo, en Applied Biosystems, Foster City, CA) o se pueden adquirir (por ejemplo, a Life Technologies, Rockville, MD). Por lo tanto, un conjunto de oligonucleótidos sintetizados que tenga un conjunto concreto de

codones incluirá habitualmente una pluralidad de oligonucleótidos con diferentes secuencias, y estas diferencias estarán establecidas por el conjunto de codones dentro de la secuencia total. Los oligonucleótidos, según se utilizan en la presente invención, tienen secuencias que permiten la hibridación de una plantilla de ácidos nucleicos de dominio variable y también pueden incluir sitios con enzimas de restricción para fines de clonación.

En un método, se pueden crear secuencias de ácidos nucleicos que codifican variantes de aminoácidos mediante mutagénesis mediada por oligonucleótidos. Esta técnica es bien conocida en la materia y fue descrita por Zoller y col, 1987, *Nucleic Acids Res.* 10:6487-6504. Explicado brevemente, se crean secuencias de ácidos nucleicos que codifican variantes de ácidos nucleicos mediante hibridación de un conjunto de oligonucleótidos que codifican los conjuntos de codones necesarios con una plantilla de ADN, donde la plantilla es la forma de una única cadena del plásmido que contiene una secuencia de la plantilla de ácidos nucleicos de la región variable. Tras la hibridación, se utiliza ADN polimerasa para sintetizar una segunda cadena complementaria completa de la plantilla, que, de este modo, incorporará el cebador oligonucleótido y contendrá los conjuntos de codones proporcionados por el conjunto oligonucleótido.

Por lo general, se utilizan oligonucleótidos de al menos 25 nucleótidos. Un oligonucleótido óptimo tendrá entre 12 y 15 nucleótidos que son completamente complementarios con respecto a la plantilla en cada lado de la codificación del nucleótido o nucleótidos para la mutación o mutaciones. Esto garantiza que la hibridación del oligonucleótido con la molécula de la plantilla de ADN de cadena única se llevará a cabo correctamente. Los oligonucleótidos se sintetizan fácilmente utilizando técnicas bien conocidas en la materia, como la descrita por Crea y col., *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA*, 75:5765 (1978).

La plantilla de ADN está bien generada por aquellos vectores que se derivan de los vectores bacteriófagos M13 (son adecuados los vectores M13mp18 y M13mp19 comercializados) bien por aquellos vectores que contienen un origen de replicación de fagos de cadena única, tal como se describe en Viera y col., *Meth. Enzymol.*, 153:3 (1987). De este modo, el ADN que va a mutarse se puede insertar en uno de estos vectores con el fin de generar una plantilla de cadena única. La producción de la plantilla de cadena única se describe en los apartados 4.21-4.41 de Sambrook y col., mencionado anteriormente.

24

Para alterar la secuencia de ADN nativo, el oligonucleótido se hibrida con la plantilla de cadena única en condiciones de hibridación apropiadas. A continuación, se añade una enzima polimerizadora del ADN, por lo general la ADN polimerasa T7 o el fragmento Klenow de la ADN polimerasa I, para sintetizar la cadena complementaria de la plantilla utilizando el oligonucleótido como cebador para la síntesis. Por lo tanto, una molécula heterodúplex se forma de tal manera que una cadena de ADN codifica la forma mutada del gen 1 y otra cadena (la plantilla original) codifica la secuencia inalterada nativa del gen 1. Esta molécula heterodúplex se transforma en una célula huésped apta, por lo general, una procariota tal como *E. coli* JM101. Tras cultivar las células, se colocan en placas de agarosa y se analizan utilizando el cebador oligonucleótido radiomarcado con 32-fosfato para identificar las colonias bacterianas que contienen el ADN mutado.

El método que se acaba de describir se puede modificar, de forma que se cree una molécula homodúplex en la que las dos cadenas del plásmido contengan la mutación o mutaciones. Las modificaciones son las siguientes: El oligonucleótido de cadena única es hibridado con la plantilla de cadena única como se ha descrito anteriormente. Se combina una mezcla de tres desoxirribonucleótidos, desoxirriboadenosina (dATP), desoxirriboguanosina (dGTP) y desoxirribotimidina (dTTP), con una tiodesoxirribocitosina modificada denominada dCTP-(aS) (que se puede obtener de Amersham). Esta mezcla se añade al complejo formado por el oligonucleótido y la plantilla. Al añadir a la mezcla la ADN polimerasa, se genera una cadena de ADN idéntica a la plantilla, salvo por las bases mutadas. Además, esta nueva cadena de ADN contendrá dCTP-(aS) en vez de dCTP, que sirve para protegerla de la digestión por endonucleasa de restricción. Una vez que se hace una muesca en la cadena de la plantilla del heterodúplex de doble cadena utilizando una enzima de restricción apropiada, la cadena de la plantilla se puede digerir con nucleasa ExoIII u otra nucleasa apropiada pasada la región que contiene el sitio o los sitios que se van a mutagenizar. A continuación, se detiene la reacción para dejar una molécula que sea sólo parcialmente de cadena única. Entonces, se forma un homodúplex de ADN de doble cadena completo utilizando ADN polimerasa en presencia de los cuatro trifosfatos desoxirribonucleótidos, ATP y ADN ligasa. Esta molécula homodúplex se puede transformar entonces en una célula huésped apropiada.

Como se ha indicado anteriormente, la secuencia del conjunto de oligonucleótidos tiene longitud suficiente para hibridar con el ácido nucleico de la

25

plantilla y también puede contener sitios de restricción, aunque no es necesario que lo haga. La plantilla de ADN se puede generar mediante aquellos vectores que se derivan de los vectores bacteriófagos M13 o mediante aquellos vectores que contienen un origen de replicación del fago de cadena única, como se describe en Viera y col. ((1987) *Meth. Enzymol.*, 153:3). De este modo, el ADN que va a mutarse se debe insertar en uno de estos vectores con el fin de generar una plantilla de cadena única. La producción de la plantilla de cadena única se describe en los apartados 4.21-4.41 de Sambrook y col., mencionado anteriormente.

Según otro método, se puede generar una biblioteca proporcionando conjuntos de oligonucleótidos situados antes del extremo 5' del promotor y después del extremo 3' del gen, de forma que cada conjunto tenga una pluralidad de oligonucleótidos con secuencias diferentes y las distintas secuencias establecidas por los conjuntos de codones estén dentro de la secuencia de los oligonucleótidos. Los conjuntos de oligonucleótidos situados antes del extremo 5' del promotor y después del extremo 3' del gen, junto con una secuencia de ácidos nucleicos de la plantilla del dominio variable, se pueden utilizar en una reacción en cadena de la polimerasa para generar una "biblioteca" de productos obtenidos mediante PCR. Se puede hacer referencia a los productos obtenidos mediante PCR como "casetes de ácidos nucleicos", puesto que se pueden fusionar con otras secuencias de ácidos nucleicos afines o no afines, por ejemplo, proteínas de la cápside de un virus y dominios de dimerización, utilizando técnicas reconocidas en biología molecular.

Se pueden utilizar conjuntos de oligonucleótidos en una reacción en cadena de la polimerasa usando una secuencia de la plantilla de ácidos nucleicos de un dominio variable como la plantilla para crear casetes de ácidos nucleicos. La secuencia de la plantilla de ácidos nucleicos del dominio variable puede ser cualquier porción de cadenas pesadas de inmunoglobulinas que contengan las secuencias de ácidos nucleicos diana (es decir, secuencias de ácidos nucleicos que codifican aminoácidos destinados a sustitución). La secuencia de la plantilla de ácidos nucleicos de la región variable es una porción de una molécula de ADN de doble cadena con una primera hebra de ácido nucleico y una segunda hebra complementaria de ácido nucleico. La secuencia de la plantilla de ácidos nucleicos del dominio variable contiene al menos una porción de un dominio variable y tiene al menos una CDR. En algunos casos, la secuencia de la plantilla

251

de ácidos nucleicos del dominio variable contiene más de una CDR. Una porción situada antes del extremo 5' y una porción situada después del extremo 3' de la secuencia de la plantilla de ácidos nucleicos del dominio variable puede destinarse a hibridación con miembros de un conjunto de oligonucleótidos situados antes del extremo 5' y de un conjunto de oligonucleótidos situados después del extremo 3'.

Se puede hibridar un primer oligonucleótido del conjunto de cebadores situados antes del extremo 5' con la primera cadena de ácido nucleico y un segundo oligonucleótido del conjunto de cebadores situados después del extremo 3' con la segunda cadena de ácido nucleico. Los cebadores de oligonucleótidos pueden incluir uno o más conjuntos de condones y estar diseñados para hibridar con una porción de la secuencia de la plantilla de ácidos nucleicos de la región variable. El uso de estos oligonucleótidos puede introducir dos o más conjuntos de codones en el producto obtenido mediante PCR (es decir, el casete de ácido nucleico) tras la PCR. El cebador oligonucleótido que hibrida con regiones de la secuencia de ácidos nucleicos que codifican el dominio variable de un anticuerpo incluye porciones que codifican residuos de la CDR que están destinados a sustitución de aminoácidos.

También se pueden sintetizar los conjuntos de oligonucleótidos situados antes del extremo 5' y después del extremo 3' para incluir sitios de restricción dentro de la secuencia de oligonucleótidos. Estos sitios de restricción pueden facilitar la inserción de los casetes de ácido nucleico (es decir, los productos de la reacción PCR) en un vector de expresión que tenga una secuencia adicional de anticuerpos. En una forma de realización, los sitios de restricción están diseñados para facilitar la clonación de los casetes de ácido nucleico sin introducir secuencias de ácidos nucleicos externas ni eliminar las secuencias originales de ácidos nucleicos de regiones estructurales o CDR.

Los casetes de ácido nucleico pueden clonarse para obtener cualquier vector apto para la expresión de una porción o la totalidad de la secuencia de la cadena pesada o ligera que contenga las sustituciones de aminoácidos dirigidas generadas mediante la reacción PCR. Según los métodos detallados en la invención, el casete de ácidos nucleicos se clona para formar un vector que facilite la producción de una porción o la totalidad de la secuencia de la cadena pesada o ligera fusionada con parte o la totalidad de una proteína de la cápside de un virus (es decir, creando una proteína de fusión) y representada en la superficie de una

partícula o célula. Aunque están disponibles diversos tipos de vectores que se pueden utilizar para realizar prácticas de esta invención, los vectores fagémidos son los preferidos para uso en la presente memoria descriptiva, dado que se pueden construir con relativa sencillez y se pueden amplificar fácilmente. Los vectores fagémidos suelen contener diversos componentes, que incluyen promotores, secuencias de señal, genes de selección fenotípica, sitios de origen de la replicación y otros componentes necesarios, que son conocidos por los expertos en la materia.

Cuando se desea expresar una combinación concreta de variantes de aminoácidos, la casete de ácidos nucleicos contiene una secuencia que puede codificar parte o la totalidad del dominio variable de la cadena ligera o pesada y puede codificar las combinaciones de las variantes de aminoácidos. Para la producción de anticuerpos que contengan estas variantes de aminoácidos o combinaciones de variantes de aminoácidos, como en una biblioteca, las casetes de ácidos nucleicos se pueden insertar en un vector de expresión que contenga una secuencia adicional de anticuerpos, por ejemplo, la totalidad o porciones de los dominios constante o variable de las regiones variables de la cadena pesada y ligera. Estas secuencias adicionales de anticuerpos también se pueden fusionar con otras secuencias de ácidos nucleicos, como secuencias que codifican proteínas de la cápside de un virus, y de este modo permitir la producción de una proteína de fusión.

Ejemplo 4: Determinación de la secuencia de región variable

Las secuencias de aminoácidos y ácido nucleico de los anticuerpos monoclonales murinos 10F4 humanizados se determinó mediante procedimientos estándares. Se extrajo el ARN total de las células de hibridoma que producen los anticuerpos monoclonales 10F4.4.1 de ratón CD22 antihumano, mediante el Mini Kit RNeasy® (Qiagen, Alemania). El dominio variable ligero (VL) y el dominio variable pesado (VH) se amplificaron usando RT-PCR con los cebadores degenerados. Los cebadores anversos eran específicos para la secuencia de aminoácidos N-terminal de las regiones VL y VH del anticuerpo. Los cebadores reversos de las cadenas ligera y pesada, respectivamente, se diseñaron para hibridar en una región del dominio constante ligero (CL) y del dominio constante pesado 1(CH1), y que se conserva en gran medida entre las especies. Las VL y VH amplificadas se clonaron en un vector de expresión celular de mamífero pRK (Shields y col., *J. Biol. Chem.* 276:659-04 (2000)). La secuencia de

27

polinucleótidos en las inserciones se determinó mediante los métodos de secuenciación habituales. Las secuencias de aminoácidos del 10F4 murino quimérico y el 10F4v1 humanizado, y las regiones variables de la cadena ligera y pesada del 10F4v2 humanizado se muestran en las Figuras 2A y 2B.

El 10F4v1 humanizado se modificó aún más en la posición 28 del HVR-L1 (N28) (identificador de secuencia n.º: 9) (véase Figura 2B). El residuo de asparragina en esa posición se reemplazó por un residuo de valina (N28V) para generar un HVR-L1 (identificador de secuencia n.º: 10) para las variantes hu10F4v2 y hu10F4v3, que muestran una afinidad de unión mejorada. Dichas variantes comprenden las mismas secuencias de dominio constante y variable del anticuerpo maduro y difieren sólo en una secuencia de señal que no se encuentra en el anticuerpo maduro de la invención.

Las modificaciones adicionales de la secuencia de aminoácidos se generaron en uno o ambos aminoácidos Asn28 (N28) o Asn30 (N30) de la región hipervariable HVR-L1 (véase Figura 2B) de hu10F4v1. Dado que N28 y N30 son posibles sitios de deaminación, se evaluaron los cambios de los aminoácidos en estos sitios. Por ejemplo, la asparragina en la posición 28 (N28) se reemplazó alternativamente con A, Q, S, D, V o I, y la asparragina en la posición 30 (N30) se reemplazó alternativamente con A o Q. Los cambios de la secuencia de aminoácidos en el dominio HVR-L1 según la invención se proporcionan en la Tabla 2, junto con sus afinidades de unión tal como se evaluaron mediante análisis de competición en un ensayo ELISA de fagos (IC 50) utilizando procedimientos estándares.

Tabla 2
Variantes de sustitución del anticuerpo hu10F4v1

Cambios de aminoácidos en HVR-L1 Figura 2B	Identificador de secuencia de HVR-L1 n.º:	Afinidad de unión (nM)
Sin cambios (N28, N30)	9	8
N28A, N30	19	8
N28Q, N30	20	7.3
N28S, N30	21	12
N28D, N30	22	12

231

N28V, N30	10	7.3
N28I, N30	23	9.8
N28, N30A	32	7.7
N28, N30Q	33	10

Para la generación de versiones IgG1 humanas de logitud completa del anticuerpo 10F4 humanizado, las cadenas ligera y pesada se subclonan por separado en los plásmidos pRK descritos anteriormente (Gorman, C.M. y col., (1990), *DNA Protein Eng. Tech.* 2: 3). Los plásmidos apropiados de las cadenas ligera y pesada (dependiendo de los cambios de secuencias deseados) se cotransfeccionaron en líneas celulares del riñón embrionario humano transformadas en adenovirus, conocidas como 293 (Graham, F.L. y col., (1977), *J. Gen. Virol.* 36: 59), mediante un procedimiento altamente eficaz (Graham y col., mencionado anteriormente, y Gorman, C.M., *Science* 221: 551). El medio cambia a un medio sin suero y las células se recolectaron diariamente durante un máximo de 5 días. Los anticuerpos se purificaron de los sobrenadantes agrupados utilizando la proteína A-Sefarosa CL-4B (Farmacia). El anticuerpo eluído se cambia de tampón a PBS mediante filtración de gel G25, concentrado mediante ultrafiltración con un Centriprep-30 o Centricon-100 (Millipore) y almacenado a 4 °C. La concentración del anticuerpo se determina mediante ELISA de unión IgG total.

Los dominios constantes de la cadena pesada de IgG ejemplares se describen en la Figura 5A. Un dominio constante κ de la cadena ligera humana comprende, por ejemplo, RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHDVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (identificador de secuencia n.º: 37). En la Figura 5B se muestra la secuencia de aminoácidos de longitud completa de h10F4v2, en la que las regiones constantes de las cadenas ligera y pesada están subrayadas. Los anticuerpos h10F4v1, v2 y v3 son isotipos IgG1.

Caracterización de anticuerpos anti-CD22

Ejemplo 5: Mapeo de epítomos:

Los epítomos de CD22 a los que se unen los anticuerpos 10F4.4.1 y 5E8.1.8 se determinaron de acuerdo con los siguientes procedimientos. Las

secuencias CD22 carentes de varios de los siete dominios de tipo inmunoglobulina del isoforma CD22 principal (CD22 beta) se clonaron y transformaron en células para lograr la expresión estable. Por ejemplo, las variantes de CD22 carentes del dominio 1 ($\Delta 1$), el dominio 2 ($\Delta 2$) o los dominios 3 y 4 ($\Delta 3, 4$) se clonaron, se transformaron en células CHO y se expresaron en las células. Las células de control expresaron CD22 beta. Las eliminaciones se realizaron mediante el kit de reactivos QuikChange XL™ de Stratagene. La eliminación del dominio 1 se realizó mediante la eliminación de los aminoácidos del 22 al 138, la eliminación del dominio 2 se realizó mediante la eliminación de los aminoácidos del 139 al 242 y los dominios 3 y 4 eliminados estaban disponibles como isoforma CD22 alfa secundario (eliminación de aminoácidos del 241 al 417). Todos los números de los aminoácidos se refieren a la numeración del precursor CD22 beta de longitud completa que describe Wilson, G.L. y col., (véase Figura 1 en Wilson, G.L y col., *J. Exp. Med.* 173:137-146 (1991)). La Figura 14 es un diagrama de los dominios que se eliminaron. La unión se determinó mediante citometría de flujo con un control de isotipo. La unión de 10F4.4.1 se detectó mediante Alexa 488 de IgG anti-ratón de cabra. La unión de 5E8.1.8 se detectó mediante IgG anti-ratón de cabra biotinilado más estreptavidina PE. Un efecto secundario de la unión de los anticuerpos murino 10F4.4.1 o murino 5E8.1.8 en la ausencia de los dominios ECD particulares indicaron que el anticuerpo se une a dichos dominios. Los anticuerpos 10F4.4.1 y 5E8.1.8 murinos mostraron las mismas características de unión en estas mismas condiciones. Ninguno se unió a CD22 que carezca del dominio 1 o dominio 2 y ambas se unieron a CD22 que comprenden los dominios 1 y 2, pero carecen de los dominios 3 y 4. Mediante este método se determinó que 10F4.4.1 y 5E8.1.8 se unen a los dominios 1 y 2 del CD22 humano dentro de la secuencia de aminoácidos del 22 al 240 de identificador de secuencia n.º: 27 (véase Wilson, G.L. y col., (1991), mencionado anteriormente).

Ejemplo 6: Caracterización de la afinidad de unión al antígeno soluble

La afinidad de unión del anticuerpo 10F4 murino y humanizado por el dominio extracelular (ECD) CD22 soluble se determinó mediante medición con resonancia de plasmón superficial utilizando un sistema BIACORE® 3000 (Biacore, Inc., Piscataway, NJ). Los biosensores de dextrano carboximetilado (CM5, Biacore Inc) se activaron con clorhidrato de *N*-etil-*N'*-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC) y *N*-hidroxisuccinimida (NHS), según las instrucciones del

proveedor. Estos chips activados se recubrieron con un anticuerpo IgG1 anti-CD22 10F4 (murino o humanizado) mediante dilución a 5 µg/ml con 10mM de acetato sódico, pH 4,8, antes de aplicar la inyección a un caudal de 5µl/minuto para lograr aproximadamente 500 unidades de respuesta (RU) del anticuerpo acoplado. A continuación, se inyectó 1M de etanolamina para bloquear los grupos no reaccionados. Para mediciones cinéticas, se inyectó el doble de diluciones seriadas de antígeno soluble marcado con CD22-beta-ECD-His humano (de 7,8 nM a 500 nM aproximadamente) en PBS con 0,05% de Tween 20 a 25 °C a un caudal de 30 ul/min. Las tasas de asociación (k_{on}) y las tasas de disociación (k_{off}) se calcularon mediante un sencillo modelo de unión uno a uno de Langmuir (BIAevaluation Software versión 3.2). La constante de disociación de equilibrio (K_d) se calculó como el cociente k_{off}/k_{on} . El anticuerpo anti-CD22, RFB4, se utilizó como control (Chemicon International, Inc., Temecula, CA, catálogo N.º CBL147) Los resultados de este experimento se muestran en la Tabla 2.

TABLA 2
Afinidad de unión de anti-CD22 a CD22 humano soluble
(Análisis BIACORE®)

Clon	$k_{on}/10^5$	$k_{off}/10^{-4}$	Kd (nM)
10F4 murino	0.19	2.8	15
10F4 quimérico	0.26	4.2	16
10F4v1			
humanizado	0.18	3.5	19
10F4v2			
humanizado	0.32	2.5	7.8
RFB4 de control	0.33	1.4	4.2

Ejemplo 7: Caracterización de la afinidad de unión al antígeno de superficie celular

La afinidad de unión del 10F4.4.1 murino y 10F4v1 y 10F4v2 humanizados para el CD22 humano y mono cinomolgus expresado en la superficie de las células CHO se examinó mediante un ensayo de competición. De manera

257

resumida, las células CHO se expresan de manera estable en el CD22 humano (identificador de secuencia n.º: 27) o el CD22 de mono cinomolgus (identificador de secuencia n.º: 31) de longitud completa. El anticuerpo anti-CD22 (10F4v1 o v2 murino o humanizado) se yodó con el reactivo Iodogen® (¹²⁵I) para una actividad específica de aproximadamente 10 µCi/µg. Se realizó un ensayo de unión competitiva con células mediante un anticuerpo anti-CD22 diluido serialmente y sin marcar. Se permitió que los anticuerpos se unieran con las células durante 4 horas a 4 °C. La afinidad de unión, K_D, de los anticuerpos se determinó de acuerdo con el análisis Scatchard estándar que se realizó mediante un programa de ajuste de curva no lineal (véase, por ejemplo, Munson y col., *Anal Biochem*, 107: 220-239, 1980). Los resultados de este experimento se muestran en la Tabla 3.

TABLA 3
Afinidad de unión de 10F4 MAb al CD22 humano y de mono cinomolgus

Anticuerpo	CD22 humano Kd (nM)	CD22 del mono cinomolgus Kd (nM)
10F4.4.1 murino	2.4	2.3
Hu 10F4v1*	1.1, 1.7	1.4, 1.8
Hu 10F4v2	1.6	2.1

*ensayos repetidos

Los resultados indican que el 10F4 murino y humanizado se une al CD22 humano y de mono cinomolgus expresado en la superficie de las células CHO con una afinidad aproximadamente igual.

Ejemplo 8: Producción de conjugados de anticuerpos anti-CD22 con fármacos

Los ACD anti-CD22 se produjeron mediante conjugación de anticuerpos anti-CD22 RFB4, 5E8 murino, 10F4 murino, 10F4v1 humanizado, thioMAb 10F4v1 humanizado (thio-10F4v1), 10F4v2 humanizado y 10F4v3 humanizado con las siguientes fracciones de enlazadores a fármacos: spp-DM1, smcc-DM1, MC-vc-PAB-MMAE; MC-vc-PAB-MMAF; MC-MMAE y MC-MMAF, cuyas fracciones de fármacos y enlazadores se describen en la presente memoria descriptiva, así como en el documento WO 2004/010957, publicado el 5 de febrero de 2004, y en el documento WO2006/034488, publicado el 9 de septiembre de 2005 (las

aplicaciones de las patentes de cada documento se incorporan íntegramente en la presente memoria descriptiva a modo de referencia). Antes de la conjugación, los anticuerpos se redujeron parcialmente con TCEP mediante métodos estándares según la metodología descrita en el documento WO 2004/010957. Los anticuerpos parcialmente reducidos se conjugaron con las fracciones de enlazadores de fármacos mencionadas anteriormente mediante métodos estándares según la metodología descrita en Doronina y col., (2003) *Nat. Biotechnol.* 21:778-784 y patente de EE.UU. N.º 2005/0238649 A1. Los anticuerpos parcialmente reducidos se combinaron con las fracciones del enlazador de fármacos para permitir la conjugación de las fracciones a residuos de cisteína. Las reacciones de la conjugación se absorben y los ADC se purifican. La concentración del fármaco (promedio de fracciones de fármaco por anticuerpo) para cada ADC se determinó mediante HPLC. Otros enlazadores útiles para la preparación de ADC incluyen, entre otros, BMPEO, BMPS, EMCS, GMBS, HBVS, LC-SMCC, MBS, MPBH, SBAP, SIA, SIAB, SMPB, SMPH, sulfo-EMCS, sulfo-GMBS, sulfo-KMUS, sulfo-MBS, sulfo-SIAB, sulfo-SMCC y sulfo-SMPB, y SVSB (succinimidil-(4-vinilsufona)benzoato), incluyendo reactivos de bis-maleimida: DTME, BMB, BMDB, BMH, BMOE, BM(PEO)₃ y BM(PEO)₄.

Los ACD anti-CD22 también se producen mediante conjugación con residuos de lisina del anticuerpo. Las lisinas del anticuerpo se convierten en grupos sulfidrilos mediante, por ejemplo, reactivos de Traut (Pierce Chemical Co.), tal como se detalla en la presente memoria descriptiva. Los grupos sulfidrilos resultantes son reactivos con enlazadores y moléculas de enlazadores a fármacos para la preparación de los ACD. Alternativamente, los ACD se producen al reaccionar una lisina en un anticuerpo anti-CD22 con un enlazador, SPP (N-succinimidil 4-(2'-piridilditio) pentanoato, que ya puede estar unido a la molécula del fármaco o puede reaccionar posteriormente con una molécula del fármaco tal como un maitansinoide. Por ejemplo, un anticuerpo se modifica mediante la reacción con SPP, seguida de la conjugación con f, tal como se describe en Wang, L. y col., *Protein Science* 14:2436-2446 (2005), cuyo contenido se incorpora íntegramente en la presente memoria descriptiva a modo de referencia. Los residuos de lisina en un anticuerpo anti-CD22 también pueden reaccionar con un enlazador, SMCC (Pierce Chemical Co.), a pH 7-9 de manera que el N-hidroxisuccinimida amino reactivo (éster de NHS) de SMCC forme una unión amida estable con el anticuerpo. El grupo maleimido de reactivos sulfidrilos de

SMCC reacciona con un grupo sulfidrilo de DM1 a pH 6.5-7.5 (véase Pierce Chemical Co., piercenet.com) para formar el ADC. Los residuos de lisina o cisteína reaccionan con un enlazador a fármacos para producir ADC que comprendan concentraciones de fármacos promedio de aproximadamente 1 y 8 moléculas de enlazadores a fármacos por anticuerpo, alternativamente de 1 a 6, 1 a 4, 1 a 3 ó 1 a 2 moléculas de enlazadores a fármacos por anticuerpo.

Los ACD anti-CD22 (RFB4)-SMCC-DM1 y anti-GP120-SMCC-DM1 se prepararon según este método, en el que RFB4-smcc-DM1 se preparó con concentraciones de fármacos bajas (1,95), medias (3,7) y altas (6,75). El anti-GP120-smcc-DM1 se preparó con una concentración de fármacos alta (6,1). Estos ACD demostraron ser eficaces *in vivo*, tal como se muestra a continuación en el ejemplo 9 y la Tabla 9 en la presente memoria descriptiva.

Ejemplo 9: Eficacia de los conjugados de anticuerpos anti-CD22 con fármacos

Estudios *in vitro* de los determinantes de la eficacia

Se delimitaron los determinantes de la eficacia de los ADC (o TDC) anti-CD22 en una línea celular de linfoma. Se conoce que el CD22 expresado en la superficie de células B se internaliza después de la unión de su(s) ligando(s) o anticuerpos (Sato, S. y col., *Immunity* 5:551-562 (1996)). Para determinar si y cómo el nivel de la expresión del CD22 en la superficie de las células B o su internalización afecta la eficacia, se realizaron los siguientes estudios *in vitro*.

Expresión en la superficie del CD22 humano en diversas líneas celulares de linfomas. Diecinueve líneas celulares de linfomas que expresan diversas cantidades de CD22 en su superficie se cultivaron y recogieron en la fase exponencial del crecimiento. Las células se resuspendieron en un tampón de lavado FACS (PBS; 0,5% de albúmina de suero bobino; 0,1% de ázida sódica) que contiene 100 µg/ml de cada IgG de ratón normal e IgG human normal y que se hayan conservado en hielo. Aproximadamente 1×10^6 células/100 µl se tiñeron con APC anti-CD22 humano (mIgG1, clon RFB4, Southern Biotech #9361-11) o isotipo APC de IgG1 murina (BD Pharmingen #555751) durante 30 minutos en hielo. Las células muertas se tiñeron con 7-AAD (BD Pharmingen #559925). Los datos se obtuvieron en el citómetro de flujo BD FACS Calibur™ y se analizaron con el software FlowJo™. La determinación de IC50 para hu10F4v3-SMCC-DM1 o cada uno de los fármacos (DM1, MMAF o MMAE) se determinaron mediante cultivo de células de linfoma, tal como se describió anteriormente, y recogida de

las células cultivadas en la fase exponencial y sembrado de 5000 células en 90 μ l de medio de cultivo por pocillo en una placa de 96 pocillos. El ADC y los fármacos se diluyeron en serie dentro del rango de detección (comenzando a 300 μ g/ml para el ADC o 90 nM para los fármacos y diluyendo hasta lograr esencialmente el objetivo de cero ensayos). Se añadieron alícuotas de 10 μ l de ADC diluido o de fármacos para replicar los pocillos que contienen células y se incubaron durante 3 días a 37 °C. Para cada pocillo, se añadió 100 μ l de CellTiter Glo™ y se incubó durante 30 minutos. Se detectó quimioluminiscencia y los datos se analizaron utilizando el software Prism™. Los resultados se muestran en la Figura 6A, en la que los altos niveles de CD22 en superficie se correlacionan con los bajos niveles de IC50 (mayor eficacia) de hu10F4v3-SMCC-DM1. La Figura 6C indica que existe una correlación más fuerte entre la sensibilidad intrínseca de las células a los fármacos y la IC50 del ADC.

La internalización de hu10F4v3-SMCC-DM1 se determinó mediante el ensayo FACS. De manera resumida, las células de linfomas se tiñeron mediante técnicas estándar FACS con CD22-FITC (RFB4) en presencia de hu10F4v3-SMCC-DM1 y se incubaron en hielo entre 20 y 30 minutos. Para determinar los niveles de CD22 en la superficie de la célula después de la tinción inicial, las células se lavaron en un medio frío de RPMI con FBS al 10% y se añadió 200 μ l de RPMI precalentado con FBS al 10% e incubó a 37 °C durante 15 minutos. Se añadió 80 μ l de tampón de tinción y 20 μ l de suero de ratón normal inactivado por calor (HI NMS), a lo que prosiguió la incubación en hielo durante 15 minutos. Se añadió Alexa-647 anti-DM1, se incubó en hielo entre 20 y 30 minutos y las células se lavaron y fijaron con 200 μ l de paraformaldehído con PBS al 1% antes de realizar el análisis FACS. Para determinar la tinción interna y superficial del CD22 después de la tinción inicial, las células se lavaron con RPMI frío con FBS al 10%, se añadió RPMI precalentado con FBS al 10% y las células se incubaron durante 15 minutos a 37 °C. Posteriormente, las células se lavaron mediante la técnica FACS y se fijaron con el reactivo de fijación A (Dako™ #k2311) a temperatura ambiente durante 15 minutos; posteriormente, se repitió el paso con el reactivo de fijación B (Dako™). Se añadieron el tampón de tinción y el HI NMS, y la mezcla celular se incubó en hielo durante 15 minutos. Se añadió el reactivo de fijación B, a lo cual se agregó Alexa-647 anti-DM1 y se incubó a temperatura ambiente entre 20 y 30 minutos. Las células se lavaron mediante técnica FACS y se fijaron en paraformaldehído con PBS al 1%. El análisis FACS se realizó en cada mezcla

261

celular (superficie, posinternalización superficial y tinción interna) utilizando un citómetro de flujo BD FacsCalibur™ y el software FlowJo™. Los resultados se muestran en la Figura 6B en la que grandes cantidades de DM1 internalizado se correlacionan con los bajos niveles de IC50 (alta eficacia) y en la Figura 6D en la que el DM1 internalizado se visualiza mediante microscopia de fluorescencia.

Estudios de eficacia *in vivo*

Se empleó el siguiente protocolo para determinar la eficacia de los anticuerpos anti-CD22 monoclonales no conjugados o conjugados con toxinas para poder reducir el volumen tumoral *in vivo*.

Cada ratón SCID se inoculó subcutáneamente en el flanco con 2×10^7 de línea celular de linfomas de células B humanas. Las líneas celulares humanas incluyeron las líneas celulares de linfoma de Burkitt, células Daudi, Ramos y Raji (disponibles en el American Type Culture Collection, Manassas, VA, EE.UU) y otras líneas de células B, incluyendo las células U-698-M y Su-DHL-4 (disponibles en DSMZ, Braunschweig, Alemania; las células Su-DHL-4 se transfectaron con el gen indicador de luciferasa), células DoHH2 (Kluin-Neilemans, H.C. (1991), mencionado anteriormente) y Granta-519 (células de linfomas de células del manto, Jadayel, D.M. y col., *Leukemia* 11(1):64-72 (1997)) y células BJAB-luc (línea celular linfoblastoide de linfocitos humanos que expresa el gen indicador de luciferasa). Cuando los tumores alcanzaron un volumen tumoral medio de entre 100 y 200 mm³, los ratones se dividieron en grupos y se trataron en el día 0 con inyecciones intravenosas con anticuerpos conjugados con toxina o anticuerpos no conjugados, tal como se muestra en las siguientes Tablas 4 a la 16.

Los conjugados anti-CD22 con el fármaco maitansina reducen el volumen tumoral de las células B

Sesenta y cinco ratones SCID se inyectaron subcutáneamente con 2×10^7 de células BJAB-luc en un volumen de 0,2 ml por ratón en el flanco. Las células se suspendieron en solución salina de Hanks. Cuando el tamaño del tumor medio alcanzó 100 y 200 mm³, los ratones se agruparon aleatoriamente en cuatro grupos de 9 ratones cada uno y se les administró un único tratamiento I.V. (a través de la vena de la cola) del anticuerpo anti-CD22 o del anticuerpo de control indicado en la siguiente Tabla 4.

Tabla 4
Reducción del volumen tumoral *in vivo*

262

Administración del anticuerpo

Anticuerpo administrado	TI	PR	CR	Dosis de Ab (mg/kg)	Dosis de DM1 ($\mu\text{g}/\text{m}^2$)	Proporción del fármaco (Fracciones de fármaco/Ab)
anti-Her2-smcc-DM1	9/9	0	0	4.2	200	3.2
mu10F4-smcc-DM1	9/9	2	0	3.0	200	4.6
hu10F4v2-smcc-DM1	9/9	0	0	3.4	200	4.0
hu10F4v1	9/9	0	0	3.4	---	---

“TI”: incidencia tumoral en el último momento de cada grupo; el numerador hace referencia a la cantidad de animales con tumores y el denominador hace referencia a la cantidad total de animales con tumores. “PR” hace referencia a la cantidad de animales con tumores que han disminuido entre el 50 y 99% de su volumen inicial. “CR” hace referencia a la cantidad de animales que lograron una remisión completa.

El volumen tumoral medio se monitorizó en cada grupo de tratamiento durante 32 días después de la inyección del anticuerpo. Las mediciones tumorales se realizaron con calibradores. La eficacia de los anticuerpos anti-CD22 conjugados con toxinas se determinó a partir de la comparación entre los anticuerpos de control y los anticuerpos no conjugados. Los resultados se muestran en la Figura 7A. Los anticuerpos monoclonales 10F4v1-smcc-DM1 humanizados y murinos ralentizaron considerablemente el crecimiento tumoral con respecto al anticuerpo anti-CD22 no conjugado y al anticuerpo de control no específico.

Utilizando el mismo protocolo anterior, se realizó un ensayo comparando el 10F4v2 humanizado conjugado con toxinas con el anticuerpo murino conjugado con toxinas y el anticuerpo humanizado desnudo, tal como se indica en la siguiente Tabla 5.

Tabla 5

257

Reducción del volumen tumoral *in vivo*

Administración del anticuerpo

Anticuerpo administrado	TI	PR	CR	Dosis de Ab (mg/kg)	Dosis de DM1 ($\mu\text{g}/\text{m}^2$)	Proporción del fármaco (Fracciones de fármaco/Ab)
anti-Her2-smcc-DM1	9/9	0	0	4.2	200	3.2
mu10F4-smcc-DM1	7/9	1	2	4.7	200	2.9
hu10F4v2-smcc-DM1	8/9	1	1	4.5	200	3.0
hu10F4v2	9/9	0	0	4.5	---	---

“TI”: incidencia tumoral en el último momento de cada grupo; el numerador hace referencia a la cantidad de animales con tumores en el grupo de estudio y el denominador hace referencia a la cantidad total de animales con tumores. “PR” hace referencia a la cantidad de animales con tumores que han disminuido entre el 50 y 99% de su volumen inicial. “CR” hace referencia a la cantidad de animales que lograron una remisión completa.

El volumen tumoral medio se monitorizó en cada grupo de tratamiento durante 32 días después de la inyección del anticuerpo. Las mediciones tumorales se realizaron con calibradores. La eficacia de los anticuerpos anti-CD22 conjugados con toxinas se determinó a partir de la comparación entre los anticuerpos de control y los anticuerpos no conjugados. Los resultados se muestran en la Figura 7B. Los anticuerpos monoclonales 10F4v2-smcc-DM1 humanizados y 10F4-smcc-DM1 murinos ralentizaron considerablemente el crecimiento tumoral con respecto al anticuerpo anti-CD22 no conjugado y al anticuerpo de control no específico.

Un anticuerpo anti-CD22 se conjugó con DM1 mediante el enlazador spp o el enlazador smcc según los métodos de conjugación desvelados en la presente memoria descriptiva. El anticuerpo anti-CD22 desnudo se utilizó como control positivo y los conjugados de toxinas, anti-HER2-spp-DM1 y anti-HER2-smcc-DM1, se utilizaron como controles negativos. Ochenta ratones SCID se inyectaron

267

subcutáneamente con 2×10^7 de células BJAB-luc en un volumen de 0,2 ml por ratón en el flanco. Las células se suspendieron en solución salina de Hanks. Cuando el tamaño tumoral medio alcanzó 100 y 200 mm³, los ratones se agruparon aleatoriamente en seis grupos de 10 ratones cada uno y se colocaron inyecciones intravenosas de anticuerpos de prueba o de control. Se repitieron las dosis una vez por semana para una cantidad total de tres dosis. Véase Tabla 6.

Tabla 6
Reducción del volumen tumoral *in vivo*
Administración del anticuerpo

Anticuerpo administrado	Dosis de Ab (mg/kg)	Dosis de DM1 (µg/m ²)
anti-Her2-spp-DM1*	4	214
anti-Her2-smcc-DM1**	6.9	405
anti-CD22-spp-DM1*	5	214
anti-CD22-spp-DM1	2.5	107
anti-CD22-smcc-DM1**	10	405
Anti-CD22 desnudo	10	---

* Concentración de fármaco compatible

** Concentración de fármaco compatible

El volumen tumoral medio se monitorizó dos veces por semana durante 3 semanas y, posteriormente, una vez por semana desde ese momento durante un total de 8 semanas. Los cambios del volumen tumoral producidos durante el transcurso del tiempo (Figura 7C) muestran que el anti-CD22-spp-DM1 administrado a 214 y 107 µg/m² DM1 y que el anti-CD22-smcc-DM1 administrado a 405 µg/m² exhibieron actividad antitumoral sólida y comparable en tumores xenotransplantados de células BJAB-luc. Todos los grupos de ADC anti-CD22 demostraron respuestas completas.

261

Los anticuerpos anti-CD22, RFB4, 5E8 y 7A2 se conjugaron con DM1 mediante el enlazador smcc según los métodos de conjugación desvelados en la presente memoria descriptiva. Se utilizó anti-HER2-smcc-DM1 conjugado con toxinas (en la presente memoria descriptiva, denominado indistintamente como HER-smcc-DM1 o HER2-smcc-DM1) como control negativo.

Se examinó la capacidad de estos anticuerpos de reducir el volumen tumoral en diferentes xenotransplantes en ratones SCID. Las líneas celulares de linfomas de células B humanas utilizadas para generar xenotransplantes de tumores en ratones fueron las células Ramos y BJAB-luc. Para cada xenotransplante, los ratones SCID se inyectaron subcutáneamente con 5×10^6 de células Ramos de linfoma de células B humanas en un volumen de 0,1 ml por ratón en el flanco (o 2×10^7 de células BJAB-luc en 0,2 ml). Las células se suspendieron en solución salina de Hanks. Cuando el tamaño tumoral medio alcanzó 100 y 200 mm³, los ratones se agruparon aleatoriamente en grupos de entre 8 y 10 ratones cada uno, y a cada ratón se le colocó una inyección intravenosa de anticuerpos de prueba o de control. La concentración de fármaco DM1 se normalizó a 200 µg/m² para cada grupo para proporcionar la dosis de DM1 administrada. El volumen tumoral medio se monitorizó dos veces por semana durante 4 semanas. Los resultados se muestran a continuación en las Tablas 7 y 8 y se grafican en las Figuras 8A y 8B, respectivamente.

Tabla 7

Xenotransplante de células Ramos, reducción del volumen tumoral *in vivo*
Administración del anticuerpo

Anticuerpo administrado	Dosis de Ab (mg/kg)	Dosis de DM1 (µg/m ²)
Anti-HER2-smcc-DM1	4.2	200
Anti-CD22(7A2)-smcc-DM1	3.8	200

Feb

Anti- CD22(7A2)- smcc-DM1	3.8	200
Anti- CD22(RFB4)- smcc-DM1	3.2	200

Tabla 8

Xenotransplante de células BJAB-luc, reducción del volumen tumoral *in vivo*

Administración del anticuerpo

Anticuerpo administrado	Dosis de Ab (mg/kg)	Dosis de DM1 ($\mu\text{g}/\text{m}^2$)	Proporción del fármaco (Fracciones de fármaco/Ab)
Anti-HER2- smcc-DM1	4.2	200	3.2
Anti- CD22(7A2)- smcc-DM1	3.8	200	3.6
Anti- CD22(5E8)- smcc-DM1	3.8	200	3.6
Anti- CD22(RFB4)- smcc-DM1	3.2	200	4.25

Estos resultados muestran que los anticuerpos anti-CD22-smcc-DM1 conjugados con fármacos reducen considerablemente el volumen tumoral de las células B en los xenotranplantes de células Ramos y BJAB-luc con respecto al anticuerpo de control o al anticuerpo anti-CD22 desnudo.

Se examinó el efecto de la concentración de fármaco del anticuerpo (cantidad promedio de moléculas de fármaco conjugadas por anticuerpo en una población de anticuerpos) en la capacidad de los conjugados de anticuerpos anti-

CD22-smcc-DM1 con fármacos para reducir el volumen tumoral en xenotransplantes de células BJAB-luc en ratones SCID. Ciento cuarenta ratones SCID se inyectaron subcutáneamente con 2×10^7 de células BJAB-luc en un volumen de 0,2 ml por ratón en el flanco. Las células se suspendieron en solución salina de Hanks. Cuando el tamaño tumoral medio alcanzó 100 y 200 mm³, los ratones se agruparon aleatoriamente en grupos de entre 8 y 10 ratones cada uno, y a cada ratón se le colocó una inyección intravenosa de anticuerpos de prueba o de control. Se administraron las poblaciones de anti-CD22(RFB4)-smcc-DM1 con concentraciones altas, medias o bajas de fármaco (concentraciones de fármaco promedio de 1,95; 3,7 ó 6,75 conjugadas con moléculas de DM1 por anticuerpo, respectivamente) como anticuerpos de prueba. Los anticuerpos RFB4 desnudos y anti-GP120-smcc-DM1 (concentración de fármaco alta) fueron los controles. Las dosis de los conjugados de anticuerpos con fármacos (prueba y control) se normalizaron a una dosis de nivel de proteína de 5mg/kg. La unión de un conjugado enlazador a los anticuerpos se realizó a través de los residuos de lisina. Véase Tabla 9.

Tabla 9
Xenotransplante de células BJAB-luc, reducción del volumen tumoral *in vivo*

Administración de anti-CD22(RFB4)-smcc-DM1

Anticuerpo administrado	Dosis de Ab (mg/kg)	Dosis de DM1 (µg/m ²)	Proporción del fármaco (Fracciones de fármaco/ Ab)
Anti-CD22(RFB4) (anticuerpo desnudo)	10	--	--
anti-CD22(RFB4)-smcc-DM1 (bajo)	5	144	1.95
anti-CD22(RFB4) - smcc-DM1 (medio)	5	273	3.7
anti-CD22(RFB4)-smcc-DM1 (alta)	5	497	6.75

268

anti-GP120-smcc-DM1 (alta)	5	449	6.1
-------------------------------	---	-----	-----

Cuando se administró a un nivel de proteína compatible (5 mg/kg), el anti-CD22(RFB4)-smcc-DM1 cargado con una concentración de fármaco alta (6,75 moléculas de DMI por molécula de anticuerpo) redujo levemente el volumen tumoral más que el conjugado de anticuerpo con fármacos con una concentración media de 3,7, mientras que los efectos del conjugado de anticuerpo con fármacos con una concentración de fármacos baja no fue diferente a los del anticuerpo desnudo o conjugado de control. Los resultados se grafican en la Figura 9.

Los conjugados anti-CD22 con el fármaco auristatina reducen el volumen tumoral de las células B

Se examinó el efecto de los conjugados anti-CD22 con fármaco auristatina MMAF en el volumen tumoral en xenotransplantes de ratones. El anticuerpo anti-CD22(RFB4) y el anticuerpo de control anti-GP120 se conjugaron con MMAF a través de un enlazador MC-vcPAB o un enlazador MC según los métodos desvelados en la presente memoria descriptiva. Se inyectaron subcutáneamente ratones SCID con 5×10^6 de células Ramos en un volumen de 0,2 ml por ratón en el flanco. Las células se suspendieron en solución salina de Hanks. Cuando el tamaño tumoral medio alcanzó 100 y 200 mm³, los ratones se agruparon aleatoriamente en grupos de entre 8 y 10 ratones cada uno, y a cada ratón se le colocó una inyección intravenosa de anticuerpos de prueba o de control. La dosis, la concentración del fármaco (proporción de fármaco) y la dosis de anticuerpo administrada a los ratones se muestra en la Tabla 10.

Tabla 10
Xenotransplante de células Ramos, reducción del volumen tumoral *in vivo*
Administración del conjugado de anti-CD22(RFB4) con MMAF

Anticuerpo administrado	Dosis de MMAF (µg/m ²)	Dosis de Ab (mg/kg)	Proporción del fármaco (Fracciones de fármaco/Ab)
anti-CD22(RFB4)-MCvcPAB-MMAF	405	6.6	4.2

anti-CD22(RFB4)- MC-MMAF	405	6.9	4.0
anti-GP120- MCvcPAB-MMAF	405	5.8	4.8
anti-GP120-MC- MMAF	405	5.9	4.7

El anti-CD22-MC-MMAF exhibió una actividad comparable al anti-CD22-MC-vc-PAB-MMAF en los xenotransplantes de las células Ramos RA1. Los resultados se grafican en la Figura 10.

Se examinó el efecto de los conjugados anti-CD22 con fármaco auristatina MMAE y DM1 en el volumen tumoral en xenotransplantes de ratones. El anticuerpo anti-CD22(RFB4) y el anticuerpo de control anti-GP120 se conjugaron con MMAE a través de un enlazador MC-vcPAB o un enlazador MC, o con DM1 a través de un enlazador smcc según los métodos desvelados en la presente memoria descriptiva. Se inyectaron subcutáneamente ratones SCID con 5×10^6 de células Ramos en un volumen de 0,1 ml por ratón en el flanco. Las células se suspendieron en solución salina de Hanks. Se administró PBS como control. Cuando el tamaño tumoral medio alcanzó 100 y 200 mm³, los ratones se agruparon aleatoriamente en grupos de entre 8 y 10 ratones cada uno, y a cada ratón se le colocó una inyección intravenosa de anticuerpos de prueba o de control. La dosis, la concentración del fármaco (proporción de fármaco) y la dosis de anticuerpo administrada a los ratones se muestra en la Tabla 11.

Tabla 11
Xenotransplante de células Ramos, reducción del volumen tumoral *in vivo*
Administración del conjugado de DM1 anti-CD22(RFB4) con MMAE y DM1

Anticuerpo administrado	Dosis de MMAE o DM1 ($\mu\text{g}/\text{m}^2$)	Dosis de Ab (mg/kg)	Proporción del fármaco (Fracciones de fármaco/Ab)
Anti-GP120-smcc- DM1	405	6.7	4.1
Anti-CD22(RFB4)- smcc-DM1	405	6.5	4.25

Anti-GP120-MCvcPAB-MMAE	405	6.0	4.7
antiCD22(RFB4)-MCvcPAB-MMAE	405	6.3	4.5
PBS	--	--	--

El anti-CD22-MCvcPAB-MMAE exhibió actividad antitumoral potente en los xenotransplantes de células Ramos RA1. El anti-CD22-MCvcPAB-MMAE exhibió actividad superior en comparación con el antiCD22-smcc-DM1. El ADC de control, anti-GP120-MCvcPAB-MMAE, no exhibió actividad considerable. Los resultados se grafican en la Figura 11.

Se examinó el efecto de los conjugados anti-CD22 con fármaco auristatina MMAF y DM1 en el volumen tumoral en xenotransplantes de ratones. Se administraron anti-CD22 hu10F4v2-MC-MMAF, hu10F4v2-smcc-DM1 y tio-10F4v1-MC-MMAF, y se compararon para determinar el efecto en el volumen tumoral. Los anticuerpos de control fueron anti-Her2-MC-MMAF y anti-Her2-smcc-DM1. Se inyectaron ratones SCID subcutáneamente con 2×10^7 de células BJAB-luc en un volumen de 0,2 ml por ratón en el flanco. Las células se suspendieron en solución salina de Hanks. Cuando el tamaño tumoral medio alcanzó 100 y 200 mm³, los ratones se agruparon aleatoriamente en grupos de entre 8 y 10 ratones cada uno, y a cada ratón se le colocó una inyección intravenosa de anticuerpos de prueba o de control. “Tio” hace referencia a thioMab, tal como desveló en la presente memoria descriptiva, en el que la fracción del enlazador a fármaco se conjuga con el anticuerpo a través de un sitio del anticuerpo diseñado con cisteína. La dosis, la concentración del fármaco (proporción de fármaco) y la dosis de anticuerpo administrada a los ratones se muestra en la Tabla 12.

Tabla 12
Xenotransplante de células BJAB-luc, reducción del volumen tumoral *in vivo*

Administración del conjugado de Hu10F4 con MMAF y DM1

Anticuerpo administrado	Dosis de MMAF o DM1 (µg/m ²)	Dosis de Ab (mg/kg)	Proporción del fármaco (Fracciones de fármaco/Ab)
-------------------------	--	---------------------	---

Anti-Her2-MC-MMAF	100	1.1	6.3
Hu10F4v2-MC-MMAF	100	2.0	3.4
Hu10F4v2-MC-MMAF	50	1.0	3.4
Tio-hu10F4v1-MC-MMAF	100	4.6	1.5
Tio-hu10F4v1-MC-MMAF	50	2.3	1.5
Anti-Her2-smcc-DM1	200	4.2	3.2
Hu10F4v2-smcc-DM1	200	4.5	3.0
Hu10F4v2-smcc-DM1	100	2.3	3.0

Los Hu10F4v2 ADC exhibieron una actividad antitumoral potente en los xenotransplantes de células BJAB-luc. Los resultados se grafican en la Figura 12.

Utilizando los procedimientos que se desvelaron en los experimentos anteriores, se examinó la eficacia de hu10F4v3 –smcc-DM1 y –MC-MMAF ADC en diferentes xenotransplantes con diferentes dosis. Los xenotransplantes de SuDHL4-luc, DoHH2 y -519 se prepararon tal como se desveló anteriormente en la presente memoria descriptiva. Cuando el tamaño tumoral alcanzó 100 y 200 mm³, los ratones se agruparon aleatoriamente en grupos de entre 8 y 10 ratones cada uno, y a cada ratón se le colocó una inyección intravenosa de anticuerpos de prueba o de control. Se les administraron a los ratones la dosis y la concentración de fármaco (proporción de fármaco), y la dosis de anticuerpo, tal como se muestra en las Tablas 136A-13C y los resultados se muestran en las Figuras 13A-13C.

Tabla 13A
 Reducción del volumen tumoral *in vivo*
 Administración del conjugado de Hu10F4v3 con MMAF y DM1
 en xenotransplantes de células SuDHL-4-luc

278

Anticuerpo administrado	Dosis de MMAF DM1 ($\mu\text{g}/\text{m}^2$)	Dosis de Ab (mg/kg)	Proporción del fármaco (Fármaco/Ab)
Anti-Her2-smcc-DM1	600	11.9	3.3
Hu10F4v3-smcc-DM1	600	13.6	2.9
Hu10F4v3-smcc-DM1	300	6.8	2.9
Anti-Her2-MC-MMAF	600	9.9	4.0
Hu10F4v3-MC-MMAF	600	13.3	3.0
Hu10F4v3-MC-MMAF	300	6.6	3.0

Tabla 13B

Reducción del volumen tumoral *in vivo*

Administración del conjugado de Hu10F4v3 con MMAF y DM1

en xenotransplantes de células DoHH2

Anticuerpo administrado	Dosis de MMAF DM1 ($\mu\text{g}/\text{m}^2$)	Dosis de Ab (mg/kg)	Proporción del fármaco (Fármaco/Ab)
Anti-Her2-smcc-DM1	600	11.9	3.3
Hu10F4v3-smcc-DM1	600	11.8	3.35
Hu10F4v3-smcc-DM1	300	5.9	3.35
Anti-Her2-MC-MMAF	600	9.9	4.0
Hu10F4v3-MC-MMAF	600	13.1	3.04

273

Hu10F4v3-MC-MMAF	300	6.6	3.04
hu10F4v3 desnudo	--	13.1	--

Tabla 13C

Reducción del volumen tumoral *in vivo*

Administración del conjugado de Hu10F4v3 con MMAF y DM1

en xenotransplantes de células Granta-519

Anticuerpo administrado	Dosis de MMAF o DM1 (µg/m ²)	Dosis de Ab (mg/kg)	Proporción del fármaco (Fármaco/Ab)
Anti-Her2-smcc-DM1	300	5.9	3.3
Hu10F4v3-smcc-DM1	300	5.9	3.35
Hu10F4v3-smcc-DM1	150	2.9	3.35
Anti-Her2-MC-MMAF	300	4.9	4.0
Hu10F4v3-MC-MMAF	300	6.6	3.04
Hu10F4v3-MC-MMAF	150	3.3	3.04
hu10F4v3 desnudo	--	6.6	--

El anti-CD22 hu10F4v3 –smcc-DM1 y -MC-MMAF ADCs exhibieron una reducción tumoral potente en todos los modelos de xenotransplantes evaluados.

Ejemplo 10: Preparación de anticuerpos anti-CD22 diseñados con cisteína

La preparación de anticuerpos anti-CD22 diseñados con cisteína se realizó tal como se desveló en la presente memoria descriptiva. El ADN que codifica el anticuerpo 10F4v3, con las mismas secuencias de regiones constantes y variables que 10F4v2 (cadena ligera, identificador de secuencia n.º: 87 y cadena pesada,

identificador de secuencia n.º: 88, Figura 5B) se mutagenizó mediante los métodos desvelados en la presente memoria descriptiva para modificar la cadena ligera, la cadena pesada o la región FC de la cadena pesada. El ADN que codifica la cadena ligera se mutagenizó para sustituir la cisteína por valina en la posición 205 según la numeración de Kabat en la cadena ligera (posición secuencial 210), tal como se muestra en la Figura 17A (cadena ligera, identificador de secuencia n.º: 91 del thiomab 10F4v3 del anticuerpo humanizado). El ADN que codifica la cadena pesada se mutagenizó para sustituir la cisteína por alanina en la posición 118 según la numeración EU en la cadena pesada (posición secuencial 121), tal como se muestra en la Figura 17B (cadena pesada, identificador de secuencia n.º: 92 del thiomab 10F4v3 del anticuerpo humanizado). La región Fc se mutagenizó para sustituir la cisteína por serina en la posición 400 según la numeración EU en la región Fc de la cadena pesada (posición secuencial 403), tal como se muestra en la Figura 17C (cadena pesada, identificador de secuencia n.º: 93).

Preparación de anticuerpos anti-CD22 diseñados con cisteína para conjugarlos mediante reducción y reoxidación

Los anticuerpos monoclonales anti-CD22 diseñados con cisteína de longitud completa (ThioMabs) expresados en las células CHO se disuelven en 500 mM de borato de sodio y 500 mM de cloruro de sodio a pH 8,0 aproximadamente y se reducen con un exceso de TCEP de 1 mM equivalente a entre 50 y 100 veces (tris(2-carboxietil)fosfino hidrocloreuro, Getz y col., (1999) *Anal. Biochem.* Vol 273:73-80; Soltec Ventures, Beverly, MA) durante 1 ó 2 horas a 37 °C. El ThioMab reducido se diluye y se carga en la columna HiTrap S en acetato sódico 10 mM, pH 5, y se eluye con PBS que contiene cloruro de sodio 0,3 M. El ThioMab reducido eluido se trata con 2 mM de ácido dehidroascórbico (dhAA) a pH 7 durante 3 horas o 2 mM de sulfato de cobre acuoso (CuSO₄) a temperatura ambiente durante la noche. La oxidación al aire del ambiente también puede ser eficaz. El tampón se cambia por medio de la elusión con la resina Sephadex G25 y se eluye con PBS con un 1 mM de DTPA. Se controla el valor tiol/Ab mediante la determinación de la reducción de la concentración de anticuerpos a partir de la absorbancia a 280 nm de la solución y la concentración de tiol mediante la reacción con DTNB (Aldrich, Milwaukee, WI) y la determinación de la absorbancia a 412 nm.

Ejemplo 11: Preparación de anticuerpos anti-CD22 diseñados con cisteína y conjugados con fármacos por medio de conjugación de anticuerpos anti-CD22 diseñados con cisteína y enlazadores a fármacos intermedios

Después de los procedimientos de reducción y reoxidación del Ejemplo 10, el anticuerpo anti-CD22 diseñado con cisteína se disuelve en un tampón de PBS (solución salina fosfatada) y se enfría en hielo. Aproximadamente, 1,5 equivalentes molares con respecto a las cisteínas diseñadas por anticuerpo de un enlazador intermedio a fármaco auristatina, como MC-MMAE (maleimidocaproilo-monometilo auristatina E), MC-MMAF, MC-val-cit-PAB-MMAE o MC-val-cit-PAB-MMAF, con un grupo funcional de reactivos de tiol, como la maleimida, se disuelve en DMSO, diluye en acetonitrilo y agua, y añade al anticuerpo reoxidado, reducido y enfriado en PBS. Después de aproximadamente una hora, se agrega un exceso de maleimido para extinguir la reacción y cubrir cualquier anticuerpo del grupo tiol no reactivo. La mezcla de reacción se concentra mediante ultrafiltración centrífuga y el anticuerpo anti-CD22 conjugado con fármacos y diseñado con cisteína se purifica y se desala por elusión a través de la resina G25 en PBS, se filtra a través de filtros de 0,2 µm en condiciones de esterilización y se congela para almacenarse.

La preparación de hu 10F4v3 HC(A118C) thiomab-BMPEO-DM1 se realizó de la siguiente manera. El anticuerpo sin cisteína en hu 10F4v3 HC(A118C) thiomab fue modificado por el reactivo de bis-maleimida BM(PEO)4 (Pierce Chemical), lo cual dejó un grupo maleimido no reaccionado en la superficie del anticuerpo. Esto se logró mediante la disolución de BM(PEO)4 en una mezcla de 50% de etanol/agua a una concentración de 10 mM y añadiendo un exceso molar de BM(PEO)4 de diez veces a una solución que contiene hu4D5Fabv8-(V110C) ThioFab en una solución salina fosfatada de aproximadamente 1,6 mg/ml (10 micromolares) y permitiendo que reaccione durante 1 hora. El exceso de BM(PEO)4 se eliminó por filtración en gel (columna HiTrap, Pharmacia) en 30 mM de citrato, pH 6 con 150 mM de tampón de NaCl. Aproximadamente un exceso molar de DM1 de 10 veces disuelto en dimetilacetamida (DMA) se agregó al hu4D5Fabv8-(V110C) ThioFab-BMPEO intermedio. Asimismo, puede emplearse dimetilformamida (DMF) para disolver el reactivo de fracciones de fármaco. Se permitió que la mezcla de reacción reaccione durante la noche antes de la filtración en gel o diálisis en PBS para eliminar el fármaco no reaccionado. La filtración en gel en las columnas S200 en PBS se utilizó para eliminar los

agregados de alto peso molecular y para suministrar hu 10F4v3 HC(A118C) thiomab-BMPEO-DM1 purificado.

A partir de los mismos protocolos, se prepararon anticuerpos de control HC (A118C) MAb-MC-MMAF, HC ThioMAb-MC-MMAF, HCThioMAb-MCvcPAB-MMAE y HC ThioMab-BMPEO-DM1.

Siguiendo los procedimientos anteriores, se prepararon y probaron los siguientes anticuerpos anti-CD22 conjugados con fármacos y diseñados con cisteína:

tio hu tio-HC-10F4v3-MC-MMAF por conjugación de A118C tio hu 10F4v3 y MC-MMAF;

tio hu tio-HC-10F4v3-MC-val-cit-PAB-MMAE por conjugación de A118C tio hu 10F4v3 y MC-val-cit-PAB-MMAE;

tio hu HC-10F4v3-bmpeo-DM1 por conjugación de A118C tio hu HC-10F4v3 y bmpeo-DM1;

tio hu LC-10F4v3-MC-val-cit-PAB-MMAE por conjugación de V205C tio hu LC-10F4v3 y MC-val-cit-PAB-MMAE; y

tio hu Fc-10F4v3-MC-val-cit-PAB-MMAE por conjugación de S400C tio hu Fc-10F4v3 y MC-val-cit-PAB-MMAE.

Ejemplo 12: Caracterización de la afinidad de unión de los conjugados de ThioMAb diseñados con cisteína con fármacos al antígeno de superficie celular

La afinidad de unión de los conjugados de tio hu 10F4v3 con fármacos al CD22 expresada en las células BJAB-lucs se determinó mediante análisis FACS. De manera resumida, entran en contacto aproximadamente 1×10^6 células en 100 μ l con diferentes cantidades de alguno de los siguientes conjugados de ThioMAb anti-CD22 con fármacos: tio hu LC(V205C) 10F4v3-MCvcPAB-MMAE, tio hu Fc(S400C) 10F4v3-MCvcPAB-MMAE, tio hu HC(A118C) 10F4v3-MCvcPAB-MMAE, tio hu HC(A118C) 10F4v3-MC-MMAF o tio hu HC(A118C) 10F4v3-BMPEO-DM1 (véanse las Figuras 18A-18E, respectivamente). El anticuerpo anti-CD22 unido a la superficie de la célula se detectó utilizando anti-huFc de cabra biotinilado más estreptavidina-PE. Los gráficos de las Figuras 18A-18E indican que la unión a antígeno fue aproximadamente la misma para todos los conjugados de thiomab con fármacos probados.

Ejemplo 13: Ensayo para reducir el volumen tumoral *in vivo* mediante conjugados de ThioMab anti-CD22 con fármacos

Fig 2

La capacidad de los conjugados de thiomab con fármacos preparados según el Ejemplo 11 para reducir el volumen tumoral de las células B en modelos de xenotransplantes se evaluó según el procedimiento desvelado en el Ejemplo 9 de la presente memoria descriptiva. A los ratones SCID con tumores de xenotransplantes de células Granta-519, el día 0 se le administraron conjugados de thiomab anti-CD22 humanizado 10F4v3 con fármacos y conjugados de control, tal como se muestra en la siguiente Tabla 14. El thiomab HC(A118C) de control fue un anticuerpo anti-HER2 4D5.

Tabla 14
 Reducción del volumen tumoral *in vivo*
 Administración del conjugado de Tio Hu10F4v3 con MMAE y MMAF
 en xenotransplantes de células Granta-519

Anticuerpo administrado	Dosis de MMAF o DM1 (µg/m ²)	Dosis de Ab (mg/kg)	Proporción del fármaco (Fármaco/ Ab)
Tio HC(A118C)-MC-MMAF de control	100	3.99	1.65
Tio HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE de control	100	4.33	1.55
Tio 10F4v3-HC(A118C)-MC-MMAF	100	3.41	1.95
Tio 10F4v3-LC(V205C)-MCvcPAB-MMAE	100	4.23	1.6
Tio 10F4v3-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE	100	3.76	1.8
Tio 10F4v3-Fc(S400C)-MCvcPAB-MMAE	100	4.23	1.6

Los resultados de este experimento se muestran en la Figura 19. La administración de los conjugados de thiomab tio 10F4v3-LC-(V205C)-MCvcPAB-MMAE y tio 10F4v3-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE con fármacos en las dosis que se muestran en la Tabla 14 redujeron el volumen tumoral medio durante la realización del estudio.

Se evaluaron conjugados de thiomab con fármacos adicionales en los xenotransplantes de células Granta-519 en ratones CB17 SCID utilizando el

mismo protocolo, aunque se probaron diferentes dosis del fármaco. El anticuerpo de control o thiomab de control fue un anticuerpo anti-HER2 4D5 o thiomab HC(A118C). Los resultados se muestran en la siguiente Tabla 15.

Tabla 15
 Reducción del volumen tumoral *in vivo*
 Administración del conjugado de Tio Hu10F4v3 con MMAE, MMAF y DM1
 en xenotransplantes de células Granta-519

Anticuerpo administrado	Dosis de MMAF o DM1 (µg/m ²)	Dosis de Ab (mg/kg)	Proporción del fármaco (Fármaco/ Ab)
10F4v3-MC-MMAF	150	3.2	3.1
Tio HC(A118C)-BMPEO-DM1 de control	300	10.3	1.9
Tio 10F4v3-HC(A118C)-BMPEO-DM1	150	5.2	1.9
Tio 10F4v3-HC(A118C)-BMPEO-DM1	300	10.4	1.9
Tio HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE de control	150	6.5	1.55
Tio 10F4v3-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE	150	5.3	1.9
Tio 10F4v3-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE	75	2.7	1.9
Tio HC(A118C)-MC-MMAF de control	150	5.2	1.9
Tio 10F4v3-HC(A118C)-MC-MMAF	150	5.1	1.95
Tio 10F4v3-HC(A118C)-MC-MMAF	75	2.6	1.95

Los resultados de este experimento se muestran en la Figura 20A. La administración del conjugado del thiomab tio 10F4v3-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE con fármaco a 150 y 75 µg/m² redujo el volumen tumoral medio durante la realización del estudio. En el mismo estudio, el cambio porcentual del peso corporal durante los primeros siete días se determinó en cada grupo de dosis. Los resultados graficados en la Figura 20B indican que la administración de estos conjugados de thiomab con fármacos no ocasionaron pérdida de peso durante este período de tiempo.

En un estudio similar, utilizando el mismo protocolo del estudio de xenotransplante tal como se desveló en los ejemplos anteriores y variando las dosis y TDC administrados, se analizó la eficacia de los TDC en xenotransplantes de DOHH2 con linfomas foliculares en ratones CB17 SCID. Los TDC y las dosis se muestran en la siguiente Tabla 16.

Tabla 16
Reducción del volumen tumoral *in vivo*
Administración del conjugado de Tio Hu10F4v3 con MMAE, MMAF y DM1
en xenotransplantes de células DOHH2

Anticuerpo administrado	Dosis de MMAF o DM1 (µg/m ²)	Dosis de Ab (mg/kg)	Proporción del fármaco (Fármaco/ Ab)
10F4v3-MC-MMAF	300	6.4	3.1
Tio HC(A118C)-BMPEO-DM1 de control	600	21.9	1.79
Tio 10F4v3-HC(A118C)-BMPEO-DM1	600	20.8	1.9
Tio 10F4v3-HC(A118C)-BMPEO-DM1	300	10.4	1.9
Tio HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE de control	600	26.0	1.55
Tio 10F4v3-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE	600	21.4	1.9
Tio 10F4v3-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE	300	10.7	1.9
Tio HC(A118C)-MC-MMAF de control	600	20.8	1.9
Tio 10F4v3-HC(A118C)-MC-MMAF	600	20.4	1.95
Tio 10F4v3-HC(A118C)-MC-MMAF	300	10.2	1.95

La Figura 20C es un gráfico que muestra los cambios en el volumen tumoral medio producidos durante el transcurso del tiempo en los xenotransplantes de DOHH2 con linfomas foliculares en ratones CB17 SCID tratados con los mismos A118C anti-CD22 TDC de cadena pesada pero con dosis más elevadas, tal como se muestra en la Tabla 16. El anti-CD22 10F4v3-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE TDC aparentemente fue el más eficaz de los agentes de prueba de este estudio. Sin embargo, en los niveles de dosis más

elevados en este experimento, se observó cierta eficacia en los controles anti-HER2-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE. Esta actividad posiblemente se atribuya a la liberación del fármaco del ADC en circulación. Los agentes de prueba anti-CD22 hu10F4-HC(A118C)-MC-MMAF y -BMPEO-DM1 exhibieron un grado intermedio de eficacia y, consecuentemente con la mayor estabilidad de estos enlazadores, los controles anti-HER2 sin unión demostraron poca actividad. La Figura 20D es un diagrama sobre el porcentaje de cambios de peso en los ratones utilizados en el estudio del xenotransplante DOHH2 que muestra que no se produjo ningún cambio de peso significativo durante los primeros 14 días del estudio.

Ejemplo 14: Seguridad de los conjugados de anti-CD22 con fármacos en ratas y monos cinomolgus

El anticuerpo anti-CD22 hu10F4 reacciona con el CD22 de mono cinomolgus con una afinidad equivalente a la del CD22 humano. El anticuerpo anti-CD22 hu10F4 no reacciona con el CD22 de rata. En consecuencia, la toxicidad y seguridad dependiente e independiente del elemento diana de los conjugados de anti-CD22 con fármacos se evaluaron en ratas y monos cinomolgus respectivamente.

Seguridad y toxicidad en ratas

Se realizaron dos estudios para evaluar la seguridad y toxicidad en ratas. En uno de los estudios, las ratas recibieron en el día 1 dosis intravenosas de conjugados de hu10F4v3-SMCC-DM1, -SPP-DM1, -MC-vc-PAB-MMAE o -MC-MMAF, en los que el fármaco se unió a través de un enlazador escindible (-vc- o -spp-) o no escindible (MC o SMCC (también denominado MCC)). El vehículo se administró como el control. El día 5, se extrajeron las muestras de sangre para realizar análisis farmacocinéticos; también se recogieron el día 12 (durante la necropsia). Se registraron las observaciones clínicas y el peso corporal al menos tres veces por semana. Se monitorizó el AST (aspartato aminotransferasa) en suero como indicador de toxicidad. Los niveles de AST en suero incrementaron el día 5 en relación con el día 0 en ratas que recibieron dosis de 20 mg/kg de hu10F4v3-vcMMAE y hu10F4v3-SPP-DM1 con enlazadores escindibles (Figura 21A). Los niveles de neutrófilo se incrementaron el día 5 en relación con el día 0 en ratas que recibieron dosis de 20 mg/kg de hu10F4v3-MC-MMAF o hu10F4v3-MCC-DM1 con enlazadores no escindibles (Figura 21B). Los niveles de neutrófilo disminuyeron el día 5 en relación con el día 0 en ratas que

recibieron dosis de hu10F4v3-vc-MMAE o hu10F4v3-SPP-DM1. El incremento del AST en suero y la disminución de los neutrófilos en ratas que recibieron dosis de ADC con enlazadores escindibles indican mayor toxicidad por parte de dichos ADC.

En el mismo estudio realizado con ratas, seis animales por grupo recibieron dosis de 20, 40 ó 60 mg/kg de hu10F4v3-MC-MMAF o hu10F4v3-SMCC-DM1 el día 1 y se monitorizaron durante doce días. En animales que recibieron dosis de hu10F4v3-MC-MMAF, no se registraron observaciones en los siguientes indicadores: disminución en el peso corporal, incrementos en las enzimas séricas del hígado, disminuciones en las plaquetas o disminuciones en los neutrófilos. En ratas que recibieron dosis de hu10F4v3-SMCC-DM1, las disminuciones reversibles del peso corporal y los incrementos reversibles en las enzimas séricas del hígado se observaron en los niveles de dosificación de 40 y 60 mg/kg, mientras que las disminuciones reversibles en los neutrófilos y las disminuciones transitorias en las plaquetas se observaron en la dosificación de 60 mg/kg.

Seguridad y toxicidad en monos cinomolgus

Para evaluar la seguridad y toxicidad de los ADC de anti-CD22 en un modelo de primates, se asignaron treinta monos cinomolgus a los siguientes grupos de tratamiento: control de vehículo (6 animales), hu10F4v3-SMCC-DM1 en dosis de 2, 4 y 6 mg/m² del fármaco (equivalente a 0, 10, 20 y 30 mg/kg de la dosis del anticuerpo, 4 animales por grupo de dosificación) y hu10F4v3-MC-MMAF en dosis de 2, 4 y 6 mg/m² (4 animales por grupo de dosificación). Los días 1 y 22, los animales recibieron dosis intravenosas. Se evaluaron para detectar cambios en el peso corporal, consumo de alimentos e índices patológicos. Se extrajeron las muestras de sangre y se analizaron para evaluar los efectos toxicológicos, farmacodinámicos y antifármacos del anticuerpo. La mitad de los animales en cada grupo se sacrificaron en los días 25 y 43, y se recolectaron muestras de tejido.

No se observaron cambios notables en el peso corporal en ningún grupo de ADC. Los niveles de las enzimas séricas del hígado AST (aspartato aminotransferasa), ALT (aminotransferasa) y GGT (gama-glutamil transpeptidasa) se analizaron según los métodos estándar bien conocidos en los sectores pertinentes. Los incrementos reversibles en las enzimas séricas del hígado se observaron en animales que recibieron dosis de 30 mg/kg de cualquier ADC, a pesar de que la ALT se incrementó en el grupo DM1 y que la AST y GGT se

20

incrementaron en el grupo MMAF. La degeneración del nervio ciático fue entre mínima y leve en el grupo DM1 en 2 de 4 animales que recibieron dosis de 20 mg/kg y en 4 de 4 animales que recibieron dosis de 30 mg/kg. La degeneración del nervio ciático fue mínima en el grupo MMAF en 1 de 4 animales que recibieron dosis de 30 mg/kg. Se examinó microscópicamente tejido de diversos órganos. Dos de cuatro animales en el grupo de MMAF que recibieron dosis de 30 mg/kg sufrieron lesiones pulmonares de importancia desconocida, mientras que no se observaron lesiones en el grupo DM1.

La reducción de células B periféricas por la acción de los ADC de hu10F4v3-MC-MMAF y –SMCC-DM1 se determinó a partir de la medición de los niveles de células CD20⁺ en sangre durante 43 días en monos cinomolgus que recibieron dosis los días 0 y 22. Durante el estudio, se analizó la sangre extraída periódicamente mediante análisis FACS utilizando un anticuerpo anti-CD20 marcado fluorescentemente. Los ADC de anti-CD22 MMAF y DM1 reducen las células B periféricas de los monos cinomolgus, tal como se muestra en la Figura 22A (grupo MMAF) y en la Figura 22B (grupo DM1). No se observaron efectos significativos de los ADC de MMAF o DM1 para otras poblaciones de linfocitos, tal como se muestra en las Figuras 23A y 23B, en las que se muestra que las células CD4⁺ no se redujeron significativamente durante el mismo período de tiempo.

El Hu10F4v3-SMCC-DM1 redujo las células B del centro germinal en las muestras tonsilares de los monos cinomolgus con respecto al control, tal como se muestra en los fotomicrográficos de las Figuras 24A y 24B. Los centros germinales ejemplares aparecen encerrados con un círculo en la Figura 24A. La ablación completa de las células B del centro germinal se observó en el nivel de dosificación de 10 mg/kg, tal como se muestra en la Figura 24B. Se obtuvieron los mismos resultados administrando el ADC de hu10F4v3-MC-MMAF en las mismas condiciones.

El Hu10F4v3-MC-MMAF administrado a 10 mg/kg redujo las células B que se dividen de los centros germinales de los folículos linfoides de los monos cynomolgus. Véase el diagrama de la Figura 25A y los fotomicrográficos de tejido en las Figuras 25B y 25C. Los mismos resultados se obtuvieron cuando el ADC de hu10F4v3-SMCC-DM1 se probó en las mismas condiciones. Los centros germinales aparecen como regiones oscuras en la Figura 25B utilizando tinción Ki-67 y aparecen en la Figura 25D como áreas sin tinción rodeadas de regiones

201

oscuras cuando se los tiñe con anti-IgD y se los marca de manera detectable. La pérdida de los centros germinales ocasionada por la reducción de las células B de los centros germinales por anti-10F4v3-MC-MMAF se muestra en las Figuras 25C y 25E. Por lo tanto, estos fármacos antimitóticos afectan las poblaciones de células B en proliferación.

En la American Type Culture Collection, PO Box 1549, Manassas, VA, 20108, Estados Unidos (ATCC) se ha depositado el siguiente hibridoma:

<u>Líneas celulares</u>	<u>N.º de acceso de ATCC</u>	<u>Fecha de depósito</u>
Hibridoma 10F4.4.1	PTA-7621	6 de mayo de 2006
Hibridoma 5E8.1.8	PTA-7620	6 de mayo de 2006

Estos depósitos se realizaron de conformidad con los términos del Tratado de Budapest sobre el Reconocimiento internacional del depósito de microorganismos a los fines del procedimiento en materia de patentes y el Reglamento del mismo (Tratado de Budapest). Esto asegura el mantenimiento de un depósito viable durante 30 años a partir de la fecha de depósito. La ATCC pondrá a disposición estas líneas celulares según los términos del Tratado de Budapest y sujeto al acuerdo entre Genentech, Inc. y ATCC, que garantiza la disponibilidad permanente e ilimitada al público de las líneas celulares del depósito una vez concedida la patente de EE.UU. pertinente o una vez que se haga pública cualquier solicitud de patente de EE.UU. o extranjera, lo que ocurra primero, y asegura la disponibilidad de las líneas celulares a la persona que determine el Comisionado de Patentes y Marcas Registradas de EE.UU. para que tenga derecho a las mismas, en función del artículo 122 del Título 35 del Código de EE.UU. (35 USC § 122) y las normas del Comisionado de conformidad con lo anterior (incluyendo el artículo 1.14 del Título 37 del Código de Normas Federales (37 CFR § 1.14), con especial referencia a 886 OG 638).

El beneficiario de la presente solicitud ha aceptado que en caso de que las líneas celulares depositadas se pierdan o resulten destruidas cuando se cultiven en las condiciones adecuadas, serán inmediatamente sustituidas previa notificación con especímenes de la misma línea celular. La disponibilidad de las líneas celulares depositadas no debe interpretarse como una licencia para

practicar la invención en contravención de los derechos otorgados por la autoridad de cualquier gobierno, de acuerdo con sus leyes de patentes.

Aunque la anterior invención se ha descrito en detalle a modo de ejemplo a efectos de claridad y comprensión, las descripciones y ejemplos no se deben interpretar de forma que limiten el ámbito de la invención. El contenido de todas las patentes y documentos científicos citados en la presente memoria descriptiva quedan expresamente incorporados en la misma en su integridad a modo de referencia.

287

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo que se une a CD22, donde el anticuerpo comprende (a) una HVR-L1 que contiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de un identificador de secuencia n.º: 9, 10, 19-23, 32 y 33, y (b) al menos una, dos, tres, cuatro o cinco HVR seleccionadas entre:
 - (1) una HVR-H1 que comprenda la secuencia de aminoácidos de identificador de secuencia n.º: 2;
 - (2) una HVR-H2 que comprenda la secuencia de aminoácidos de identificador de secuencia n.º: 4;
 - (3) una HVR-H3 que comprenda la secuencia de aminoácidos de identificador de secuencia n.º: 6;
 - (4) una HVR-L2 que comprenda la secuencia de aminoácidos de identificador de secuencia n.º: 12; y
 - (5) una HVR-L3 que comprenda una secuencia de aminoácidos de identificador de secuencia n.º: 14.
2. El anticuerpo de la reivindicación 1, que comprende una HVR-L1 que comprenda una secuencia de aminoácidos que se adapte a la secuencia de consenso de identificador de secuencia n.º: 10.
3. El anticuerpo de la reivindicación 2, que comprende, además, una HVR-H1 que contiene la secuencia de aminoácidos de identificador de secuencia n.º: 2 y una HVR-H2 que contiene la secuencia de aminoácidos de identificador de secuencia n.º: 4, y una HVR-H3 que contiene la secuencia de aminoácidos de identificador de secuencia n.º: 6.
4. El anticuerpo de la reivindicación 1, donde la HVR-L1 comprende el identificador de secuencia n.º: 9 y el anticuerpo comprende, además, una HVR-H1 que comprende una secuencia de aminoácidos de identificador de secuencia n.º: 2, una HVR-H2 que comprende una secuencia de aminoácidos de identificador de secuencia n.º: 4 y una HVR-H3 que comprende una secuencia de aminoácidos de identificador de secuencia n.º: 6.
5. El anticuerpo de la reivindicación 1, donde la HVR-L1 comprende el identificador de secuencia n.º: 19 y el anticuerpo comprende, además, una HVR-H1 que comprende una secuencia de aminoácidos de identificador de secuencia n.º: 2, una HVR-H2 que comprende una secuencia de aminoácidos

gab

- de identificador de secuencia n.º: 4 y una HVR-H3 que comprende una secuencia de aminoácidos de identificador de secuencia n.º: 6.
6. El anticuerpo de la reivindicación 1, donde la HVR-L1 comprende el identificador de secuencia n.º: 20 y el anticuerpo comprende, además, una HVR-H1 que comprende una secuencia de aminoácidos de identificador de secuencia n.º: 2, una HVR-H2 que comprende una secuencia de aminoácidos de identificador de secuencia n.º: 4 y una HVR-H3 que comprende una secuencia de aminoácidos de identificador de secuencia n.º: 6.
 7. El anticuerpo de la reivindicación 1, donde la HVR-L1 comprende el identificador de secuencia n.º: 21 y el anticuerpo comprende, además, una HVR-H1 que comprende una secuencia de aminoácidos de identificador de secuencia n.º: 2, una HVR-H2 que comprende una secuencia de aminoácidos de identificador de secuencia n.º: 4 y una HVR-H3 que comprende una secuencia de aminoácidos de identificador de secuencia n.º: 6.
 8. El anticuerpo de la reivindicación 1, donde la HVR-L1 comprende el identificador de secuencia n.º: 22 y el anticuerpo comprende, además, una HVR-H1 que comprende una secuencia de aminoácidos de identificador de secuencia n.º: 2, una HVR-H2 que comprende una secuencia de aminoácidos de identificador de secuencia n.º: 4 y una HVR-H3 que comprende una secuencia de aminoácidos de identificador de secuencia n.º: 6.
 9. El anticuerpo de la reivindicación 1, donde la HVR-L1 comprende el identificador de secuencia n.º: 23 y el anticuerpo comprende, además, una HVR-H1 que comprende una secuencia de aminoácidos de identificador de secuencia n.º: 2, una HVR-H2 que comprende una secuencia de aminoácidos de identificador de secuencia n.º: 4 y una HVR-H3 que comprende una secuencia de aminoácidos de identificador de secuencia n.º: 6.
 10. El anticuerpo de la reivindicación 1, donde la HVR-L1 comprende el identificador de secuencia n.º: 32 y el anticuerpo comprende, además, una HVR-H1 que comprende una secuencia de aminoácidos de identificador de secuencia n.º: 2, una HVR-H2 que comprende una secuencia de aminoácidos de identificador de secuencia n.º: 4 y una HVR-H3 que comprende una secuencia de aminoácidos de identificador de secuencia n.º: 6.
 11. El anticuerpo de la reivindicación 1, donde la HVR-L1 comprende el identificador de secuencia n.º: 33 y el anticuerpo comprende, además, una HVR-H1 que comprende una secuencia de aminoácidos de identificador de

207

secuencia n.º: 2, una HVR-H2 que comprende una secuencia de aminoácidos de identificador de secuencia n.º: 4 y una HVR-H3 que comprende una secuencia de aminoácidos de identificador de secuencia n.º: 6.

12. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1, que comprende, además, al menos una estructura seleccionada entre una estructura de consenso del subgrupo III de VH y una estructura de consenso del subgrupo I de VL.
13. El anticuerpo de la reivindicación 1, donde el anticuerpo comprende un dominio variable de la cadena pesada con al menos un 90% de identificación de secuencia con respecto a la secuencia de aminoácidos seleccionada del identificador de secuencia n.º: 16.
14. El anticuerpo de la reivindicación 1, donde el anticuerpo comprende un dominio variable de la cadena ligera con al menos un 90% de identificación de secuencia con respecto a la secuencia de aminoácidos seleccionada del identificador de secuencia n.º: 17.
15. El anticuerpo de la reivindicación 1, donde el anticuerpo comprende un dominio variable de la cadena ligera con al menos un 90% de identificación de secuencia con respecto a la secuencia de aminoácidos seleccionada del identificador de secuencia n.º: 18.
16. El anticuerpo de la reivindicación 1, donde el anticuerpo comprende un dominio variable de la cadena pesada que contiene uno, dos, tres o cuatro estructuras de secuencias de aminoácidos seleccionadas del identificador de secuencia n.º: 1, 3, 5 y 7.
17. El anticuerpo de la reivindicación 1, donde el anticuerpo comprende un dominio variable de la cadena ligera que contiene uno, dos, tres o cuatro estructuras de secuencias de aminoácidos seleccionadas del identificador de secuencia n.º: 8, 11, 13 y 15.
18. El anticuerpo de la reivindicación 13, que comprende, además, un dominio variable de la cadena ligera con al menos un 90% de identificación de secuencia con respecto a la secuencia de aminoácidos seleccionada del identificador de secuencia n.º: 17.
19. El anticuerpo de la reivindicación 13, que comprende, además, un dominio variable de la cadena ligera con al menos un 90% de identificación de secuencia con respecto a la secuencia de aminoácidos seleccionada del identificador de secuencia n.º: 18.

228

20. El anticuerpo de la reivindicación 1, donde el anticuerpo comprende una cadena pesada con al menos un 90% de identificación de secuencia con respecto a la secuencia de aminoácidos seleccionada del identificador de secuencia n.º: 88.
21. El anticuerpo de la reivindicación 1, donde el anticuerpo comprende una cadena ligera con al menos un 90% de identificación de secuencia con respecto a la secuencia de aminoácidos seleccionada del identificador de secuencia n.º: 87.
22. El anticuerpo de la reivindicación 1, donde el anticuerpo comprende una cadena pesada que contiene la secuencia de aminoácidos del identificador de secuencia n.º: 88, y una cadena ligera que contiene la secuencia de aminoácidos del identificador de secuencia n.º: 87.
23. Un anticuerpo que se une a CD22, donde el anticuerpo comprende un dominio variable de la cadena pesada con al menos un 90% de identificación de la secuencia con respecto a la secuencia de aminoácidos de identificador de secuencia n.º: 16.
24. El anticuerpo de la reivindicación 23, que comprende, además, un dominio variable de la cadena ligera con al menos un 90% de identificación de la secuencia con respecto a la secuencia de aminoácidos de identificador de secuencia n.º: 17.
25. El anticuerpo de la reivindicación 23, que comprende, además, un dominio variable de la cadena ligera con al menos un 90% de identificación de la secuencia con respecto a la secuencia de aminoácidos de identificador de secuencia n.º: 18.
26. El anticuerpo de la reivindicación 1, donde el anticuerpo comprende uno, dos, tres, cuatro, cinco o seis HVR del anticuerpo que produce el hibridoma de ATCC, entrada n.º PTA-7621 (10F4.4.1).
27. Un anticuerpo que comprende uno, dos, tres, cuatro, cinco o seis HVR del anticuerpo producido por el hibridoma de ATCC, entrada n.º PTA-7620 (5E8.1.8).
28. El anticuerpo de la reivindicación 1, donde el anticuerpo es humanizado.
29. El anticuerpo de la reivindicación 23, donde el anticuerpo es humanizado.
30. El anticuerpo de la reivindicación 1, donde CD22 es un CD22 mamífero.
31. El anticuerpo de la reivindicación 30, donde el CD22 se selecciona del CD22 de un roedor y el CD22 de un primate.

299

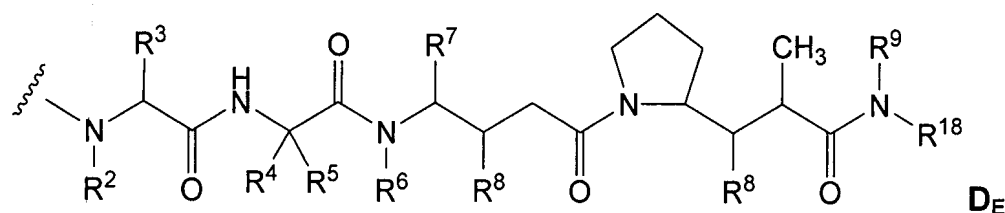
32. El anticuerpo de la reivindicación 31, donde CD22 es un CD22 humano.
33. El anticuerpo de la reivindicación 23, donde CD22 es un CD22 mamífero.
34. El anticuerpo de la reivindicación 33, donde el CD22 se selecciona del CD22 de un roedor y el CD22 de un primate.
35. El anticuerpo de la reivindicación 34, donde CD22 es un CD22 humano.
36. Un polinucleótido que codifica un anticuerpo de la reivindicación 1.
37. Un polinucleótido que codifica un anticuerpo de la reivindicación 23.
38. Un vector que comprenda el polinucleótido de la reivindicación 36.
39. Un vector que comprenda el polinucleótido de la reivindicación 37.
40. Una célula huésped que comprende el vector de la reivindicación 38.
41. Una célula huésped que comprende el vector de la reivindicación 39.
42. La célula huésped de la reivindicación 40, donde la célula huésped es eucariótica.
43. La célula huésped de la reivindicación 42, donde la célula huésped es una célula CHO.
44. La célula huésped de la reivindicación 41, donde la célula huésped es eucariótica.
45. La célula huésped de la reivindicación 44, donde la célula huésped es una célula CHO.
46. Un método de fabricación de un anticuerpo anti-CD22, en el que el método comprende a) el cultivo de la célula huésped de la reivindicación 38 en condiciones aptas para la expresión del polinucleótido que codifica el anticuerpo, y b) el aislamiento del anticuerpo.
47. Un método de fabricación de un anticuerpo anti-CD22, en el que el método comprende a) el cultivo de la célula huésped de la reivindicación 39 en condiciones aptas para la expresión del polinucleótido que codifica el anticuerpo, y b) el aislamiento del anticuerpo.
48. El anticuerpo de la reivindicación 28, donde el CD22 se expresa en la superficie de una célula.
49. El anticuerpo de la reivindicación 48, en el que la célula es una célula B.
50. El anticuerpo de la reivindicación 29, donde el CD22 se expresa en la superficie de una célula.
51. El anticuerpo de la reivindicación 50, en el que el CD22 es una célula B.

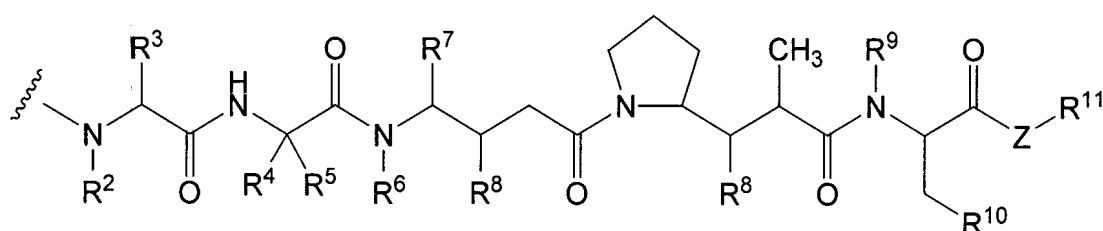
52. El anticuerpo de la reivindicación 1, donde el anticuerpo se une a un epítipo en una región de CD22 de aminoácidos del 22 al 240 del identificador de secuencia n.º: 27.
53. El anticuerpo de la reivindicación 23, donde el anticuerpo se une a un epítipo en una región de CD22 de aminoácidos del 22 al 240 del identificador de secuencia n.º: 27.
54. El anticuerpo de la reivindicación 49, en el que la célula B se asocia a un trastorno proliferativo de células B.
55. El anticuerpo de la reivindicación 54, en el que el trastorno proliferativo de células B es un cáncer.
56. El anticuerpo de la reivindicación 54, en el que el trastorno proliferativo de células B se selecciona a partir de los linfoma, linfoma no Hodgkins (LNH), LNH agresivo, LNH agresivo recurrente, LNH indolente recurrente, LNH refractario, LNH indolente refractario, leucemia linfocítica crónica (LLC), linfoma linfocítico de células pequeñas, leucemia, leucemia de células pilosas (LCP), leucemia linfocítica aguda (LLA) y linfoma de células del manto.
57. El anticuerpo de la reivindicación 51, en el que la célula B se asocia a un trastorno proliferativo de células B.
58. El anticuerpo de la reivindicación 57, en el que el trastorno proliferativo de células B es un cáncer.
59. El anticuerpo de la reivindicación 57, en el que el trastorno proliferativo de células B se selecciona a partir de los linfoma, linfoma no Hodgkins (LNH), LNH agresivo, LNH agresivo recurrente, LNH indolente recurrente, LNH refractario, LNH indolente refractario, leucemia linfocítica crónica (LLC), linfoma linfocítico de células pequeñas, leucemia, leucemia de células pilosas (LCP), leucemia linfocítica aguda (LLA) y linfoma de células del manto.
60. El anticuerpo de la reivindicación 1, en el que el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.
61. El anticuerpo de la reivindicación 60, donde el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo seleccionado entre el fragmento Fab, Fab' -SH, Fv, scFv o (Fab')₂.
62. El anticuerpo de la reivindicación 60, donde el anticuerpo es humanizado.
63. El anticuerpo de la reivindicación 60, donde el anticuerpo es humano.

64. El anticuerpo de la reivindicación 23, en el que el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.
65. El anticuerpo de la reivindicación 64, donde el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo seleccionado entre el fragmento Fab, Fab' -SH, Fv, scFv o (Fab')₂.
66. El anticuerpo de la reivindicación 64, donde el anticuerpo es humanizado.
67. El anticuerpo de la reivindicación 64, donde el anticuerpo es humano.
68. El anticuerpo de la reivindicación 1, en el que el anticuerpo se une al mismo epítipo que un anticuerpo seleccionado de ATCC PTA-7621 (10F4.4.1); ATCC PTA-7620 (5E8.1.8); y un anticuerpo que comprende una secuencia de la cadena pesada de identificador de secuencia n.º: 88 y una secuencia de la cadena ligera de identificador de secuencia n.º: 87.
69. El anticuerpo de la reivindicación 23, en el que el anticuerpo se une al mismo epítipo que un anticuerpo seleccionado de ATCC PTA-7621 (10F4.4.1); ATCC PTA-7620 (5E8.1.8); y un anticuerpo que comprende una secuencia de la cadena pesada de identificador de secuencia n.º: 88 y una secuencia de la cadena ligera de identificador de secuencia n.º: 87.
70. Un método de detección de la presencia de CD22 en una muestra biológica, dicho método comprende establecer el contacto entre la muestra biológica y un anticuerpo de la reivindicación 1 en condiciones que faciliten la unión del anticuerpo a CD22, y detectar si un complejo está formado por el anticuerpo y CD22.
71. El método de la reivindicación 70, donde la muestra biológica se obtiene de un paciente que se cree que padece un trastorno proliferativo de células B.
72. El método de la reivindicación 71, en el que el trastorno proliferativo de células B se selecciona a partir de los linfoma, linfoma no Hodgkins (LNH), LNH agresivo, LNH agresivo recurrente, LNH indolente recurrente, LNH refractario, LNH indolente refractario, leucemia linfocítica crónica (LLC), linfoma linfocítico de células pequeñas, leucemia, leucemia de células pilosas (LCP), leucemia linfocítica aguda (LLA) y linfoma de células del manto.
73. Un método de detección de la presencia de CD22 en una muestra biológica, dicho método comprende establecer el contacto entre la muestra biológica y un anticuerpo de la reivindicación 23 en condiciones que faciliten la unión del anticuerpo a CD22, y detectar si un complejo está formado por el anticuerpo y CD22.

292

74. El método de la reivindicación 73, donde la muestra biológica se obtiene de un paciente que se cree que padece un trastorno proliferativo de células B.
75. El método de la reivindicación 74, en el que el trastorno proliferativo de células B se selecciona a partir de los linfoma, linfoma no Hogkins (LNH), LNH agresivo, LNH agresivo recurrente, LNH indolente recurrente, LNH refractario, LNH indolente refractario, leucemia linfocítica crónica (LLC), linfoma linfocítico de células pequeñas, leucemia, leucemia de células pilosas (LCP), leucemia linfocítica aguda (LLA) y linfoma de células del manto.
76. Un inmunoconjugado que comprende un anticuerpo de la reivindicación 1 que se une covalentemente a un agente citotóxico.
77. Un inmunoconjugado que comprende un anticuerpo de la reivindicación 23 que se une covalentemente a un agente citotóxico.
78. El inmunoconjugado de la reivindicación 76, donde el agente citotóxico se selecciona a partir de una toxina, un agente quimioterapéutico, una fracción de fármaco, un antibiótico, un isótopo radioactivo y una enzima nucleolítica.
79. Un inmunoconjugado de la reivindicación 78 que comprende la fórmula Ab-(L-D)p, donde:
- (a) Ab es el anticuerpo de la reivindicación 1;
 - (b) L es un enlazador;
 - (c) D es una fracción de fármaco.
80. El inmunoconjugado de la reivindicación 79, en el que L se selecciona a partir de 6-maleimidocaproilo (MC), maleimidopropanoilo (MP), valina-citrulina (val-cit), alanina-fenilalanina (ala-phe), p-aminobensiloxicarbonil (PAB), N-Succinimidil 4-(2-piridiltio) pentanoato (SPP), N-Succinimidil 4-(N-maleimidometil) ciclohexano-1 carboxilato (SMCC), y N-Succinimidil (4-yodoacetil) aminobenzoato (SIAB).
81. El inmunoconjugado de la reivindicación 79, en el que D se selecciona a partir de una auristatina y una dolastatina.
82. El inmunoconjugado de la reivindicación 81, en el que D es una fracción de fármaco de la fórmula D_E o D_F:





D_F

y donde R² y R⁶ son, cada uno, metilo; R³ y R⁴ son cada uno isopropilo; R⁷ es sec butilo, cada R⁸ se selecciona independientemente entre CH₃, O-CH₃, OH, y H; R⁹ es H; R¹⁰ es arilo; Z es -O- o -NH-; R¹¹ es H, C₁-C₈ alquilo o -(CH₂)₂-O-(CH₂)₂-O-(CH₂)₂-O-CH₃; y R¹⁸ es -C(R⁸)₂-C(R⁸)₂-arilo; y

(d) p oscila entre aproximadamente 1 y 8.

83. El immunoconjugado de la reivindicación 76, con actividad de destrucción celular in vitro o in vivo.
84. El immunoconjugado de la reivindicación 79, donde el enlazador se une al anticuerpo a través de un grupo tiol en el anticuerpo.
85. El immunoconjugado de la reivindicación 79, donde el enlazador es escindible mediante una proteasa.
86. El immunoconjugado de la reivindicación 80, donde el enlazador comprende un dipéptido val-cit.
87. El immunoconjugado de la reivindicación 79, donde el enlazador comprende una unidad p-aminobencilo.
88. El immunoconjugado de la reivindicación 80, donde el enlazador comprende 6-maleimidocaproilo.
89. El immunoconjugado de la reivindicación 82, donde el fármaco se selecciona entre MMAE y MMAF.
90. El immunoconjugado de la reivindicación 89, donde el fármaco es MMAE.
91. El immunoconjugado de la reivindicación 89, donde el fármaco es MMAF.
92. El immunoconjugado de la reivindicación 77, donde el agente citotóxico se selecciona a partir de una toxina, un agente quimioterapéutico, una fracción de fármaco, un antibiótico, un isótopo radioactivo y una enzima nucleolítica.
93. Un immunoconjugado de la reivindicación 92 que comprende la fórmula Ab-(L-D)_p, donde:
 - (a) Ab es el anticuerpo de la reivindicación 23;
 - (b) L es un enlazador;
 - (c) D es una fracción de fármaco.

294

94. El inmunoconjugado de la reivindicación 93, en el que L se selecciona a partir de 6-maleimidocaproilo (MC), maleimidopropanoilo (MP), valina-citrulina (val-cit), alanina-fenilalanina (ala-phe), p-aminobensiloxycarbonil (PAB), N-Succinimidil 4-(2-piridiltio) pentanoato (SPP), N-Succinimidil 4-(N-maleimidometil) ciclohexano-1 carboxilato (SMCC), y N-Succinimidil (4-yodoacetil) aminobenzoato (SIAB).
95. El inmunoconjugado de la reivindicación 93, donde el enlazador L es escindible mediante una proteasa.
96. El inmunoconjugado de la reivindicación 94, donde L comprende un dipéptido val-cit.
97. El inmunoconjugado de la reivindicación 93, donde L comprende una unidad p-aminobencilo.
98. El inmunoconjugado de la reivindicación 97, donde la unidad p-aminobencilo es p-aminobenciloxycarbonilo (PAB).
99. El inmunoconjugado de la reivindicación 94, donde L comprende 6-maleimidocaproilo (MC).
100. El inmunoconjugado de la reivindicación 94, donde el enlazador comprende 6-maleimidocaproilo y p-aminobenziloxycarbonilo.
101. El inmunoconjugado de la reivindicación 79, donde el inmunoconjugado tiene la fórmula
Ab-(L-MMAE)_p,
donde L es un enlazador y p oscila entre 2 y 5.
102. El inmunoconjugado de la reivindicación 101, donde L comprende val-cit.
103. El inmunoconjugado de la reivindicación 101, donde L comprende MC.
104. El inmunoconjugado de la reivindicación 101, donde L comprende PAB.
105. El inmunoconjugado de la reivindicación 101, donde L comprende MC-PAB.
106. El inmunoconjugado de la reivindicación 93, donde el inmunoconjugado tiene la fórmula
Ab-(L-MMAE)_p,
donde L es un enlazador y p oscila entre 2 y 5.
107. El inmunoconjugado de la reivindicación 106, donde L comprende val-cit.
108. El inmunoconjugado de la reivindicación 106, donde L comprende MC.
109. El inmunoconjugado de la reivindicación 106, donde L comprende PAB.
110. El inmunoconjugado de la reivindicación 106, donde L comprende MC-PAB.

111. El immunoconjugado de la reivindicación 79, donde el immunoconjugado tiene la fórmula
- Ab-(L-MMAF)p,
- donde L es un enlazador y p oscila entre 2 y 5.
112. El immunoconjugado de la reivindicación 111, donde L comprende val-cit.
113. El immunoconjugado de la reivindicación 111, donde L comprende MC.
114. El immunoconjugado de la reivindicación 111, donde L comprende PAB.
115. El immunoconjugado de la reivindicación 111, donde L comprende MC-PAB.
116. El immunoconjugado de la reivindicación 93, donde el immunoconjugado tiene la fórmula
- Ab-(L-MMAF)p,
- donde L es un enlazador y p oscila entre 2 y 5.
117. El immunoconjugado de la reivindicación 116, donde L comprende val-cit.
118. El immunoconjugado de la reivindicación 116, donde L comprende MC.
119. El immunoconjugado de la reivindicación 116, donde L comprende PAB.
120. El immunoconjugado de la reivindicación 116, donde L comprende MC-PAB.
121. El immunoconjugado de la reivindicación 79, donde D es un maitansinoide.
122. El immunoconjugado de la reivindicación 121, donde D se selecciona a partir de DM1, DM3 y DM4.
123. El immunoconjugado de la reivindicación 121, con actividad de destrucción celular in vitro o in vivo.
124. El immunoconjugado de la reivindicación 121, donde el enlazador se une al anticuerpo a través de un grupo tiol en el anticuerpo.
125. El immunoconjugado de la reivindicación 121, donde el enlazador L se selecciona a partir de N-Succinimidil 4-(2-piridiltio) pentanoato (SPP), N-Succinimidil 4-(N-maleimidometil) ciclohexano-1 carboxilato (SMCC) y N-Succinimidil (4-yodo-acetil) aminobenzoato (SIAB).
126. El immunoconjugado de la reivindicación 122, donde el fármaco es DM1.
127. El immunoconjugado de la reivindicación 122, donde L comprende un SPP.
128. El immunoconjugado de la reivindicación 122, donde L comprende SMCC.
129. El immunoconjugado de la reivindicación 122, donde p oscila entre 2 y 4.
130. El immunoconjugado de la reivindicación 122, donde p oscila entre 3 y 4.
131. El immunoconjugado de la reivindicación 93, donde D es un maitansinoide.
132. El immunoconjugado de la reivindicación 131, donde D se selecciona a partir de DM1, DM3 y DM4.

296

133. El inmunoconjugado de la reivindicación 131, con actividad de destrucción celular in vitro o in vivo.
134. El inmunoconjugado de la reivindicación 131, donde el enlazador se une al anticuerpo a través de un grupo tiol en el anticuerpo.
135. El inmunoconjugado de la reivindicación 131, donde el enlazador L se selecciona a partir de N-Succinimidil 4-(2-piridiltio) pentanoato (SPP), N-Succinimidil 4-(N-maleimidometil) ciclohexano-1 carboxilato (SMCC) y N-Succinimidil (4-yodo-acetil) aminobenzoato (SIAB).
136. El inmunoconjugado de la reivindicación 132, donde el fármaco es DM1.
137. El inmunoconjugado de la reivindicación 136, donde L comprende un SPP.
138. El inmunoconjugado de la reivindicación 136, donde L comprende SMCC.
139. El inmunoconjugado de la reivindicación 136, donde p oscila entre 2 y 4.
140. El inmunoconjugado de la reivindicación 136, donde p oscila entre 3 y 4.
141. Una composición farmacéutica que contiene el inmunoconjugado de la reivindicación 79 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
142. Un método de tratamiento de un trastorno proliferativo de células B que comprenda la administración a un sujeto de una cantidad eficaz de la composición farmacéutica de la reivindicación 141.
143. El método de la reivindicación 142, en el que el trastorno proliferativo de células B se selecciona a partir de los linfoma, linfoma no Hogkins (LNH), LNH agresivo, LNH agresivo recurrente, LNH indolente recurrente, LNH refractario, LNH indolente refractario, leucemia linfocítica crónica (LLC), linfoma linfocítico de células pequeñas, leucemia, leucemia de células pilosas (LCP), leucemia linfocítica aguda (LLA) y linfoma de células del manto.
144. Una composición farmacéutica que contiene el inmunoconjugado de la reivindicación 93 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
145. Un método de tratamiento de un trastorno proliferativo de células B que comprenda la administración a un sujeto de una cantidad eficaz de la composición farmacéutica de la reivindicación 144.
146. El método de la reivindicación 145, en el que el trastorno proliferativo de células B se selecciona a partir de los linfoma, linfoma no Hogkins (LNH), LNH agresivo, LNH agresivo recurrente, LNH indolente recurrente, LNH refractario, LNH indolente refractario, leucemia linfocítica crónica (LLC), linfoma linfocítico de células pequeñas, leucemia, leucemia de células pilosas (LCP), leucemia linfocítica aguda (LLA) y linfoma de células del manto.

147. Una composición farmacéutica que contiene el inmunoconjugado de las reivindicaciones 76, 77, 78 o 92 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
148. Un método de tratamiento de un trastorno proliferativo de células B que comprenda la administración a un sujeto de una cantidad eficaz de la composición farmacéutica de la reivindicación 147.
149. El método de la reivindicación 148, en el que el trastorno proliferativo de células B se selecciona a partir de los linfoma, linfoma no Hodgkins (LNH), LNH agresivo, LNH agresivo recurrente, LNH indolente recurrente, LNH refractario, LNH indolente refractario, leucemia linfocítica crónica (LLC), linfoma linfocítico de células pequeñas, leucemia, leucemia de células pilosas (LCP), leucemia linfocítica aguda (LLA) y linfoma de células del manto.
150. Un método para inhibir la proliferación de células B que comprende la exposición de una célula a un inmunoconjugado de la reivindicación 79 en condiciones que faciliten la unión del inmunoconjugado a CD22.
151. El método de la reivindicación 150, en el que la proliferación de células B se asocia a un trastorno seleccionado a partir de los linfoma, linfoma no Hodgkins (LNH), LNH agresivo, LNH agresivo recurrente, LNH indolente recurrente, LNH refractario, LNH indolente refractario, leucemia linfocítica crónica (LLC), linfoma linfocítico de células pequeñas, leucemia, leucemia de células pilosas (LCP), leucemia linfocítica aguda (LLA) y linfoma de células del manto.
152. El método de la reivindicación 150, en el que la célula B es un xenotrasplante.
153. El método de la reivindicación 150, donde la exposición se produce *in vitro*.
154. El método de la reivindicación 150, donde la exposición se produce *in vivo*.
155. El anticuerpo de la reivindicación 1, en el que el anticuerpo es un anticuerpo diseñado con cisteína que comprende uno o más aminoácidos sin cisteína con un valor de reactividad del tiol que oscila entre 0,6 y 1,0, donde el anticuerpo diseñado con cisteína se prepara mediante un proceso que comprende la sustitución de uno o más residuos de aminoácidos de un anticuerpo parental por una cisteína.
156. El anticuerpo diseñado con cisteína de la reivindicación 155, en la que dicho anticuerpo es más reactivo que el anticuerpo parental con un reactivo del tiol.

157. El anticuerpo diseñado con cisteína de la reivindicación 155, en la que el proceso comprende, además, la determinación de la reactividad del tiol del anticuerpo diseñado con cisteína mediante la reacción de dicho anticuerpo con un reactivo del tiol;
- donde el anticuerpo diseñado con cisteína es más reactivo que el anticuerpo parental con el reactivo del tiol.
158. El anticuerpo diseñado con cisteína de la reivindicación 155, en el que uno o más residuos de aminoácidos sin cisteína se encuentran en una cadena ligera.
159. El anticuerpo diseñado con cisteína de la reivindicación 155, en la que el anticuerpo es un inmunocóncugado que comprende el anticuerpo diseñado con cisteína que se une covalentemente a un agente citotóxico.
160. El anticuerpo diseñado con cisteína de la reivindicación 159, donde el agente citotóxico se selecciona a partir de una toxina, un agente quimioterapéutico, una fracción de fármaco, un antibiótico, un isótopo radioactivo y una enzima nucleolítica.
161. El anticuerpo diseñado con cisteína de la reivindicación 155, donde el anticuerpo se une covalentemente a una marca de captura, una marca de detección o un soporte sólido.
162. El anticuerpo diseñado con cisteína de la reivindicación 161, donde el anticuerpo se une covalentemente a una marca de captura de biotina.
163. El anticuerpo diseñado con cisteína de la reivindicación 161, donde el anticuerpo se une covalentemente a una marca de detección de un tinte fluorescente.
164. El anticuerpo diseñado con cisteína de la reivindicación 163, donde el tinte fluorescente se selecciona a partir de un tipo de fluoresceína, un tipo de rodamina, dansil, lisamina, cianina, ficoeritrina, Rojo Texas y un análogo de éstos.
165. El anticuerpo diseñado con cisteína de la reivindicación 161, donde el anticuerpo se une covalentemente a una marca de detección de radionucleidos seleccionada de ^3H , ^{11}C , ^{14}C , ^{18}F , ^{32}P , ^{35}S , ^{64}Cu , ^{68}Ga , ^{86}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{123}I , ^{124}I , ^{125}I , ^{131}I , ^{133}Xe , ^{177}Lu , ^{211}At y ^{213}Bi .
166. El anticuerpo diseñado con cisteína de la reivindicación 161, donde el anticuerpo se une covalentemente a una marca de detección mediante un ligando quelante.

999

167. El anticuerpo diseñado con cisteína de la reivindicación 166, donde el ligando quelante se selecciona a partir de DOTA, DOTP, DOTMA, DTPA y TETA.
168. El anticuerpo de la reivindicación 23, en el que el anticuerpo es un anticuerpo diseñado con cisteína que comprende uno o más aminoácidos sin cisteína con un valor de reactividad del tiol que oscila entre 0,6 y 1,0, donde el anticuerpo diseñado con cisteína se prepara mediante un proceso que comprende la sustitución de uno o más residuos de aminoácidos de un anticuerpo parental por una cisteína.
169. El anticuerpo diseñado con cisteína de la reivindicación 168, en la que dicho anticuerpo es más reactivo que el anticuerpo parental con un reactivo del tiol.
170. El anticuerpo diseñado con cisteína de la reivindicación 168, en la que el proceso comprende, además, la determinación de la reactividad del tiol del anticuerpo diseñado con cisteína mediante la reacción de dicho anticuerpo con un reactivo del tiol;
donde el anticuerpo diseñado con cisteína es más reactivo que el anticuerpo parental con el reactivo del tiol.
171. El anticuerpo diseñado con cisteína de la reivindicación 168, en el que uno o más residuos de aminoácidos sin cisteína se encuentran en una cadena ligera.
172. El anticuerpo diseñado con cisteína de la reivindicación 168, en la que el anticuerpo es un inmunoconjugado que comprende el anticuerpo diseñado con cisteína que se une covalentemente a un agente citotóxico.
173. El anticuerpo diseñado con cisteína de la reivindicación 172, donde el agente citotóxico se selecciona a partir de una toxina, un agente quimioterapéutico, una fracción de fármaco, un antibiótico, un isótopo radioactivo y una enzima nucleolítica.
174. El anticuerpo diseñado con cisteína de la reivindicación 168, donde el anticuerpo se une covalentemente a una marca de captura, una marca de detección o un soporte sólido.
175. El anticuerpo diseñado con cisteína de la reivindicación 174, donde el anticuerpo se une covalentemente a una marca de captura de biotina.

176. El anticuerpo diseñado con cisteína de la reivindicación 174, donde el anticuerpo se une covalentemente a una marca de detección de un tinte fluorescente.
177. El anticuerpo diseñado con cisteína de la reivindicación 176, donde el tinte fluorescente se selecciona a partir de un tipo de fluoresceína, un tipo de rodamina, dansil, lisamina, cianina, ficoeritrina, Rojo Texas y un análogo de éstos.
178. El anticuerpo diseñado con cisteína de la reivindicación 174, donde el anticuerpo se une covalentemente a una marca de detección de radionucleidos seleccionada de ^3H , ^{11}C , ^{14}C , ^{18}F , ^{32}P , ^{35}S , ^{64}Cu , ^{68}Ga , ^{86}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{123}I , ^{124}I , ^{125}I , ^{131}I , ^{133}Xe , ^{177}Lu , ^{211}At y ^{213}Bi .
179. El anticuerpo diseñado con cisteína de la reivindicación 178, donde el anticuerpo se une covalentemente a una marca de detección mediante un ligando quelante.
180. El anticuerpo diseñado con cisteína de la reivindicación 179, donde el ligando quelante se selecciona a partir de DOTA, DOTP, DOTMA, DTPA y TETA.
181. El inmunoc conjugado de la reivindicación 93, donde el enlazador se une al anticuerpo a través de un grupo tiol en el anticuerpo.
182. El anticuerpo de la reivindicación 1 comprende un péptido de unión a la albúmina.
183. El anticuerpo de la reivindicación 182, donde el péptido de unión a la albúmina se selecciona a partir de los identificadores de secuencia n.º: 42 al 46.
184. El anticuerpo de la reivindicación 23 comprende un péptido de unión a la albúmina.
185. El anticuerpo de la reivindicación 184, donde el péptido de unión a la albúmina se selecciona a partir de los identificadores de secuencia n.º: 42 al 46.
186. El anticuerpo de la reivindicación 1, donde el anticuerpo comprende, además, una cisteína en una o más posiciones seleccionadas de 15, 43, 110, 144, 168 y 205 de la cadena ligera según la convención numérica de Kabat y 41, 88, 115, 118, 120, 171, 172, 282, 375 y 400 de la cadena pesada según la convención numérica de EU.

201

187. El anticuerpo de la reivindicación 186, donde una cisteína se encuentra en la posición 205 de la cadena ligera.
188. El anticuerpo de la reivindicación 186, donde una cisteína se encuentra en la posición 118 de la cadena pesada.
189. El anticuerpo de la reivindicación 186, donde una cisteína se encuentra en la posición 400 de la cadena pesada.
190. El anticuerpo de la reivindicación 186, donde el anticuerpo se selecciona a partir de un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo biespecífico, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humano y un anticuerpo humanizado.
191. El anticuerpo de la reivindicación 186 que es un fragmento de anticuerpo.
192. El anticuerpo de la reivindicación 191, donde el fragmento de anticuerpo es un fragmento Fab.
193. El anticuerpo de la reivindicación 186 que se selecciona a partir de un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humano o un anticuerpo humanizado.
194. El anticuerpo de la reivindicación 186 que se produce en una bacteria.
195. El anticuerpo de la reivindicación 186 que se produce en células CHO.
196. Un método para determinar la presencia de una proteína CD22 en una muestra que se cree que contiene dicha proteína; este método comprende exponer esta muestra a un anticuerpo de la reivindicación 186 y determinar la unión de este anticuerpo a dicha proteína CD22 en esta muestra, donde la unión del anticuerpo a dicha proteína indica la presencia de dicha proteína en la muestra.
197. El método de la reivindicación 196, donde la muestra comprende una célula que se cree que expresa dicha proteína CD22.
198. El método de la reivindicación 196, donde dicha célula es una célula B.
199. El método de la reivindicación 196, donde el anticuerpo se une covalentemente a una marca seleccionada a partir de un tinte fluorescente, un radioisótopo, una biotina o un ligando de formación de complejos de metal.
200. Una formulación farmacéutica que comprende el anticuerpo anti-CD22 de la reivindicación 186 y un diluyente, vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.
201. El anticuerpo de la reivindicación 186, donde el anticuerpo se une covalentemente a una fracción del fármaco auristatina o maitansinoide, a través de la cual se forma el conjugado de anticuerpo con fármacos.

202

202. El conjugado de anticuerpo con fármacos de la reivindicación 201 comprende un anticuerpo (Ab) y una fracción del fármaco auristatina o maitansinoide (D) en la que el anticuerpo diseñado con cisteína se une por medio de uno o más aminoácidos sin cisteína y de una porción de enlazador (L) a D, el compuesto que posee Fórmula I.



donde p es 1, 2, 3 ó 4.

203. El compuesto de conjugado de anticuerpo con fármacos de la reivindicación 201, donde p es 2.

204. El compuesto de conjugado de anticuerpo con fármacos de la reivindicación 201, donde L tiene la fórmula:



donde:

A es una unidad de extensión unida covalentemente a un tiol de cisteína del anticuerpo diseñado con cisteína (Ab),

a es 0 ó 1,

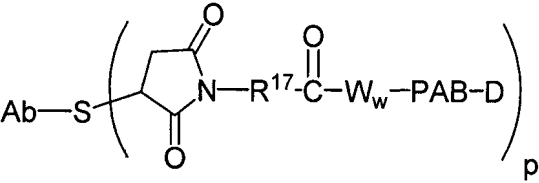
cada W es independientemente una unidad de aminoácidos,

w es un número entero que oscila entre 0 y 12,

Y es una unidad espaciadora unida covalentemente a una fracción de fármaco y

y es 0, 1 ó 2.

205. El compuesto de conjugado de anticuerpo con fármacos de la reivindicación 204 con la fórmula:



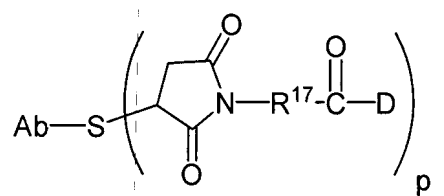
donde PAB es un para-aminobenzilcarbamoil y ¹⁷R es un radical divalente seleccionado de (CH₂)_r, C₃-C₈ carbociclilo, O-(CH₂)_r, arileno, (CH₂)_r-arileno, -arileno-(CH₂)_r, (CH₂)_r-(C₃-C₈ carbociclilo), (C₃-C₈ carbociclilo)-(CH₂)_r, C₃-C₈ heterociclilo, (CH₂)_r-(C₃-C₈ heterociclilo), -(C₃-C₈ heterociclilo)-(CH₂)_r, -(CH₂)_rC(O)NR^b(CH₂)_r, -(CH₂CH₂O)_r, -(CH₂CH₂O)_r-CH₂-, -(CH₂)_rC(O)NR^b(CH₂CH₂O)_r-, -(CH₂)_rC(O)NR^b(CH₂CH₂O)_r-CH₂-, -(CH₂CH₂O)_rC(O)NR^b(CH₂CH₂O)_r-, -(CH₂CH₂O)_rC(O)NR^b(CH₂CH₂O)_r-CH₂- y

$-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_r\text{C}(\text{O})\text{NR}^b(\text{CH}_2)_r-$; donde R^b es H, $\text{C}_1\text{-C}_6$ alquilo, fenilo o bencilo y r es independientemente un número entero que oscila entre 1 y 10.

206. El compuesto de conjugado de anticuerpo con fármacos de la reivindicación 204, donde W_w es valina-citrulina.

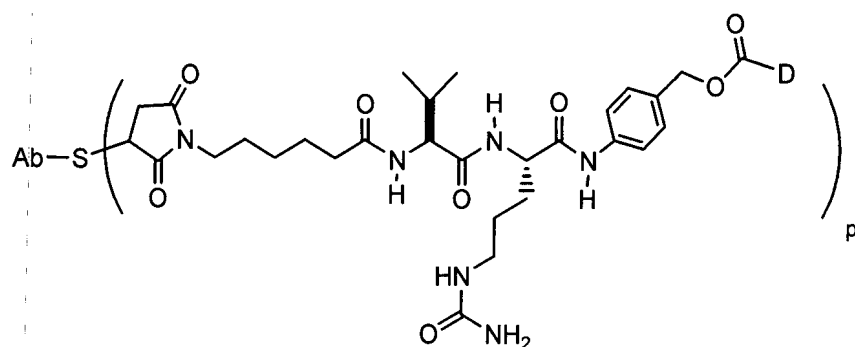
207. El compuesto de conjugado de anticuerpo con fármacos de la reivindicación 204, donde ^{17}R es $(\text{CH}_2)_5$ o $(\text{CH}_2)_2$.

208. El compuesto de conjugado de anticuerpo con fármacos de la reivindicación 204 con la fórmula:



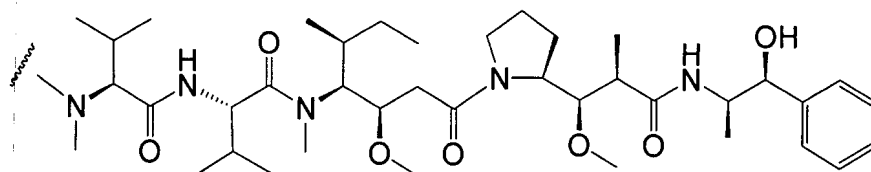
209. El compuesto de conjugado de anticuerpo con fármacos de la reivindicación 208, donde ^{17}R es $(\text{CH}_2)_5$ o $(\text{CH}_2)_2$.

210. El compuesto de conjugado de anticuerpo con fármacos de la reivindicación 204 con la fórmula:



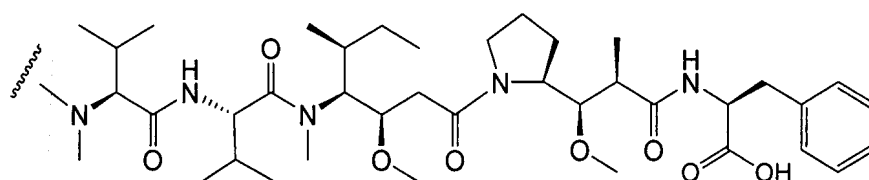
211. El compuesto de conjugado de anticuerpo con fármacos de la reivindicación 202, donde L es SMCC, SPP o BMPEO.

212. El compuesto de conjugado de anticuerpo con fármacos de la reivindicación 202, donde D es MMAE con la estructura:



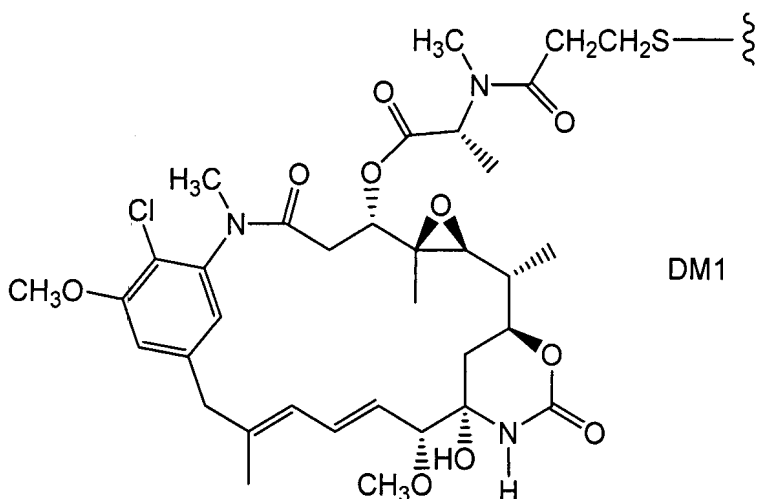
donde la línea ondulada indica el sitio de unión al enlazador L.

213. El compuesto de conjugado de anticuerpo con fármacos de la reivindicación 202, donde D es MMAF con la estructura:



donde la línea ondulada indica el sitio de unión al enlazador L.

214. El compuesto de conjugado de anticuerpo con fármacos de la reivindicación 202, donde D es DM1 con la estructura:

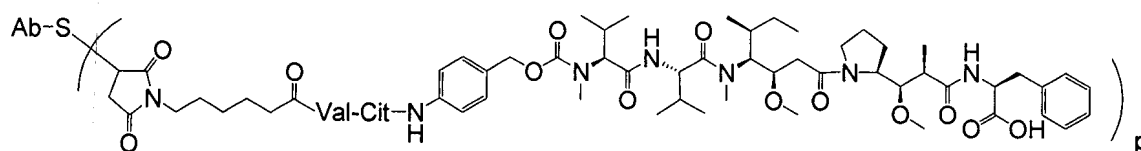


donde la línea ondulada indica el sitio de unión al enlazador L.

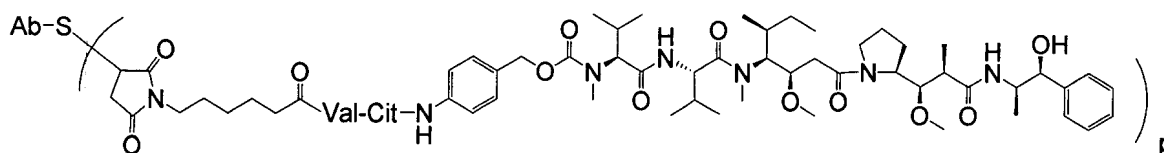
215. El compuesto de conjugado de anticuerpo con fármacos de la reivindicación 201, donde el anticuerpo anti-CD22 parental se selecciona a partir de un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo biespecífico, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humano, un anticuerpo humanizado y un fragmento de anticuerpo.

216. El compuesto de conjugado de anticuerpo con fármacos de la reivindicación 201, donde el fragmento de anticuerpo es un fragmento Fab.

217. El compuesto de conjugado de anticuerpo con fármacos seleccionado de las estructuras:

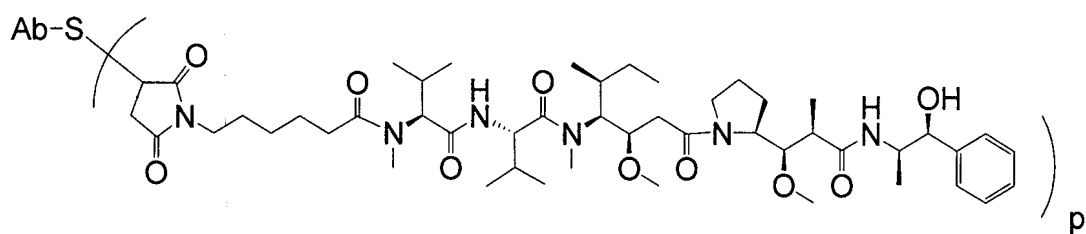


Ab-MC-vc-PAB-MMAF

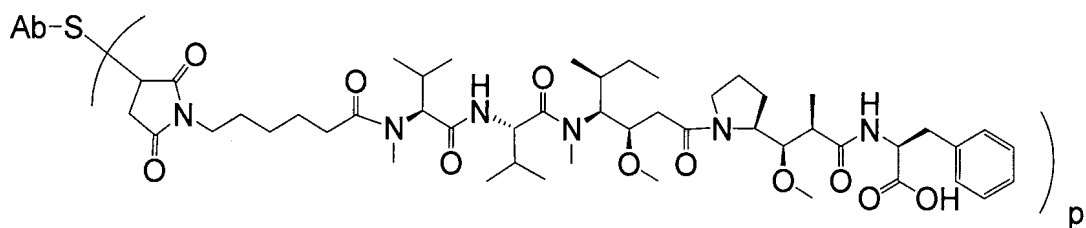


Ab-MC-vc-PAB-MMAE

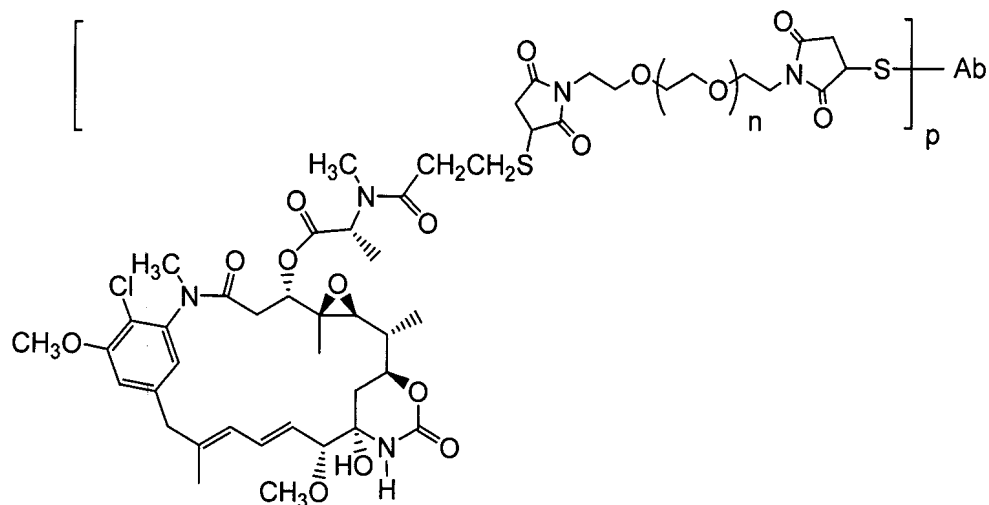
407



Ab-MC-MMAE



Ab-MC-MMAF



Ab-BMPEO-DM1

donde Val es valina, Cit es citrulina, p es 1, 2, 3 ó 4 y Ab es anticuerpo anti-CD22 de la reivindicación 186.

218. El conjugado de anticuerpo con fármacos de la reivindicación 201, donde la auristatina es MMAE o MMAF.

219. El conjugado de anticuerpo con fármacos de la reivindicación 202, donde L es MC-val-cit-PAB o MC.

220. Un ensayo para detectar las células B que comprende:

- (a) exponer las células a un compuesto de conjugado de anticuerpo con fármacos de la reivindicación 199, y
- (b) determinar el grado de unión del compuesto de conjugado de anticuerpo con fármacos a la células.

mob

221. Un método para inhibir la proliferación celular que comprende tratar las células B cancerosas de mamíferos en un medio de cultivo celular con un compuesto de conjugado de anticuerpo con fármacos de la reivindicación 201, donde se inhibe la proliferación de las células B cancerosas.

222. Una formulación farmacéutica que comprende un conjugado de anticuerpo con fármacos de la reivindicación 201 y un diluyente, vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.

223. Un método para tratar el cáncer que comprende la administración a un paciente de una formulación farmacéutica de la reivindicación 222.

224. El método de la reivindicación 223, en el que el cáncer se selecciona a partir del grupo que comprende los linfoma, linfoma no Hodgkins (LNH), LNH agresivo, LNH agresivo recurrente, LNH indolente recurrente, LNH refractario, LNH indolente refractario, leucemia linfocítica crónica (LLC), linfoma linfocítico de células pequeñas, leucemia, leucemia de células pilosas (LCP), leucemia linfocítica aguda (LLA) y linfoma de células del manto.

225. El método de la reivindicación 223, donde se administra al paciente un agente citotóxico en combinación con un compuesto de conjugado de anticuerpo con fármacos.

226. Un artículo fabricado que comprende una formulación farmacéutica de la reivindicación 220, un envase y un prospecto o etiqueta que indica que el compuesto puede utilizarse para tratar el cáncer caracterizado por la sobreexpresión de un polipéptido CD22.

227. El elemento de fabricación de la reivindicación 226, el que el cáncer se selecciona a partir del grupo que comprende los linfoma, linfoma no Hodgkins (LNH), LNH agresivo, LNH agresivo recurrente, LNH indolente recurrente, LNH refractario, LNH indolente refractario, leucemia linfocítica crónica (LLC), linfoma linfocítico de células pequeñas, leucemia, leucemia de células pilosas (LCP), leucemia linfocítica aguda (LLA) y linfoma de células del manto.

228. El método para que un compuesto de conjugado de anticuerpo con fármacos comprenda un anticuerpo anti-CD22 (Ab) de la reivindicación 186, y una fracción del fármaco auristatina o maitansinoide (D) en la que el anticuerpo se une por medio de uno o más aminoácidos diseñados con cisteína y de una porción de enlazador (L) a D, el compuesto que posee Fórmula I.



donde p es 1, 2, 3 ó 4; el método comprende los pasos para que:

- (a) un grupo de anticuerpos diseñados con cisteína reaccione con un reactivo enlazador para formar un anticuerpo enlazador intermedio Ab-L, y
- (b) Ab-L reaccione con una fracción de fármaco D activada, donde se forma el conjugado de anticuerpo con fármacos, o comprende los pasos para que:
- (c) un grupo nucleofílico de una fracción de fármaco reaccione con un reactivo enlazador para formar un enlazador a fármacos intermedio D-L, y
- (d) D-L reaccione con un grupo de anticuerpos diseñados con cisteína, donde se forma el conjugado de anticuerpo con fármacos.

229. El método de la reivindicación 228 comprende, además, el paso para expresar el anticuerpo en células de ovario de hámster chino (CHO).

230. El método de la reivindicación 229 también comprende el paso para tratar el anticuerpo expresado con un agente reductor.

231. El método de la reivindicación 230, donde el agente reductor se selecciona a partir de TCEP y DTT.

232. El método de la reivindicación 230 también comprende el paso para tratar el anticuerpo expresado con un agente oxidante, después de tratarlo con un agente reductor.

233. El método de la reivindicación 232, donde el agente oxidante se selecciona a partir de un sulfato de cobre, un ácido dehidroascórbico y del aire.

234. El anticuerpo de la reivindicación 186, donde el anticuerpo comprende una secuencia de la cadena pesada seleccionada a partir de cualquiera de los identificadores de secuencia n.º: 88, 92 ó 93.

235. El anticuerpo de la reivindicación 186, donde el anticuerpo comprende una secuencia de la cadena ligera seleccionada a partir de cualquiera de los identificadores de secuencia n.º: 87 ó 91

236. El anticuerpo de la reivindicación 186, donde el anticuerpo comprende una secuencia de la cadena ligera de identificador de secuencia n.º: 87 y una secuencia de la cadena pesada de identificador de secuencia n.º: 92.

237. El anticuerpo de la reivindicación 186, donde el anticuerpo comprende una secuencia de la cadena ligera de identificador de secuencia n.º: 87 y una secuencia de la cadena pesada de identificador de secuencia n.º: 93.

238. El anticuerpo de la reivindicación 186, donde el anticuerpo comprende una secuencia de la cadena ligera de identificador de secuencia n.º: 91 y una secuencia de la cadena pesada de identificador de secuencia n.º: 88.

1400

309

RESUMEN DEL DESCUBRIMIENTO

Se proporcionan anticuerpos anti-CD22 y sus inmunoconjugados. Se proporcionan métodos de uso de los anticuerpos anti-CD22 y de sus inmunoconjugados.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> GENENTECH, INC. ET AL.

<120> ANTICUERPOS E INMUNOCONJUGADOS Y SUS USOS

<130> P2262R1

<140> PCT/US07/69889

<141> 2007-05-29

<150> US 60/911,829

<151> 2007-04-13

<150> US 60/908,941

<151> 2007-03-29

<150> US 60/809,328

<151> 2006-05-30

<160> 93

<210> 1

<211> 25

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> la secuencia está sintetizada

<400> 1

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly

1 5 10 15

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser

 20 25

<210> 2

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> la secuencia está sintetizada

<400> 2

Gly Tyr Glu Phe Ser Arg Ser Trp Met Asn

 5 10

<210> 3

<211> 13

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> la secuencia está sintetizada

2/11

<400> 3
Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
5 10

<210> 4
<211> 18
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 4
Gly Arg Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr Ser Gly Lys
1 5 10 15

Phe Lys Gly

<210> 5
<211> 30
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 5
Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu
1 5 10 15

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 6
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 6
Asp Gly Ser Ser Trp Asp Trp Tyr Phe Asp Val
5 10

<210> 7
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 7

2/2

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
5 10

<210> 8
<211> 23
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 8
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
1 5 10 15

Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys
20

<210> 9
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 9
Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Asn Gly Asn Thr Phe Leu
1 5 10 15

Glu

<210> 10
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 10
Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Val Gly Asn Thr Phe Leu
1 5 10 15

Glu

<210> 11
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

32

<400> 11
Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 12
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 12
Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
5

<210> 13
<211> 32
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 13
Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
1 5 10 15

Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr
20 25 30

Tyr Cys

<210> 14
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 14
Phe Gln Gly Ser Gln Phe Pro Tyr Thr
5

<210> 15
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 15
Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

2/4

5 10

<210> 16
<211> 120
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 16
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
1 5 10 15

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

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

Glu Trp Val Gly Arg Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr
50 55 60

Ser Gly Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser
65 70 75

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

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Gly Ser Ser Trp Asp Trp
95 100 105

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

<210> 17
<211> 113
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 17
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
1 5 10 15

Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val
20 25 30

His Ser Asn Gly Asn Thr Phe Leu Glu Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
35 40 45

Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe
50 55 60

3/5

Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Arg Ser Gly Thr Asp
65 70 75

Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr
80 85 90

Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser Gln Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gln
95 100 105

Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
110

<210> 18
<211> 113
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 18
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
1 5 10 15

Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val
20 25 30

His Ser Val Gly Asn Thr Phe Leu Glu Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
35 40 45

Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Arg Ser Gly Thr Asp
65 70 75

Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr
80 85 90

Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser Gln Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gln
95 100 105

Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
110

<210> 19
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 19
Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Ala Gly Asn Thr Phe Leu
1 5 10 15

3/6

Glu

<210> 20
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 20
Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Gln Gly Asn Thr Phe Leu
1 5 10 15

Glu

<210> 21
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 21
Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Ser Gly Asn Thr Phe Leu
1 5 10 15

Glu

<210> 22
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 22
Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Asp Gly Asn Thr Phe Leu
1 5 10 15

Glu

<210> 23
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

27

<400> 23
Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Ile Gly Asn Thr Phe Leu
1 5 10 15

Glu

<210> 24
<211> 113
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 24
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
1 5 10 15

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

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

Glu Trp Val Ser Val Ile Ser Gly Asp Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr
50 55 60

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

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

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
95 100 105

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
110

<210> 25
<211> 107
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 25
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
1 5 10 15

Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser
20 25 30

2/8

Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys
35 40 45

Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser
50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
65 70 75

Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
80 85 90

Tyr Asn Ser Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu
95 100 105

Ile Lys

<210> 26
<211> 30
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 26
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly
1 5 10 15

Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr
20 25 30

<210> 27
<211> 847
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 27
Met His Leu Leu Gly Pro Trp Leu Leu Leu Leu Val Leu Glu Tyr
1 5 10 15

Leu Ala Phe Ser Asp Ser Ser Lys Trp Val Phe Glu His Pro Glu
20 25 30

Thr Leu Tyr Ala Trp Glu Gly Ala Cys Val Trp Ile Pro Cys Thr
35 40 45

Tyr Arg Ala Leu Asp Gly Asp Leu Glu Ser Phe Ile Leu Phe His
50 55 60

Asn Pro Glu Tyr Asn Lys Asn Thr Ser Lys Phe Asp Gly Thr Arg
65 70 75

Leu Tyr Glu Ser Thr Lys Asp Gly Lys Val Pro Ser Glu Gln Lys
80 85 90

319

Arg Val Gln Phe Leu Gly Asp Lys Asn Lys Asn Cys Thr Leu Ser
95 100 105

Ile His Pro Val His Leu Asn Asp Ser Gly Gln Leu Gly Leu Arg
110 115 120

Met Glu Ser Lys Thr Glu Lys Trp Met Glu Arg Ile His Leu Asn
125 130 135

Val Ser Glu Arg Pro Phe Pro Pro His Ile Gln Leu Pro Pro Glu
140 145 150

Ile Gln Glu Ser Gln Glu Val Thr Leu Thr Cys Leu Leu Asn Phe
155 160 165

Ser Cys Tyr Gly Tyr Pro Ile Gln Leu Gln Trp Leu Leu Glu Gly
170 175 180

Val Pro Met Arg Gln Ala Ala Val Thr Ser Thr Ser Leu Thr Ile
185 190 195

Lys Ser Val Phe Thr Arg Ser Glu Leu Lys Phe Ser Pro Gln Trp
200 205 210

Ser His His Gly Lys Ile Val Thr Cys Gln Leu Gln Asp Ala Asp
215 220 225

Gly Lys Phe Leu Ser Asn Asp Thr Val Gln Leu Asn Val Lys His
230 235 240

Thr Pro Lys Leu Glu Ile Lys Val Thr Pro Ser Asp Ala Ile Val
245 250 255

Arg Glu Gly Asp Ser Val Thr Met Thr Cys Glu Val Ser Ser Ser
260 265 270

Asn Pro Glu Tyr Thr Thr Val Ser Trp Leu Lys Asp Gly Thr Ser
275 280 285

Leu Lys Lys Gln Asn Thr Phe Thr Leu Asn Leu Arg Glu Val Thr
290 295 300

Lys Asp Gln Ser Gly Lys Tyr Cys Cys Gln Val Ser Asn Asp Val
305 310 315

Gly Pro Gly Arg Ser Glu Glu Val Phe Leu Gln Val Gln Tyr Ala
320 325 330

Pro Glu Pro Ser Thr Val Gln Ile Leu His Ser Pro Ala Val Glu
335 340 345

Gly Ser Gln Val Glu Phe Leu Cys Met Ser Leu Ala Asn Pro Leu
350 355 360

Pro Thr Asn Tyr Thr Trp Tyr His Asn Gly Lys Glu Met Gln Gly

320

365	370	375
Arg Thr Glu Glu Lys Val His Ile Pro Lys Ile Leu Pro Trp His		
380	385	390
Ala Gly Thr Tyr Ser Cys Val Ala Glu Asn Ile Leu Gly Thr Gly		
395	400	405
Gln Arg Gly Pro Gly Ala Glu Leu Asp Val Gln Tyr Pro Pro Lys		
410	415	420
Lys Val Thr Thr Val Ile Gln Asn Pro Met Pro Ile Arg Glu Gly		
425	430	435
Asp Thr Val Thr Leu Ser Cys Asn Tyr Asn Ser Ser Asn Pro Ser		
440	445	450
Val Thr Arg Tyr Glu Trp Lys Pro His Gly Ala Trp Glu Glu Pro		
455	460	465
Ser Leu Gly Val Leu Lys Ile Gln Asn Val Gly Trp Asp Asn Thr		
470	475	480
Thr Ile Ala Cys Ala Arg Cys Asn Ser Trp Cys Ser Trp Ala Ser		
485	490	495
Pro Val Ala Leu Asn Val Gln Tyr Ala Pro Arg Asp Val Arg Val		
500	505	510
Arg Lys Ile Lys Pro Leu Ser Glu Ile His Ser Gly Asn Ser Val		
515	520	525
Ser Leu Gln Cys Asp Phe Ser Ser Ser His Pro Lys Glu Val Gln		
530	535	540
Phe Phe Trp Glu Lys Asn Gly Arg Leu Leu Gly Lys Glu Ser Gln		
545	550	555
Leu Asn Phe Asp Ser Ile Ser Pro Glu Asp Ala Gly Ser Tyr Ser		
560	565	570
Cys Trp Val Asn Asn Ser Ile Gly Gln Thr Ala Ser Lys Ala Trp		
575	580	585
Thr Leu Glu Val Leu Tyr Ala Pro Arg Arg Leu Arg Val Ser Met		
590	595	600
Ser Pro Gly Asp Gln Val Met Glu Gly Lys Ser Ala Thr Leu Thr		
605	610	615
Cys Glu Ser Asp Ala Asn Pro Pro Val Ser His Tyr Thr Trp Phe		
620	625	630
Asp Trp Asn Asn Gln Ser Leu Pro His His Ser Gln Lys Leu Arg		
635	640	645

781

Leu Glu Pro Val Lys Val Gln His Ser Gly Ala Tyr Trp Cys Gln
650 655 660

Gly Thr Asn Ser Val Gly Lys Gly Arg Ser Pro Leu Ser Thr Leu
665 670 675

Thr Val Tyr Tyr Ser Pro Glu Thr Ile Gly Arg Arg Val Ala Val
680 685 690

Gly Leu Gly Ser Cys Leu Ala Ile Leu Ile Leu Ala Ile Cys Gly
695 700 705

Leu Lys Leu Gln Arg Arg Trp Lys Arg Thr Gln Ser Gln Gln Gly
710 715 720

Leu Gln Glu Asn Ser Ser Gly Gln Ser Phe Phe Val Arg Asn Lys
725 730 735

Lys Val Arg Arg Ala Pro Leu Ser Glu Gly Pro His Ser Leu Gly
740 745 750

Cys Tyr Asn Pro Met Met Glu Asp Gly Ile Ser Tyr Thr Thr Leu
755 760 765

Arg Phe Pro Glu Met Asn Ile Pro Arg Thr Gly Asp Ala Glu Ser
770 775 780

Ser Glu Met Gln Arg Pro Pro Arg Thr Cys Asp Asp Thr Val Thr
785 790 795

Tyr Ser Ala Leu His Lys Arg Gln Val Gly Asp Tyr Glu Asn Val
800 805 810

Ile Pro Asp Phe Pro Glu Asp Glu Gly Ile His Tyr Ser Glu Leu
815 820 825

Ile Gln Phe Gly Val Gly Glu Arg Pro Gln Ala Gln Glu Asn Val
830 835 840

Asp Tyr Val Ile Leu Lys His
845

<210> 28
<211> 660
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 28
Ser Lys Trp Val Phe Glu His Pro Glu Thr Leu Tyr Ala Trp Glu
1 5 10 15

Gly Ala Cys Val Trp Ile Pro Cys Thr Tyr Arg Ala Leu Asp Gly
20 25 30

Asp Leu Glu Ser Phe Ile Leu Phe His Asn Pro Glu Tyr Asn Lys
35 40 45

328

Asn Thr Ser Lys Phe Asp Gly Thr Arg Leu Tyr Glu Ser Thr Lys
50 55 60

Asp Gly Lys Val Pro Ser Glu Gln Lys Arg Val Gln Phe Leu Gly
65 70 75

Asp Lys Asn Lys Asn Cys Thr Leu Ser Ile His Pro Val His Leu
80 85 90

Asn Asp Ser Gly Gln Leu Gly Leu Arg Met Glu Ser Lys Thr Glu
95 100 105

Lys Trp Met Glu Arg Ile His Leu Asn Val Ser Glu Arg Pro Phe
110 115 120

Pro Pro His Ile Gln Leu Pro Pro Glu Ile Gln Glu Ser Gln Glu
125 130 135

Val Thr Leu Thr Cys Leu Leu Asn Phe Ser Cys Tyr Gly Tyr Pro
140 145 150

Ile Gln Leu Gln Trp Leu Leu Glu Gly Val Pro Met Arg Gln Ala
155 160 165

Ala Val Thr Ser Thr Ser Leu Thr Ile Lys Ser Val Phe Thr Arg
170 175 180

Ser Glu Leu Lys Phe Ser Pro Gln Trp Ser His His Gly Lys Ile
185 190 195

Val Thr Cys Gln Leu Gln Asp Ala Asp Gly Lys Phe Leu Ser Asn
200 205 210

Asp Thr Val Gln Leu Asn Val Lys His Thr Pro Lys Leu Glu Ile
215 220 225

Lys Val Thr Pro Ser Asp Ala Ile Val Arg Glu Gly Asp Ser Val
230 235 240

Thr Met Thr Cys Glu Val Ser Ser Ser Asn Pro Glu Tyr Thr Thr
245 250 255

Val Ser Trp Leu Lys Asp Gly Thr Ser Leu Lys Lys Gln Asn Thr
260 265 270

Phe Thr Leu Asn Leu Arg Glu Val Thr Lys Asp Gln Ser Gly Lys
275 280 285

Tyr Cys Cys Gln Val Ser Asn Asp Val Gly Pro Gly Arg Ser Glu
290 295 300

Glu Val Phe Leu Gln Val Gln Tyr Ala Pro Glu Pro Ser Thr Val
305 310 315

Gln Ile Leu His Ser Pro Ala Val Glu Gly Ser Gln Val Glu Phe

227

320	325	330
Leu Cys Met Ser Leu Ala Asn Pro Leu Pro Thr Asn Tyr Thr Trp		
335	340	345
Tyr His Asn Gly Lys Glu Met Gln Gly Arg Thr Glu Glu Lys Val		
350	355	360
His Ile Pro Lys Ile Leu Pro Trp His Ala Gly Thr Tyr Ser Cys		
365	370	375
Val Ala Glu Asn Ile Leu Gly Thr Gly Gln Arg Gly Pro Gly Ala		
380	385	390
Glu Leu Asp Val Gln Tyr Pro Pro Lys Lys Val Thr Thr Val Ile		
395	400	405
Gln Asn Pro Met Pro Ile Arg Glu Gly Asp Thr Val Thr Leu Ser		
410	415	420
Cys Asn Tyr Asn Ser Ser Asn Pro Ser Val Thr Arg Tyr Glu Trp		
425	430	435
Lys Pro His Gly Ala Trp Glu Glu Pro Ser Leu Gly Val Leu Lys		
440	445	450
Ile Gln Asn Val Gly Trp Asp Asn Thr Thr Ile Ala Cys Ala Arg		
455	460	465
Cys Asn Ser Trp Cys Ser Trp Ala Ser Pro Val Ala Leu Asn Val		
470	475	480
Gln Tyr Ala Pro Arg Asp Val Arg Val Arg Lys Ile Lys Pro Leu		
485	490	495
Ser Glu Ile His Ser Gly Asn Ser Val Ser Leu Gln Cys Asp Phe		
500	505	510
Ser Ser Ser His Pro Lys Glu Val Gln Phe Phe Trp Glu Lys Asn		
515	520	525
Gly Arg Leu Leu Gly Lys Glu Ser Gln Leu Asn Phe Asp Ser Ile		
530	535	540
Ser Pro Glu Asp Ala Gly Ser Tyr Ser Cys Trp Val Asn Asn Ser		
545	550	555
Ile Gly Gln Thr Ala Ser Lys Ala Trp Thr Leu Glu Val Leu Tyr		
560	565	570
Ala Pro Arg Arg Leu Arg Val Ser Met Ser Pro Gly Asp Gln Val		
575	580	585
Met Glu Gly Lys Ser Ala Thr Leu Thr Cys Glu Ser Asp Ala Asn		
590	595	600

328

Pro Pro Val Ser His Tyr Thr Trp Phe Asp Trp Asn Asn Gln Ser
605 610 615

Leu Pro His His Ser Gln Lys Leu Arg Leu Glu Pro Val Lys Val
620 625 630

Gln His Ser Gly Ala Tyr Trp Cys Gln Gly Thr Asn Ser Val Gly
635 640 645

Lys Gly Arg Ser Pro Leu Ser Thr Leu Thr Val Tyr Tyr Ser Pro
650 655 660

<210> 29

<211> 647

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 29

Met His Leu Leu Gly Pro Trp Leu Leu Leu Leu Val Leu Glu Tyr
1 5 10 15

Leu Ala Phe Ser Asp Ser Ser Lys Trp Val Phe Glu His Pro Glu
20 25 30

Thr Leu Tyr Ala Trp Glu Gly Ala Cys Val Trp Ile Pro Cys Thr
35 40 45

Tyr Arg Ala Leu Asp Gly Asp Leu Glu Ser Phe Ile Leu Phe His
50 55 60

Asn Pro Glu Tyr Asn Lys Asn Thr Ser Lys Phe Asp Gly Thr Arg
65 70 75

Leu Tyr Glu Ser Thr Lys Asp Gly Lys Val Pro Ser Glu Gln Lys
80 85 90

Arg Val Gln Phe Leu Gly Asp Lys Asn Lys Asn Cys Thr Leu Ser
95 100 105

Ile His Pro Val His Leu Asn Asp Ser Gly Gln Leu Gly Leu Arg
110 115 120

Met Glu Ser Lys Thr Glu Lys Trp Met Glu Arg Ile His Leu Asn
125 130 135

Val Ser Glu Arg Pro Phe Pro Pro His Ile Gln Leu Pro Pro Glu
140 145 150

Ile Gln Glu Ser Gln Glu Val Thr Leu Thr Cys Leu Leu Asn Phe
155 160 165

Ser Cys Tyr Gly Tyr Pro Ile Gln Leu Gln Trp Leu Leu Glu Gly
170 175 180

Val Pro Met Arg Gln Ala Ala Val Thr Ser Thr Ser Leu Thr Ile
185 190 195

27

Lys Ser Val Phe Thr Arg Ser Glu Leu Lys Phe Ser Pro Gln Trp
200 205 210

Ser His His Gly Lys Ile Val Thr Cys Gln Leu Gln Asp Ala Asp
215 220 225

Gly Lys Phe Leu Ser Asn Asp Thr Val Gln Leu Asn Val Lys His
230 235 240

Pro Pro Lys Lys Val Thr Thr Val Ile Gln Asn Pro Met Pro Ile
245 250 255

Arg Glu Gly Asp Thr Val Thr Leu Ser Cys Asn Tyr Asn Ser Ser
260 265 270

Asn Pro Ser Val Thr Arg Tyr Glu Trp Lys Pro His Gly Ala Trp
275 280 285

Glu Glu Pro Ser Leu Gly Val Leu Lys Ile Gln Asn Val Gly Trp
290 295 300

Asp Asn Thr Thr Ile Ala Cys Ala Ala Cys Asn Ser Trp Cys Ser
305 310 315

Trp Ala Ser Pro Val Ala Leu Asn Val Gln Tyr Ala Pro Arg Asp
320 325 330

Val Arg Val Arg Lys Ile Lys Pro Leu Ser Glu Ile His Ser Gly
335 340 345

Asn Ser Val Ser Leu Gln Cys Asp Phe Ser Ser Ser His Pro Lys
350 355 360

Glu Val Gln Phe Phe Trp Glu Lys Asn Gly Arg Leu Leu Gly Lys
365 370 375

Glu Ser Gln Leu Asn Phe Asp Ser Ile Ser Pro Glu Asp Ala Gly
380 385 390

Ser Tyr Ser Cys Trp Val Asn Asn Ser Ile Gly Gln Thr Ala Ser
395 400 405

Lys Ala Trp Thr Leu Glu Val Leu Tyr Ala Pro Arg Arg Leu Arg
410 415 420

Val Ser Met Ser Pro Gly Asp Gln Val Met Glu Gly Lys Ser Ala
425 430 435

Thr Leu Thr Cys Glu Ser Asp Ala Asn Pro Pro Val Ser His Tyr
440 445 450

Thr Trp Phe Asp Trp Asn Asn Gln Ser Leu Pro Tyr His Ser Gln
455 460 465

Lys Leu Arg Leu Glu Pro Val Lys Val Gln His Ser Gly Ala Tyr

gsl

470	475	480
Trp Cys Gln Gly Thr Asn Ser Val Gly Lys Gly Arg Ser Pro Leu		
485	490	495
Ser Thr Leu Thr Val Tyr Tyr Ser Pro Glu Thr Ile Gly Arg Arg		
500	505	510
Val Ala Val Gly Leu Gly Ser Cys Leu Ala Ile Leu Ile Leu Ala		
515	520	525
Ile Cys Gly Leu Lys Leu Gln Arg Arg Trp Lys Arg Thr Gln Ser		
530	535	540
Gln Gln Gly Leu Gln Glu Asn Ser Ser Gly Gln Ser Phe Phe Val		
545	550	555
Arg Asn Lys Lys Val Arg Arg Ala Pro Leu Ser Glu Gly Pro His		
560	565	570
Ser Leu Gly Cys Tyr Asn Pro Met Met Glu Asp Gly Ile Ser Tyr		
575	580	585
Thr Thr Leu Arg Phe Pro Glu Met Asn Ile Pro Arg Thr Gly Asp		
590	595	600
Ala Glu Ser Ser Glu Met Gln Arg Pro Pro Pro Asp Cys Asp Asp		
605	610	615
Thr Val Thr Tyr Ser Ala Leu His Lys Arg Gln Val Gly Thr Met		
620	625	630
Arg Thr Ser Phe Gln Ile Phe Gln Lys Met Arg Gly Phe Ile Thr		
635	640	645
Gln Ser		

<210> 30
<211> 483
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 30
Ser Lys Trp Val Phe Glu His Pro Glu Thr Leu Tyr Ala Trp Glu
1 5 10 15
Gly Ala Cys Val Trp Ile Pro Cys Thr Tyr Arg Ala Leu Asp Gly
20 25 30
Asp Leu Glu Ser Phe Ile Leu Phe His Asn Pro Glu Tyr Asn Lys
35 40 45
Asn Thr Ser Lys Phe Asp Gly Thr Arg Leu Tyr Glu Ser Thr Lys
50 55 60

287

Asp Gly Lys Val Pro Ser Glu Gln Lys Arg Val Gln Phe Leu Gly
65 70 75

Asp Lys Asn Lys Asn Cys Thr Leu Ser Ile His Pro Val His Leu
80 85 90

Asn Asp Ser Gly Gln Leu Gly Leu Arg Met Glu Ser Lys Thr Glu
95 100 105

Lys Trp Met Glu Arg Ile His Leu Asn Val Ser Glu Arg Pro Phe
110 115 120

Pro Pro His Ile Gln Leu Pro Pro Glu Ile Gln Glu Ser Gln Glu
125 130 135

Val Thr Leu Thr Cys Leu Leu Asn Phe Ser Cys Tyr Gly Tyr Pro
140 145 150

Ile Gln Leu Gln Trp Leu Leu Glu Gly Val Pro Met Arg Gln Ala
155 160 165

Ala Val Thr Ser Thr Ser Leu Thr Ile Lys Ser Val Phe Thr Arg
170 175 180

Ser Glu Leu Lys Phe Ser Pro Gln Trp Ser His His Gly Lys Ile
185 190 195

Val Thr Cys Gln Leu Gln Asp Ala Asp Gly Lys Phe Leu Ser Asn
200 205 210

Asp Thr Val Gln Leu Asn Val Lys His Pro Pro Lys Lys Val Thr
215 220 225

Thr Val Ile Gln Asn Pro Met Pro Ile Arg Glu Gly Asp Thr Val
230 235 240

Thr Leu Ser Cys Asn Tyr Asn Ser Ser Asn Pro Ser Val Thr Arg
245 250 255

Tyr Glu Trp Lys Pro His Gly Ala Trp Glu Glu Pro Ser Leu Gly
260 265 270

Val Leu Lys Ile Gln Asn Val Gly Trp Asp Asn Thr Thr Ile Ala
275 280 285

Cys Ala Ala Cys Asn Ser Trp Cys Ser Trp Ala Ser Pro Val Ala
290 295 300

Leu Asn Val Gln Tyr Ala Pro Arg Asp Val Arg Val Arg Lys Ile
305 310 315

Lys Pro Leu Ser Glu Ile His Ser Gly Asn Ser Val Ser Leu Gln
320 325 330

Cys Asp Phe Ser Ser Ser His Pro Lys Glu Val Gln Phe Phe Trp
335 340 345

228

Glu Lys Asn Gly Arg Leu Leu Gly Lys Glu Ser Gln Leu Asn Phe
350 355 360

Asp Ser Ile Ser Pro Glu Asp Ala Gly Ser Tyr Ser Cys Trp Val
365 370 375

Asn Asn Ser Ile Gly Gln Thr Ala Ser Lys Ala Trp Thr Leu Glu
380 385 390

Val Leu Tyr Ala Pro Arg Arg Leu Arg Val Ser Met Ser Pro Gly
395 400 405

Asp Gln Val Met Glu Gly Lys Ser Ala Thr Leu Thr Cys Glu Ser
410 415 420

Asp Ala Asn Pro Pro Val Ser His Tyr Thr Trp Phe Asp Trp Asn
425 430 435

Asn Gln Ser Leu Pro Tyr His Ser Gln Lys Leu Arg Leu Glu Pro
440 445 450

Val Lys Val Gln His Ser Gly Ala Tyr Trp Cys Gln Gly Thr Asn
455 460 465

Ser Val Gly Lys Gly Arg Ser Pro Leu Ser Thr Leu Thr Val Tyr
470 475 480

Tyr Ser Pro

<210> 31

<211> 846

<212> PRT

<213> Pan troglodytes

<400> 31

Met His Leu Leu Gly Pro Trp Leu Leu Leu Leu Glu Tyr Leu Ala
1 5 10 15

Phe Ser Asp Ser Ser Lys Trp Asn Ile Glu His Pro Gly Thr Ile
20 25 30

Tyr Ala Trp Glu Gly Ala Cys Ile Trp Val Pro Cys Thr Tyr Arg
35 40 45

Val Leu Asp Gly Ala Leu Glu Thr Phe Ile Leu Phe His Asn Pro
50 55 60

Glu Tyr Asn Gln Asn Met Ser Lys Phe Glu Gly Thr Arg Leu Tyr
65 70 75

Glu Ser Thr Lys Asp Gly Lys Val Pro Ser Gly Gln Lys Arg Val
80 85 90

Gln Phe Leu Gly Asn Lys Ile Asn Asn Asn Cys Thr Leu Ser Ile

29

95	100	105
His Pro Val His Val Asn Asp Ser Gly Gln Leu Gly Leu Arg Met		
110	115	120
Val Ser Lys Thr Glu Lys Trp Met Glu Arg Ile His Leu Asn Val		
125	130	135
Ser Glu Arg Pro Phe Pro Pro Arg Ile Gln Leu Pro Pro Lys Leu		
140	145	150
Gln Glu Ser Gln Glu Val Thr Leu Thr Cys Leu Leu Asn Phe Ser		
155	160	165
Cys Tyr Gly Tyr Gln Ile Gln Leu Gln Trp Leu Leu Glu Gly Ala		
170	175	180
Pro Met Arg Gln Ala Ala Val Thr Leu Thr Ser Leu Ser Thr Lys		
185	190	195
Ser Val Phe Thr Arg Ser Glu Leu Lys Phe Ser Pro Gln Trp Ser		
200	205	210
His His Gly Lys Ile Val Thr Cys Glu Leu His Asp Val Asp Gly		
215	220	225
Lys Val Leu Ser Glu Asp Thr Val Gln Leu Asn Val Lys His Thr		
230	235	240
Pro Lys Leu Thr Ile Glu Val Thr Pro Asn Glu Thr Ile Val Arg		
245	250	255
Lys Gly Asp Ser Val Thr Met Thr Cys Lys Val Asn Ser Ser Asn		
260	265	270
Pro Glu Tyr Thr Thr Val Ser Trp Leu Lys Asp Asp Ile Pro Leu		
275	280	285
Lys Glu Gln Asn Thr Leu Met Leu Thr Leu His Glu Val Thr Lys		
290	295	300
Ser Gln Thr Gly Thr Tyr Cys Cys Arg Val Ser Asn Asp Val Gly		
305	310	315
Pro Ala Thr Ser Glu Lys Val Phe Leu Gln Val Gln Tyr Ala Pro		
320	325	330
Glu Pro Ser Arg Val Gln Ile Ser Gln Ser Pro Ala Val Glu Gly		
335	340	345
Ser Glu Val Asn Phe Leu Cys Ile Ser Pro Ala Asn Pro Leu Pro		
350	355	360
Thr Asn Tyr Thr Trp Tyr His Asn Gly Lys Glu Val Gln Gly Arg		
365	370	375

26
m

Thr Glu Lys Gln Phe Gln Ile Gln Lys Ile Leu Pro Trp His Ala
380 385 390

Gly Thr Tyr Ser Cys Val Ala Glu Asn Ile Leu Gly Ile Gly Glu
395 400 405

Arg Gly Pro Gly Thr Glu Leu Asp Val Gln Tyr Pro Pro Lys Lys
410 415 420

Val Thr Met Val Ile Glu Asn Pro Thr Pro Ile Arg Glu Gly Asp
425 430 435

Thr Val Thr Leu Ser Cys Asn Tyr Ser Ser Ser Asn Pro Ile Val
440 445 450

Asn His Tyr Glu Trp Arg Pro Arg Gly Ala Trp Glu Glu Pro Ser
455 460 465

Leu Gly Val Leu Lys Ile Gln Asn Ile Gly Trp Asn Asn Thr Ala
470 475 480

Val Ala Cys Ala Ala Cys Asn Asn Trp Cys Ser Trp Ala Ser Pro
485 490 495

Val Thr Leu Asn Val Leu Tyr Ala Pro Arg Gly Val Arg Val Arg
500 505 510

Lys Ile Lys Pro Leu Ser Glu Ile His Ser Gly Asn Leu Val Ser
515 520 525

Leu Gln Cys Asp Phe Ser Ser Ser His Pro Lys Glu Val Gln Phe
530 535 540

Phe Trp Glu Lys Asn Gly Ser Leu Leu Gly Lys Glu Ser Gln Leu
545 550 555

Asn Phe Asp Ser Ile Ser Pro Glu Asp Ala Gly Ser Tyr Ser Cys
560 565 570

Trp Val Asn Asn Ser Ile Gly Gln Thr Ala Ser Lys Ala Trp Thr
575 580 585

Leu Glu Val Leu Tyr Ala Pro Arg Arg Leu Arg Val Ser Met Ser
590 595 600

Gln Gly Asn Gln Val Met Glu Gly Lys Thr Ala Ile Leu Thr Cys
605 610 615

Glu Ser Asp Ala Asn Pro Pro Val Tyr Ser Tyr Ala Trp Phe Asp
620 625 630

Trp Asn Asn Gln Ser Leu Pro Tyr Ser Gly Arg Met Leu Arg Leu
635 640 645

Glu Pro Val Lys Val Gln His Ser Gly Ala Tyr Trp Cys Gln Gly
650 655 660

31

Thr Asn Arg Val Gly Lys Gly His Ser Pro Leu Ile Thr Leu Thr
665 670 675

Val Tyr Tyr Ser Pro Glu Thr Ile Gly Arg Arg Val Ala Val Gly
680 685 690

Leu Gly Ser Cys Leu Ala Ile Leu Ile Leu Ala Met Cys Gly Phe
695 700 705

Lys Val Gln Arg Arg Trp Lys Arg Thr Gln Ser Gln Gln Gly Leu
710 715 720

Gln Glu Asn Ser Ser Gly Gln Ser Phe Phe Val Arg Asn Lys Lys
725 730 735

Val Arg Arg Thr Pro Leu Ser Glu Gly Pro His Ser Leu Gly Cys
740 745 750

Tyr Asn Pro Met Met Glu Asp Gly Ile Ser Tyr Ala Thr Leu Arg
755 760 765

Phe Pro Glu Thr Asn Thr Pro Arg Thr Gly Asp Ala Glu Thr Ser
770 775 780

Glu Leu Gln Arg Leu Pro Pro Asp Cys Asp Asp Thr Val Thr Tyr
785 790 795

Ser Val Leu Gln Lys Arg Gln Val Gly Asp Tyr Glu Asn Val Ile
800 805 810

Pro Asp Phe Pro Glu Asp Glu Gly Ile His Tyr Ser Glu Leu Ile
815 820 825

Gln Phe Gly Phe Gly Glu Arg Pro Gln Ala Gln Glu Asn Val Asp
830 835 840

Tyr Val Ile Val Lys His
845

<210> 32
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 32
Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Ile Gly Ala Thr Phe Leu
1 5 10 15

Glu

<210> 33

332

<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 33
Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Ile Gly Gln Thr Phe Leu
1 5 10 15

Glu

<210> 34
<211> 120
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 34
Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly
1 5 10 15

Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Glu Phe Ser
20 25 30

Arg Ser Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Arg
35 40 45

Glu Trp Ile Gly Arg Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr
50 55 60

Ser Gly Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser
65 70 75

Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Val Asp
80 85 90

Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg Asp Gly Ser Ser Trp Asp Trp
95 100 105

Tyr Phe Asp Val Trp Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
110 115 120

<210> 35
<211> 112
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 35

333

Asp Ile Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu
1 5 10 15

Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val
 20 25 30

His Ser Asn Gly Asn Thr Phe Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro
 35 40 45

Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe
 50 55 60

Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
 65 70 75

Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val
 80 85 90

Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser Gln Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gly
 95 100 105

Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 110

<210> 36
<211> 847
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 36
Met His Leu Leu Gly Pro Trp Leu Leu Leu Leu Val Leu Glu Tyr
1 5 10 15

Leu Ala Phe Ser Asp Ser Ser Lys Trp Val Phe Glu His Pro Glu
 20 25 30

Thr Leu Tyr Ala Trp Glu Gly Ala Cys Val Trp Ile Pro Cys Thr
 35 40 45

Tyr Arg Ala Leu Asp Gly Asp Leu Glu Ser Phe Ile Leu Phe His
 50 55 60

Asn Pro Glu Tyr Asn Lys Asn Thr Ser Lys Phe Asp Gly Thr Arg
 65 70 75

Leu Tyr Glu Ser Thr Lys Asp Gly Lys Val Pro Ser Glu Gln Lys
 80 85 90

Arg Val Gln Phe Leu Gly Asp Lys Asn Lys Asn Cys Thr Leu Ser
 95 100 105

Ile His Pro Val His Leu Asn Asp Ser Gly Gln Leu Gly Leu Arg
 110 115 120

Met Glu Ser Lys Thr Glu Lys Trp Met Glu Arg Ile His Leu Asn
 125 130 135

734

Val Ser Glu Arg Pro Phe Pro Pro His Ile Gln Leu Pro Pro Glu
140 145 150

Ile Gln Glu Ser Gln Glu Val Thr Leu Thr Cys Leu Leu Asn Phe
155 160 165

Ser Cys Tyr Gly Tyr Pro Ile Gln Leu Gln Trp Leu Leu Glu Gly
170 175 180

Val Pro Met Arg Gln Ala Ala Val Thr Ser Thr Ser Leu Thr Ile
185 190 195

Lys Ser Val Phe Thr Arg Ser Glu Leu Lys Phe Ser Pro Gln Trp
200 205 210

Ser His His Gly Lys Ile Val Thr Cys Gln Leu Gln Asp Ala Asp
215 220 225

Gly Lys Phe Leu Ser Asn Asp Thr Val Gln Leu Asn Val Lys His
230 235 240

Thr Pro Lys Leu Glu Ile Lys Val Thr Pro Ser Asp Ala Ile Val
245 250 255

Arg Glu Gly Asp Ser Val Thr Met Thr Cys Glu Val Ser Ser Ser
260 265 270

Asn Pro Glu Tyr Thr Thr Val Ser Trp Leu Lys Asp Gly Thr Ser
275 280 285

Leu Lys Lys Gln Asn Thr Phe Thr Leu Asn Leu Arg Glu Val Thr
290 295 300

Lys Asp Gln Ser Gly Lys Tyr Cys Cys Gln Val Ser Asn Asp Val
305 310 315

Gly Pro Gly Arg Ser Glu Glu Val Phe Leu Gln Val Gln Tyr Ala
320 325 330

Pro Glu Pro Ser Thr Val Gln Ile Leu His Ser Pro Ala Val Glu
335 340 345

Gly Ser Gln Val Glu Phe Leu Cys Met Ser Leu Ala Asn Pro Leu
350 355 360

Pro Thr Asn Tyr Thr Trp Tyr His Asn Gly Lys Glu Met Gln Gly
365 370 375

Arg Thr Glu Glu Lys Val His Ile Pro Lys Ile Leu Pro Trp His
380 385 390

Ala Gly Thr Tyr Ser Cys Val Ala Glu Asn Ile Leu Gly Thr Gly
395 400 405

Gln Arg Gly Pro Gly Ala Glu Leu Asp Val Gln Tyr Pro Pro Lys

334

410	415	420
Lys Val Thr Thr Val Ile Gln Asn Pro Met Pro Ile Arg Glu Gly		
425	430	435
Asp Thr Val Thr Leu Ser Cys Asn Tyr Asn Ser Ser Asn Pro Ser		
440	445	450
Val Thr Arg Tyr Glu Trp Lys Pro His Gly Ala Trp Glu Glu Pro		
455	460	465
Ser Leu Gly Val Leu Lys Ile Gln Asn Val Gly Trp Asp Asn Thr		
470	475	480
Thr Ile Ala Cys Ala Arg Cys Asn Ser Trp Cys Ser Trp Ala Ser		
485	490	495
Pro Val Ala Leu Asn Val Gln Tyr Ala Pro Arg Asp Val Arg Val		
500	505	510
Arg Lys Ile Lys Pro Leu Ser Glu Ile His Ser Gly Asn Ser Val		
515	520	525
Ser Leu Gln Cys Asp Phe Ser Ser Ser His Pro Lys Glu Val Gln		
530	535	540
Phe Phe Trp Glu Lys Asn Gly Arg Leu Leu Gly Lys Glu Ser Gln		
545	550	555
Leu Asn Phe Asp Ser Ile Ser Pro Glu Asp Ala Gly Ser Tyr Ser		
560	565	570
Cys Trp Val Asn Asn Ser Ile Gly Gln Thr Ala Ser Lys Ala Trp		
575	580	585
Thr Leu Glu Val Leu Tyr Ala Pro Arg Arg Leu Arg Val Ser Met		
590	595	600
Ser Pro Gly Asp Gln Val Met Glu Gly Lys Ser Ala Thr Leu Thr		
605	610	615
Cys Glu Ser Asp Ala Asn Pro Pro Val Ser His Tyr Thr Trp Phe		
620	625	630
Asp Trp Asn Asn Gln Ser Leu Pro His His Ser Gln Lys Leu Arg		
635	640	645
Leu Glu Pro Val Lys Val Gln His Ser Gly Ala Tyr Trp Cys Gln		
650	655	660
Gly Thr Asn Ser Val Gly Lys Gly Arg Ser Pro Leu Ser Thr Leu		
665	670	675
Thr Val Tyr Tyr Ser Pro Glu Thr Ile Gly Arg Arg Val Ala Val		
680	685	690

336

Gly Leu Gly Ser Cys Leu Ala Ile Leu Ile Leu Ala Ile Cys Gly
695 700 705

Leu Lys Leu Gln Arg Arg Trp Lys Arg Thr Gln Ser Gln Gln Gly
710 715 720

Leu Gln Glu Asn Ser Ser Gly Gln Ser Phe Phe Val Arg Asn Lys
725 730 735

Lys Val Arg Arg Ala Pro Leu Ser Glu Gly Pro His Ser Leu Gly
740 745 750

Cys Tyr Asn Pro Met Met Glu Asp Gly Ile Ser Tyr Thr Thr Leu
755 760 765

Arg Phe Pro Glu Met Asn Ile Pro Arg Thr Gly Asp Ala Glu Ser
770 775 780

Ser Glu Met Gln Arg Pro Pro Arg Thr Cys Asp Asp Thr Val Thr
785 790 795

Tyr Ser Ala Leu His Lys Arg Gln Val Gly Asp Tyr Glu Asn Val
800 805 810

Ile Pro Asp Phe Pro Glu Asp Glu Gly Ile His Tyr Ser Glu Leu
815 820 825

Ile Gln Phe Gly Val Gly Glu Arg Pro Gln Ala Gln Glu Asn Val
830 835 840

Asp Tyr Val Ile Leu Lys His
845

<210> 37

<211> 42

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 37

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp
1 5 10 15

Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn
20 25 30

Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys
35 40

<210> 38

<211> 218

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 38

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
1 5 10 15

237

Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
20 25 30

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
35 40 45

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
50 55 60

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
65 70 75

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
80 85 90

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
95 100 105

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
110 115 120

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
125 130 135

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
140 145 150

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
155 160 165

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
170 175 180

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
185 190 195

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
200 205 210

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
215

<210> 39
<211> 217
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 39
Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
1 5 10 15

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
20 25 30

Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe

36

35	40	45
Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys		
50	55	60
Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val		
65	70	75
Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys		
80	85	90
Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr		
95	100	105
Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr		
110	115	120
Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu		
125	130	135
Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu		
140	145	150
Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro		
155	160	165
Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu		
170	175	180
Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys		
185	190	195
Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser		
200	205	210
Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys		
215		

<210> 40
<211> 217
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 40

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro			
1	5	10	15
Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val			
20	25	30	
Thr Cys Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe			
35	40	45	
Lys Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys			
50	55	60	



Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val
65 70 75

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
80 85 90

Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
95 100 105

Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
110 115 120

Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
125 130 135

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
140 145 150

Trp Glu Ser Ser Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Asn Thr Thr Pro
155 160 165

Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
170 175 180

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Ile Phe Ser Cys
185 190 195

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn Arg Phe Thr Gln Lys Ser
200 205 210

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
215

<210> 41
<211> 218
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 41
Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
1 5 10 15

Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
20 25 30

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln
35 40 45

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
50 55 60

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
65 70 75

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
80 85 90

340

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys
95 100 105

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
110 115 120

Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
125 130 135

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
140 145 150

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
155 160 165

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg
170 175 180

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
185 190 195

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Thr Tyr Gln Lys
200 205 210

Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
215

<210> 42

<211> 30

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> la secuencia está sintetizada

<400> 42

Cys Asp Lys Thr His Thr Gly Gly Gly Ser Gln Arg Leu Met Glu
1 5 10 15

Asp Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu Trp Glu Asp Asp Phe
20 25 30

<210> 43

<211> 20

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> la secuencia está sintetizada

<400> 43

Gln Arg Leu Met Glu Asp Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu
1 5 10 15

Trp Glu Asp Asp Phe

42

20

<210> 44
<211> 20
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 44
Gln Arg Leu Ile Glu Asp Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu
1 5 10 15

Trp Glu Asp Asp Phe
20

<210> 45
<211> 18
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 45
Arg Leu Ile Glu Asp Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu Trp
1 5 10 15

Glu Asp Asp

<210> 46
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 46
Asp Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu Trp
5 10

<210> 47
<211> 14
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 47
Trp Val Arg Arg Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly
5 10

<210> 48
<211> 32
<212> PRT

7/12

<213> Homo sapiens

<400> 48

Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met
1 5 10 15

Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

Ala Arg

<210> 49

<211> 23

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 49

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro
1 5 10 15

Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys
20

<210> 50

<211> 25

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 50

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

Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser
20 25

<210> 51

<211> 13

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 51

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
5 10

<210> 52

<211> 31

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 52

Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met
1 5 10 15

Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

379

Ala

<210> 53
<211> 30
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 53
Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met
1 5 10 15

Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 54
<211> 30
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 54
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser
1 5 10 15

Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Val Ser
20 25 30

<210> 55
<211> 14
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 55
Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly
5 10

<210> 56
<211> 32
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 56
Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
1 5 10 15

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

Ala Arg

<210> 57
<211> 25
<212> PRT
<213> Homo sapiens

344

<400> 57
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser
1 5 10 15

Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser
20 25

<210> 58
<211> 13
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 58
Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
5 10

<210> 59
<211> 31
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 59
Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
1 5 10 15

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

Ala

<210> 60
<211> 30
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 60
Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
1 5 10 15

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 61
<211> 30
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 61
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
1 5 10 15

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

749

<210> 62
<211> 14
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 62
Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser
5 10

<210> 63
<211> 32
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 63
Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
1 5 10 15
Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

Ala Arg

<210> 64
<211> 25
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 64
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
1 5 10 15
Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
20 25

<210> 65
<211> 13
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 65
Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
5 10

<210> 66
<211> 31
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 66
Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
1 5 10 15
Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

346

Ala

<210> 67
<211> 30
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 67
Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
1 5 10 15

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 68
<211> 30
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 68
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
1 5 10 15

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys
20 25 30

<210> 69
<211> 32
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 69
Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu
1 5 10 15

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

Ser Arg

<210> 70
<211> 31
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 70
Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu
1 5 10 15

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

Ser

<210> 71
<211> 32
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 71
Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu
1 5 10 15

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

Ala Arg

<210> 72
<211> 31
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 72
Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu
1 5 10 15

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

Ala

<210> 73
<211> 30
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 73
Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu
1 5 10 15

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 74
<211> 23
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 74
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
1 5 10 15

Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys
20

248

<210> 75
<211> 15
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 75
Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 76
<211> 32
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 76
Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
1 5 10 15

Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr
20 25 30

Tyr Cys

<210> 77
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 77
Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
5 10

<210> 78
<211> 14
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 78
Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
5 10

<210> 79
<211> 15
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 79
Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 80
<211> 32
<212> PRT
<213> Homo sapiens

349

<400> 80
Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
1 5 10 15

Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr
20 25 30

Tyr Cys

<210> 81
<211> 23
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 81
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro
1 5 10 15

Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys
20

<210> 82
<211> 15
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 82
Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 83
<211> 32
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 83
Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
1 5 10 15

Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr
20 25 30

Tyr Cys

<210> 84
<211> 23
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 84
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu
1 5 10 15

Gly Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys

350

20

<210> 85
<211> 15
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 85
Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 86
<211> 32
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 86
Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
1 5 10 15

Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr
20 25 30

Tyr Cys

<210> 87
<211> 219
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 87
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
1 5 10 15

Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val
20 25 30

His Ser Val Gly Asn Thr Phe Leu Glu Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
35 40 45

Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
65 70 75

Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr
80 85 90

Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser Gln Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gln
95 100 105

ay

Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val
110 115 120

Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala
125 130 135

Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys
140 145 150

Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
155 160 165

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
170 175 180

Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys
185 190 195

Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val
200 205 210

Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
215

<210> 88

<211> 450

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> la secuencia está sintetizada

<400> 88

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

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

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

Glu Trp Val Gly Arg Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr
50 55 60

Ser Gly Lys Phe Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser
65 70 75

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

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Gly Ser Ser Trp Asp Trp
95 100 105

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

352

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser
125 130 135

Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys
140 145 150

Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala
155 160 165

Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
170 175 180

Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser
185 190 195

Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
200 205 210

Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
215 220 225

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
230 235 240

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
245 250 255

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
260 265 270

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
275 280 285

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
290 295 300

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
305 310 315

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
320 325 330

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
335 340 345

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
350 355 360

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
365 370 375

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
380 385 390

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly



395	400	405
Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp		
410	415	420
Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu		
425	430	435
His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys		
440	445	450

<210> 89
<211> 120
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 89
Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly
1 5 10 15

Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Glu Phe Ser
20 25 30

Arg Ser Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Arg
35 40 45

Glu Trp Ile Gly Arg Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr
50 55 60

Ser Gly Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser
65 70 75

Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Val Asp
80 85 90

Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg Asp Gly Ser Ser Trp Asp Trp
95 100 105

Tyr Phe Asp Val Trp Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
110 115 120

<210> 90
<211> 112
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 90
Asp Ile Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu
1 5 10 15

354

Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val
20 25 30

His Ser Asn Gly Asn Thr Phe Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro
35 40 45

Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
65 70 75

Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val
80 85 90

Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser Gln Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gly
95 100 105

Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
110

<210> 91
<211> 219
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 91
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
1 5 10 15

Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val
20 25 30

His Ser Val Gly Asn Thr Phe Leu Glu Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
35 40 45

Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
65 70 75

Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr
80 85 90

Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser Gln Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gln
95 100 105

Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val
110 115 120

Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala
125 130 135

51
37

Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys
140 145 150

Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
155 160 165

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
170 175 180

Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys
185 190 195

Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Cys
200 205 210

Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
215

<210> 92

<211> 450

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> la secuencia está sintetizada

<400> 92

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

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

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

Glu Trp Val Gly Arg Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr
50 55 60

Ser Gly Lys Phe Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser
65 70 75

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

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Gly Ser Ser Trp Asp Trp
95 100 105

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

Cys Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser
125 130 135

Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys

46
37

140	145	150
Asp Tyr Phe	Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala	
155	160	165
Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser		
170	175	180
Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser		
185	190	195
Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser		
200	205	210
Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys		
215	220	225
Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly		
230	235	240
Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met		
245	250	255
Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser		
260	265	270
His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val		
275	280	285
Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn		
290	295	300
Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp		
305	310	315
Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala		
320	325	330
Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln		
335	340	345
Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu		
350	355	360
Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe		
365	370	375
Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro		
380	385	390
Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly		
395	400	405
Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp		
410	415	420

MSA

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
425 430 435

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
440 445 450

<210> 93
<211> 450
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 93
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
1 5 10 15

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

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

Glu Trp Val Gly Arg Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr
50 55 60

Ser Gly Lys Phe Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser
65 70 75

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

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Gly Ser Ser Trp Asp Trp
95 100 105

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

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser
125 130 135

Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys
140 145 150

Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala
155 160 165

Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
170 175 180

Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser
185 190 195

Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
200 205 210

230

Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
215 220 225

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
230 235 240

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
245 250 255

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
260 265 270

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
275 280 285

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
290 295 300

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
305 310 315

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
320 325 330

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
335 340 345

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
350 355 360

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
365 370 375

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
380 385 390

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Cys Asp Gly
395 400 405

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
410 415 420

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
425 430 435

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
440 445 450

39

Brigard & Castro
BOGOTÁ - COLOMBIA

PODER

Yo (nosotros)

domiciliado(s) en

Nombro(amos) a: **JUAN PABLO CADENA SARMIENTO y/o BEATRIZ JARAMILLO y/o CARLOS H. PALACIO EASTMAN y/o HECTOR GOMEZ MEJIA**, de Bogotá, Colombia, apoderados verdaderos y legales con poder especial, amplio y suficiente, para recabar de las oficinas y autoridades colombianas administrativas, judiciales y de policía, en cualquier instancia o recurso, la obtención de patentes de invención, registros de marcas, diseños industriales, modelos de utilidad, depósitos de nombres comerciales y enseñas, registros de derechos de autor y contratos sobre los mismos, obtención de certificados de obtentor de variedades vegetales, así como sus prórrogas, renovaciones, anotaciones de traspaso, cambios de nombre y/o domicilio; elaborar, tramitar y registrar contratos de licencia y licencias de cualesquiera clases; intervenir como demandante o como demandado en cualquier instancia y recurso ante cualquier juez, corporación, funcionario público o autoridad en acciones judiciales, administrativas y de policía tales como: oposiciones al registro de marcas; acciones de caducidad, cancelación y nulidad; acciones reivindicatorias; acciones derivadas de la obtención o explotación de licencias; acciones de competencia desleal; demandas penales; acciones de indemnización de perjuicios; reclamos y observaciones a solicitudes de patentes, diseños industriales, modelos de utilidad, en el ejercicio de medidas cautelares y en otras acciones o medidas similares.

A este efecto, lo(s) faculto(amos) para elevar solicitudes, formular descripciones, enmiendas, protestas, declaraciones, oposiciones, cancelaciones, nulidades, apelaciones y reclamos; pagar impuestos, cuotas y gravámenes prescritos por la ley; renunciar o desistir a derechos concedidos o en curso de concesión; recibir toda clase de documentos y valores, dando el descargo respectivo, y, en general, para dar ante dichas autoridades todos los pasos necesarios al efecto indicado y tomar todas las medidas que creyeran conducentes al resguardo de mis (nuestros intereses); con todas las demás facultades legales necesarias.

Este poder comprende la facultad de ratificar o confirmar en mi (nuestro) nombre lo actuado así como la facultad de desistir, transigir, comprometer, y la de sustituirlo en todo o en parte y revocar sustituciones. Asimismo nombro(amos) a: **JUAN PABLO CADENA SARMIENTO y/o BEATRIZ JARAMILLO y/o CARLOS H. PALACIO EASTMAN y/o HECTOR GOMEZ MEJIA**, domiciliado(s) en la Carrera 7 No. 16-56 Piso 9; mis (nuestros) apoderados en Colombia, con facultades para recibir notificaciones y designar apoderados judiciales o extrajudiciales.

Otorgado y firmado en

hoy de de 200

Firma

Nombre
Cargo

POWER OF ATTORNEY

I (We)

**Genentech, Inc.
1 DNA Way**

domiciled in **South San Francisco, California 94080-4990
USA**

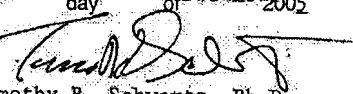
Hereby appoints **JUAN PABLO CADENA SARMIENTO and/or BEATRIZ JARAMILLO and/or CARLOS H. PALACIO EASTMAN and/or HECTOR GOMEZ MEJIA**, of Bogotá, Colombia, my (our) true and lawful attorneys with special, ample and sufficient power to obtain from the Colombian administrative, judicial and police offices and authorities, in any instance, privileges of patents of invention, registration of trademarks, industrial designs and utility models; registration of commercial names and emblems, registration of copyright and contracts related thereto, certificates of obtainers of vegetables varieties, as well as extensions, renewals and recordal of assignments and changes of name and domicile related to the above; to prepare, prosecute and register licenses of any kind; to act as plaintiff or defendant in any instance or recourse, and before any judge, corporation, public official or authority in judicial, administrative and police actions, such as: oppositions to the registration of trademarks; caducity, cancellation and nullity actions; claim actions derived from the obtaining or exploitation of licenses; action of unfair competition; criminal proceedings, actions for payment of damages; claims or observations on patent applications, models, industrial designs and utility models; in the exercise of preventive measures and in other actions or similar proceedings.

To that effect they hereby empowered to file applications, formulate descriptions, amendments, protests, declarations, oppositions, cancellations, nullities, appeals and claims; to pay taxes, quotas and assessments prescribed by law, renounce or waive the rights granted or in the process of granting; to receive all kinds of documents and valuables, giving the respective release of receipt, and, in general, to take before said authorities the necessary steps to such effect, and any measures that they may deem pertinent to the safeguard of my (our) interest(s) with all the other necessary legal powers.

This power includes the faculty to ratify or confirm desist, settle and compromise on my (our) behalf, and to substitute this power in whole or in part and to revoke substitutions. At the same time I (We) hereby appoints **JUAN PABLO CADENA SARMIENTO and/or BEATRIZ JARAMILLO and/or CARLOS H. PALACIO EASTMAN and/or HECTOR GOMEZ MEJIA**, domiciled in Carrera 7 No. 16-56, Piso 9; my (our) attorney(s) in fact, with powers to receive notifications and to designate judicial and extrajudicial attorneys.

Granted and signed in **South San Francisco, California
USA**

this 6th day of December 2002

Signature 
Name **Timothy R. Schwartz, Ph.D.**
Title **Section Patent Counsel
Authorized Corporate Signatory
Genentech, Inc.**

360

AS: 10898

3/3

APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. Country: United States of America

This public document

2. has been signed by T. Wallace

3. acting in the capacity of Certifying Officer

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

Certified

5. at Washington, D.C.

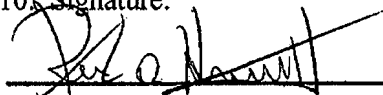
6. the twenty-eighth of November, 2008

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

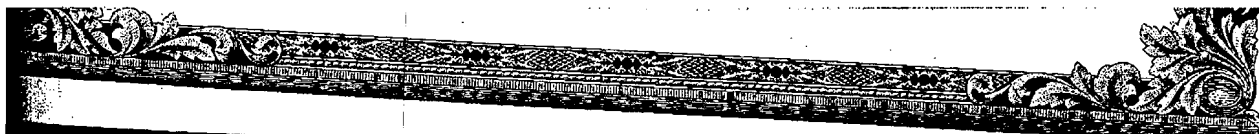
8. No. 09006307-8

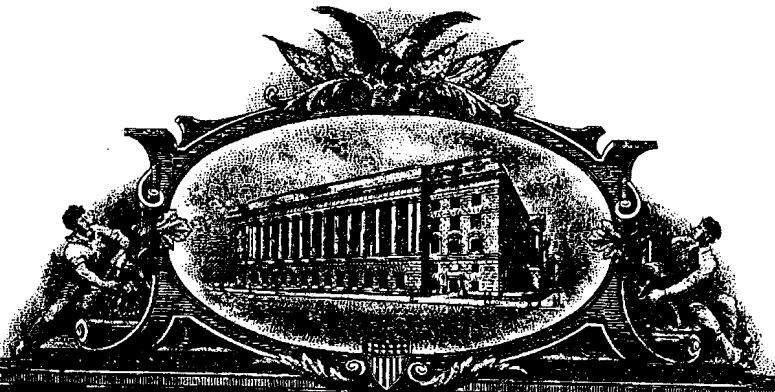
9. Seal/Stamp:

10. Signature:



Patrick O. Hatchett





THE UNITED STATES OF AMERICA

TO ALL TO WHOM THESE PRESENTS SHALL COME:

**UNITED STATES DEPARTMENT OF COMMERCE
United States Patent and Trademark Office**

November 13, 2008

**THIS IS TO CERTIFY THAT ANNEXED IS A TRUE COPY FROM THE
RECORDS OF THIS OFFICE OF A DOCUMENT RECORDED ON
May 04, 2007.**

**By Authority of the
Under Secretary of Commerce for Intellectual Property
and Director of the United States Patent and Trademark Office**



T. Wallace
T. WALLACE
Certifying Officer

361

PATENT ASSIGNMENT

Electronic Version v1.1
Worksheet Version v1.1

SUBMISSION TYPE:	NEW ASSIGNMENT
NATURE OF CONVEYANCE:	ASSIGNMENT

CONVEYING PARTY DATA

Name	Execution Date
Allen J. Ebens Jr.	05/04/2007
Aiane M. Gray	05/04/2007
Wei-Ching Liang	05/03/2007
Yan Wu	05/02/2007
Shang-Fan Yu	05/03/2007

RECEIVING PARTY DATA

Name:	Genentech, Inc.
Street Address:	1 DNA Way
City:	South San Francisco
State/Country:	CALIFORNIA
Postal Code:	94080

PROPERTY NUMBERS Total: 1

Property Type	Number
Application Number:	60911829

CORRESPONDENCE DATA

Fax Number: (650)952-9881
Correspondence will be sent via US Mail when the fax attempt is unsuccessful.
Phone: 650/225-2066
Email: cmricks@gene.com
Correspondent Name: Deirdre L. Conley
Address Line 1: 1 DNA Way
Address Line 4: South San Francisco, CALIFORNIA 94080

ATTORNEY DOCKET NUMBER:	PR2262-2
NAME OF SUBMITTER:	Deirdre L. Conley

500271109

PATENT
REEL: 019251 FRAME: 0812

CH \$40.00 60911829

al Attachments: 2

urce=PR2262-2Assignment#page1.tif

urce=PR2262-2Assignment#page2.tif

PATENT
REEL: 019251 FRAME: 0813

ASSIGNMENT

WHEREAS, Allen J. Ebens, Jr., a citizen of the United States, residing at 1932 Arroyo Avenue, San Carlos, CA 94070, and Alane M. Gray, a citizen of the United States, residing at 122 Kestrel Court, Brisbane, CA 94005, and Wei-Ching Liang, a citizen of Taiwan, residing at 840 Sea Spray Lane #112, Foster City, CA 94404, and Yan Wu, a citizen of the United States, residing at 846 Andromeda Lane, Foster City, CA 94404, and Shang-Fan Yu, a citizen of Taiwan, residing at 1103 Sandalwood Lane, Milpitas, CA 95035 (hereinafter "ASSIGNORS"), have invented a new and useful invention in

ANTIBODIES AND IMMUNOCONJUGATES AND USES THEREFOR

for which a provisional application Serial No. 60/911,829 (Docket No. PR2262-2) has been filed by them on April 13, 2007; and

WHEREAS, GENENTECH, INC., a corporation organized and existing under and by virtue of the laws of the State of Delaware, having a place of business at 1 DNA Way, South San Francisco, California 94080-4990, is desirous of acquiring an interest in and to said invention, and in and to the Letters Patents to be obtained therefor;

NOW, THEREFORE, be it known by all whom it may concern;

That for good and valuable consideration the receipt of which is hereby acknowledged, the said ASSIGNORS have and do hereby sell, assign, transfer and set over unto the said GENENTECH, INC., its successors and assigns, the full and exclusive right, title and interest including all rights under the Paris Convention for the Protection of Industrial Property, in and to said invention, and in and to any and all Letters Patents to be granted and issued therefor or any continuation, division, renewal, or substitute thereof, and as to Letters Patents any reissue or re-examination thereof, not only for, to, and in the United States of America, its territories and possessions, but for, to and in all other countries; and it has been and is hereby authorized and requested that the appropriate government agencies issue said Letters Patents to said GENENTECH, INC., in accordance with this Assignment.

Said ASSIGNORS covenant and agree to cooperate with GENENTECH, INC., to enable said GENENTECH, INC. to enjoy to the fullest extent the right, title and interest herein conveyed in the United States and foreign countries. Such cooperation by said ASSIGNORS includes prompt production of pertinent facts and documents, giving of testimony, execution of petitions, oaths, specifications, declarations or other papers, and other assistance all to the extent deemed necessary or desirable by said GENENTECH, INC., (a) for perfecting the right, title and interest herein conveyed; (b) for prosecuting any of said applications; (c) for filing and prosecuting applications for reissuance of any of said patents; (d) for interference or other priority proceedings involving said invention; and (e) for legal proceedings involving said invention and any applications therefor and any patents granted thereon, including without limitation opposition proceedings, cancellation proceedings, priority contests, public use proceedings, infringement actions and court actions; provided, however, that the expense incurred by said ASSIGNORS in providing such cooperation shall be paid for by said GENENTECH, INC.

The terms and covenants of this assignment shall inure to the benefit of said GENENTECH, INC., its successors, assigns and other legal representatives, and shall be binding upon said ASSIGNORS, their respective heirs, legal representatives and assigns.

Application No. 60/911,829

Docket No. PR2262-2

Said ASSIGNORS hereby warrant and represent that they have not entered and will not enter into any assignment, contract, or understanding in conflict herewith.

IN WITNESS WHEREOF we undersign as follows;

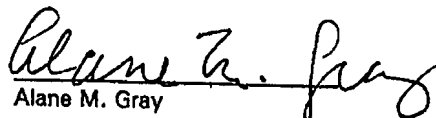
South San Francisco

Dated: 5/4/2007


Allen Ebens

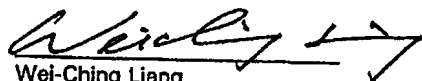
South San Francisco

Dated: 5.4.2007


Alane M. Gray

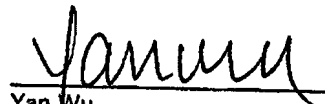
South San Francisco

Dated: 5/3/2007


Wei-Ching Liang

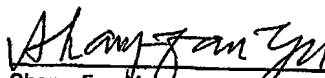
South San Francisco

Dated: 5/2/2007


Yan Wu

South San Francisco

Dated: 5/3/2007


Shang-Fan Yu

267

TRADUCCIÓN AL ESPAÑOL DEL DOCUMENTO DE CESIÓN A
GENENTECH, INC firmado por los cedentes y el cesionario.

APOSTILLA
(Convención de la Haya del 5 de octubre de 1961)

1. País: Estados Unidos de América

Este documento público

2. ha sido firmado por T. Wallace
3. actuando en capacidad de Funcionario que Certifica
4. lleva el sello/timbre de la Oficina de Marcas y Patentes de E.U.

Certificado

5. en Washington, D.C.
6. el veintiocho de noviembre de 2008
7. por el Funcionario de Autenticación Asistente, Departamento de Estado de los Estados Unidos.
8. No. 09006307-8
9. Sello/timbre

10. Firma

(Firma)
Patrick O. Hatchett

[Sello]

LOS ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA
A TODO AQUEL QUE PUEDA LLEGAR LA PRESENTE:

DEPARTAMENTO DE COMERCIO DE ESTADOS UNIDOS
Oficina de Marcas y Patentes

13 de Noviembre de 2008

LA PRESENTE CERTIFICA QUE EL ANEXO ES UNA COPIA VERDADERA
DE LOS ARCHIVOS DE ESTA OFICINA DE UN DOCUMENTO
ARCHIVADO EL 4 DE MAYO DE 2007.

Por la autoridad del
Subsecretario de Comercio para la Propiedad Intelectual
y Director de la Oficina de Marcas y Patentes de los Estados Unidos

(Firma)
T. WALLACE
Funcionario que certifica

Hay un sello que dice:
Oficina de Marcas y Patentes de Estados Unidos
Departamento de Comercio

364

CESIÓN DE PATENTE

Versión electrónica v1.1

Versión de la hoja v1.1

TIPO DE PRESENTACIÓN:	CESIÓN NUEVA
NATURALEZA DEL ACUERDO:	CESIÓN

DATOS DE LA PARTE CEDENTE

Nombre	Fecha de ejecución
Allen J. Ebens Jr.	05/04/2007
Alane M.Gray	05/04/2007
Wei-Ching Liang	05/03/2007
Yan Wu	05/02/2007
Shang-Fan Yu	05/03/2007

DATOS DE LA PARTE QUE RECIBE

Nombre:	Genentech, Inc.
Dirección:	1 DNA Way
Dirección Interna:	MS-49
Ciudad:	South San Francisco
Estado/País:	CALIFORNIA
Código Postal:	94080

NÚMERO DE PROPIETARIOS Total: 1

Tipo de Propiedad	Número
Número de solicitud:	60911829

DATOS DE CORRESPONDENCIA

Número de Fax: (650)952-9881

La correspondencia será enviada por Correo de Estados Unidos cuando los intentos de hacerlo por fax no sean exitosos.

Teléfono: 850 225 2066

Correo electrónico: cmricks@gene.com

Nombre del destinatario: Deirdre L. Conley

Dirección Línea 1: 1 DNA Way

Dirección Línea 4: South San Francisco, CALIFORNIA 94070

NÚMERO DE EXPEDIENTE DE ABOGADO:	PR2262-2
NOMBRE DEL REMITENTE:	Deirdre L. Conley

500271109

PATENTE

ROLLO: 019251 CUADRO: 0812

Anexos totales: 2
Fuente=PR2262-2Assignment#page1.tif
Fuente=PR2262-2Assignment#page2.tif

PATENTE
ROLLO: 019251 CUADRO: 0813

CESIÓN

CONSIDERANDO QUE, Allen J. Ebens, Jr., un ciudadano de los E.U.A., residente en 1932 Arroyo Ave., San Carlos, CA 94070, y Alane M. Gray, un ciudadano de los E.U.A., residente en 122 Kestrel Court, Brisbane, CA 94005, y Wei-Ching Liang, una ciudadana de Taiwan, residente en 840 Sea Spray Lane #112, Foster City, CA 94404, y Yan Wu, un ciudadano de U.S.A., residente en 846 Andromeda Lane, Foster City, CA 94404, y Shang-Fan Yu, un ciudadano de Taiwan, residente en 1103 Sandalwood Lane, Milpitas, CA 95035 (en adelante denominados como "CEDENTES"), han inventado una invención nueva y útil

ANTICUERPOS E INMUNOCONJUGADOS Y SUS USOS

para la cual se presentó una solicitud provisional con Serie No. 60/911,829 (Expediente No. PR2262-2) por ella el 13 de abril de 2007; y

CONSIDERANDO QUE, GENENTECH, INC., una corporación organizada y existente bajo y por virtud de las leyes del Estado de Delaware, que tiene oficinas en 1 DNA Way, South San Francisco, California 94080-4990, está deseosa de adquirir un interés en y para dicha invención, y en y para las patentes que se obtendrán de la misma;

AHORA, POR LO TANTO, téngase por sabido por todo aquel que le concierna:

Que por una consideración buena y valiosa el recibo de la cual se reconoce por la presente, dichos CEDENTES han y por la presente venden, ceden, transfieren y traspasan a dicha GENENTECH, INC. sus sucesores y cesionarios, el derecho, título e interés completo y exclusivo incluyendo todos los derechos bajo la Convención de París para la Protección de la Propiedad Industrial, en y para dicha invención, y en y para cualquiera y todas las patentes que se concedan y emitan para la misma o cualquier continuación, división, renovación, o sustitución de la misma, y en cuanto a patentes cualquier reemisión o reexaminación de las mismas, no solo para, por y en los Estados Unidos de América, sus territorios y posesiones, sin para, por y en todos los otros países; y se ha y por la presente se autoriza y solicita que las agencias gubernamentales respectivas emitan dichas patentes a GENENTECH, INC. de acuerdo con esta cesión.

Dichos CEDENTES garantizan y acuerdan cooperar con GENENTECH, INC., para posibilitar a dicha GENENTECH, INC., a disfrutar hasta su máxima extensión el derecho, título e interés aquí cedido en Estados Unidos y los países extranjeros. Tal cooperación por dichos CEDENTES incluye la pronta producción de hechos y documentos pertinentes, dando testimonio, ejecutando peticiones, juramentos, especificaciones, declaraciones u otros documentos, y otra ayuda todas hasta el punto considerado necesario o deseable por dichas GENENTECH, INC. (a) para perfeccionar el derecho, título e interés aquí cedido; (b) para procesar cualquiera de dichas solicitudes; (c) para presentar y procesar solicitudes de reemisión de cualquiera de dichas patentes; (d) para procesos de interferencia u otros procesos de prioridad que involucren dicha invención; y (e) para procedimientos legales que involucren dicha invención y cualquier solicitud de la misma y cualquier patente concedida sobre la misma, incluyendo sin limitación procedimientos de oposición, procedimientos de cancelación, disputas de prioridad, procesos de uso público, acciones de violación y acciones de la corte; con la condición que los gastos incurridos por dichos CEDENTES al proporcionar dicha cooperación deban ser pagados por GENENTECH, INC.

Los términos y garantías de esta cesión deben actuar en beneficio de dicha GENENTECH, INC. sus sucesores, cesionarios y otros representantes legales, y deberá ser obligante sobre dichos CEDENTES, sus respectivos herederos, representantes legales y cesionarios.

PATENTE

ROLLO: 019251 CUADRO: 0814

Solicitud No. 60/911,829

Expediente No. PR2262-21

Dichos CEDENTES por la presente garantizan y manifiestan que no han entrado y no entrará en ninguna cesión, contrato o entendimiento en conflicto con la presente.

EN TESTIMONIO DE LO CUAL se suscriben como sigue:

South San Francisco
Fecha: Mayo 4, 2007

(firma)
Allen Ebens

South San Francisco
Fecha: Mayo 4, 2007

(firma)
Alane M. Gray

South San Francisco
Fecha: Mayo 3, 2007

(firma)
Wei-Ching Liang

South San Francisco
Fecha: Mayo 2, 2007

(firma)
Yan Wu

South San Francisco
Fecha: Mayo 3, 2007

(firma)
Shang-Fan yu

ARCHIVADO: 05/04/2007

PATENTE
ROLLO: 019251 CUADRO: 0815

366

AS.10898J
21.

APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. Country: United States of America

This public document

2. has been signed by T. Wallace

3. acting in the capacity of Certifying Officer

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

Certified

5. at Washington, D.C.

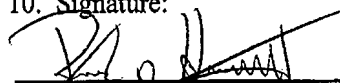
6. the twenty-eighth of November, 2008

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

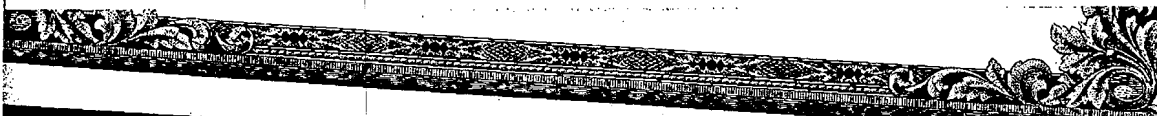
8. No. 09006307-7

9. Seal/Stamp:

10. Signature:



Patrick O. Hatchett



A 7156248

THE UNITED STATES OF AMERICA

TO ALL TO WHOM THESE PRESENTS SHALL COME:

UNITED STATES DEPARTMENT OF COMMERCE
United States Patent and Trademark Office

November 13, 2008

THIS IS TO CERTIFY THAT ANNEXED IS A TRUE COPY FROM THE
RECORDS OF THIS OFFICE OF A DOCUMENT RECORDED ON
May 01, 2007.

By Authority of the
Under Secretary of Commerce for Intellectual Property
and Director of the United States Patent and Trademark Office



T. Wallace
T. WALLACE
Certifying Officer

367

PATENT ASSIGNMENT

onic Version v1.1
sheet Version v1.1

MISSION TYPE: NEW ASSIGNMENT

TURE OF CONVEYANCE: ASSIGNMENT

ONVEYING PARTY DATA

Name	Execution Date
Allen J. Ebens	04/27/2007
Alane M. Gray	04/27/2007
Wei-Ching Liang	04/25/2007
Yan Wu	04/27/2007

RECEIVING PARTY DATA

Name:	Genentech, Inc.
Street Address:	1 DNA Way
City:	South San Francisco
State/Country:	CALIFORNIA
Postal Code:	94080

PROPERTY NUMBERS Total: 1

Property Type	Number
Application Number:	60908941

CORRESPONDENCE DATA

Fax Number: (650)982-9881
Correspondence will be sent via US Mail when the fax attempt is unsuccessful.
Phone: 650/225-2066
Email: cmricks@gene.com
Correspondent Name: Deirdre L. Conley
Address Line 1: 1 DNA Way
Address Line 4: South San Francisco, CALIFORNIA 94070

ATTORNEY DOCKET NUMBER: PR2262-1

NAME OF SUBMITTER: Deirdre L. Conley

Total Attachments: 2
source=PR2262-1Assignment#page1.tif

500268575

PATENT
REEL: 019233 FRAME: 0730

CH \$40.00 60908941

=PR2262-1Assignment#page2.tif

PATENT
REEL: 019233 FRAME: 0731

ASSIGNMENT

WHEREAS, Allen J. Ebens, Jr., a citizen of the United States, residing at 1932 Arroyo Avenue, San Carlos, CA 94070, and Alane M. Gray, a citizen of the United States, residing at 122 Kestrel Court, Brisbane, CA 94005, and Wei-Ching Liang, a citizen of Taiwan, residing at 840 Sea Spray Lane #112, Foster City, CA 94404, and Yan Wu, a citizen of the United States, residing at 846 Andromeda Lane, Foster City, CA 94404, (hereinafter "ASSIGNORS"), have invented a new and useful invention in

ANTIBODIES AND IMMUNOCONJUGATES AND USES THEREFOR

for which a provisional application Serial No. 60/908,941 (Docket No. PR2262-1) has been filed by them on March 29, 2007; and

WHEREAS, GENENTECH, INC., a corporation organized and existing under and by virtue of the laws of the State of Delaware, having a place of business at 1 DNA Way, South San Francisco, California 94080-4990, is desirous of acquiring an interest in and to said invention, and in and to the Letters Patents to be obtained therefor;

NOW, THEREFORE, be it known by all whom it may concern;

That for good and valuable consideration the receipt of which is hereby acknowledged, the said ASSIGNORS have and do hereby sell, assign, transfer and set over unto the said GENENTECH, INC., its successors and assigns, the full and exclusive right, title and interest including all rights under the Paris Convention for the Protection of Industrial Property, in and to said invention, and in and to any and all Letters Patents to be granted and issued therefor or any continuation, division, renewal, or substitute thereof, and as to Letters Patents any reissue or re-examination thereof, not only for, to, and in the United States of America, its territories and possessions, but for, to and in all other countries; and it has been and is hereby authorized and requested that the appropriate government agencies issue said Letters Patents to said GENENTECH, INC., in accordance with this Assignment.

Said ASSIGNORS covenant and agree to cooperate with GENENTECH, INC., to enable said GENENTECH, INC. to enjoy to the fullest extent the right, title and interest herein conveyed in the United States and foreign countries. Such cooperation by said ASSIGNORS includes prompt production of pertinent facts and documents, giving of testimony, execution of petitions, oaths, specifications, declarations or other papers, and other assistance all to the extent deemed necessary or desirable by said GENENTECH, INC., (a) for perfecting the right, title and interest herein conveyed; (b) for prosecuting any of said applications; (c) for filing and prosecuting applications for reissuance of any of said patents; (d) for interference or other priority proceedings involving said invention; and (e) for legal proceedings involving said invention and any applications therefor and any patents granted thereon, including without limitation opposition proceedings, cancellation proceedings, priority contests, public use proceedings, infringement actions and court actions; provided, however, that the expense incurred by said ASSIGNORS in providing such cooperation shall be paid for by said GENENTECH, INC.

The terms and covenants of this assignment shall inure to the benefit of said GENENTECH, INC., its successors, assigns and other legal representatives, and shall be binding upon said ASSIGNORS, their respective heirs, legal representatives and assigns.

Application No. 60/908,941

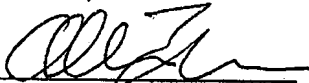
Docket No. PR2262-1

Said ASSIGNORS hereby warrant and represent that they have not entered and will not enter into any assignment, contract, or understanding in conflict herewith.

IN WITNESS WHEREOF we undersign as follows;

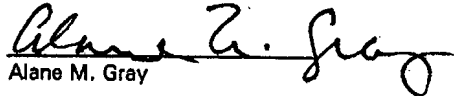
South San Francisco

Dated: 4/27/07


Allen Ebens

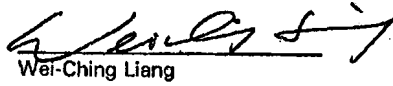
South San Francisco

Dated: 4.27.07


Alane M. Gray

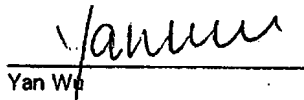
South San Francisco

Dated: 04/25/07


Wei-Ching Liang

South San Francisco

Dated: 4.27.07


Yan Wu

24

TRADUCCIÓN AL ESPAÑOL DEL DOCUMENTO DE CESIÓN A
GENENTECH, INC firmado por los cedentes y el cesionario.

APOSTILLA

(Convención de la Haya del 5 de octubre de 1961)

1. País: Estados Unidos de América

Este documento público

2. ha sido firmado por T. Wallace
3. actuando en capacidad de Funcionario que Certifica
4. lleva el sello/timbre de la Oficina de Marcas y Patentes de E.U.

Certificado

5. en Washington, D.C.
6. el veintiocho de noviembre de 2008
7. por el Funcionario de Autenticación Asistente, Departamento de Estado de los Estados Unidos.
8. No. 09006307-7
9. Sello/timbre

10. Firma

(Firma)

Patrick O. Hatchett

[Sello]

LOS ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA
A TODO AQUEL QUE PUEDA LLEGAR LA PRESENTE:

DEPARTAMENTO DE COMERCIO DE ESTADOS UNIDOS
Oficina de Marcas y Patentes

13 de Noviembre de 2008

LA PRESENTE CERTIFICA QUE EL ANEXO ES UNA COPIA VERDADERA
DE LOS ARCHIVOS DE ESTA OFICINA DE UN DOCUMENTO
ARCHIVADO EL 1 DE MAYO DE 2007.

Por la autoridad del
Subsecretario de Comercio para la Propiedad Intelectual
y Director de la Oficina de Marcas y Patentes de los Estados Unidos

(Firma)
T. WALLACE
Funcionario que certifica

Hay un sello que dice: :
Oficina de Marcas y Patentes de Estados Unidos
Departamento de Comercio

370

CESIÓN DE PATENTE	
Versión electrónica v1.1	
Versión de la hoja v1.1	
TIPO DE PRESENTACIÓN:	CESIÓN NUEVA
NATURALEZA DEL ACUERDO:	CESIÓN
DATOS DE LA PARTE CEDENTE	
Nombre	Fecha de ejecución
Allen J. Ebens	04/27/2007
Alane M.Gray	04/27/2007
Wei-Ching Liang	04/25/2007
Yan Wu	04/27/2007
DATOS DE LA PARTE QUE RECIBE	
Nombre:	Genentech, Inc.
Dirección:	1 DNA Way
Dirección Interna:	MS-49
Ciudad:	South San Francisco
Estado/Pais:	CALIFORNIA
Código Postal:	94080
NÚMERO DE PROPIETARIOS Total: 1	
Tipo de Propiedad	Número
Número de solicitud:	60908941
DATOS DE CORRESPONDENCIA	
Número de Fax:	(650)952-9881
La correspondencia será enviada por Correo de Estados Unidos cuando los intentos de hacerlo por fax no sean exitosos.	
Teléfono:	650 225 2066
Correo electrónico:	cmricks@gene.com
Nombre del destinatario:	Deirdre L. Conley
Dirección Línea 1:	1 DNA Way
Dirección Línea 4:	South San Francisco, CALIFORNIA 94070
NÚMERO DE EXPEDIENTE DE ABOGADO:	PR2262-1
NOMBRE DEL REMITENTE:	Deirdre L. Conley
Anexos totales: 2	
Fuente=PR2262-1Assignment#page1.tif	
500268575	PATENTE
ROLLO: 019233 CUADRO: 0730	

Fuente=PR2262-1Assignment#page2.tif

PATENTE
ROLLO: 019233 CUADRO: 0731

CESIÓN

CONSIDERANDO QUE, Allen J. Ebens, Jr., un ciudadano de los E.U.A., residente en 1932 Arroyo Ave., San Carlos, CA 94070, y Alane M. Gray, un ciudadano de los E.U.A., residente en 122 Kestrel Court, Brisbane, CA 94005, y Wei-Ching Liang, una ciudadana de Taiwan, residente en 840 Sea Spray Lane #112, Foster City, CA 94404, y Yan Wu, un ciudadano de U.S.A., residente en 846 Andromeda Lane, Foster City, CA 94404, (en adelante denominados como "CEDENTES"), han inventado una invención nueva y útil

ANTICUERPOS E INMUNOCONJUGADOS Y SUS USOS

para la cual se presentó una solicitud provisional con Serie No. 60/908,941 (Expediente No. PR2262-1) por ella el 29 de marzo de 2007; y

CONSIDERANDO QUE, GENENTECH, INC., una corporación organizada y existente bajo y por virtud de las leyes del Estado de Delaware, que tiene oficinas en 1 DNA Way, South San Francisco, California 94080-4990, está deseosa de adquirir un interés en y para dicha invención, y en y para las patentes que se obtendrán de la misma;

AHORA, POR LO TANTO, téngase por sabido por todo aquel que le concierna:

Que por una consideración buena y valiosa el recibo de la cual se reconoce por la presente, dichos CEDENTES han y por la presente venden, ceden, transfieren y traspasan a dicha GENENTECH, INC. sus sucesores y cesionarios, el derecho, título e interés completo y exclusivo incluyendo todos los derechos bajo la Convención de París para la Protección de la Propiedad Industrial, en y para dicha invención, y en y para cualquiera y todas las patentes que se concedan y emitan para la misma o cualquier continuación, división, renovación, o sustitución de la misma, y en cuanto a patentes cualquier reemisión o reexaminación de las mismas, no solo para, por y en los Estados Unidos de América, sus territorios y posesiones, sin para, por y en todos los otros países; y se ha y por la presente se autoriza y solicita que las agencias gubernamentales respectivas emitan dichas patentes a GENENTECH, INC. de acuerdo con esta cesión.

Dichos CEDENTES garantizan y acuerdan cooperar con GENENTECH, INC., para posibilitar a dicha GENENTECH, INC., a disfrutar hasta su máxima extensión el derecho, título e interés aquí cedido en Estados Unidos y los países extranjeros. Tal cooperación por dichos CEDENTES incluye la pronta producción de hechos y documentos pertinentes, dando testimonio, ejecutando peticiones, juramentos, especificaciones, declaraciones u otros documentos, y otra ayuda todas hasta el punto considerado necesario o deseable por dichas GENENTECH, INC. (a) para perfeccionar el derecho, título e interés aquí cedido; (b) para procesar cualquiera de dichas solicitudes; (c) para presentar y procesar solicitudes de reemisión de cualquiera de dichas patentes; (d) para procesos de interferencia u otros procesos de prioridad que involucren dicha invención; y (e) para procedimientos legales que involucren dicha invención y cualquier solicitud de la misma y cualquier patente concedida sobre la misma, incluyendo sin limitación procedimientos de oposición, procedimientos de cancelación, disputas de prioridad, procesos de uso público, acciones de violación y acciones de la corte; con la condición que los gastos incurridos por dichos CEDENTES al proporcionar dicha cooperación deban ser pagados por GENENTECH, INC.

Los términos y garantías de esta cesión deben actuar en beneficio de dicha GENENTECH, INC. sus sucesores, cesionarios y otros representantes legales, y deberá ser obligante sobre dichos CEDENTES, sus respectivos herederos, representantes legales y cesionarios.

PATENTE

ROLLO: 019233 CUADRO: 0732

Solicitud No. 60/908,941

Expediente No. PR2262-1

Dichos CEDENTES por la presente garantizan y manifiestan que no han entrado y no entrará en ninguna cesión, contrato o entendimiento en conflicto con la presente.

EN TESTIMONIO DE LO CUAL se suscriben como sigue:

South San Francisco
Fecha: Abril 27, 2007

(firma)
Allen Ebens

South San Francisco
Fecha: Abril 27, 2007

(firma)
Alane M. Gray

South San Francisco
Fecha: Abril 25, 2007

(firma)
Wei-Ching Liang

South San Francisco
Fecha: Abril 27, 2007

(firma)
Yan Wu

ARCHIVADO: 05/01/2007

PATENTE
ROLLO: 019233 CUADRO: 0733

372

AS:108985
(13)

APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. Country: United States of America

This public document

2. has been signed by T. Wallace

3. acting in the capacity of Certifying Officer

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

Certified

5. at Washington, D.C.

6. the twenty-eighth of November, 2008

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

8. No. 09006307-6

9. Seal/Stamp:

10. Signature:



Patrick O. Hatchett



A 7156248

THE UNITED STATES OF AMERICA

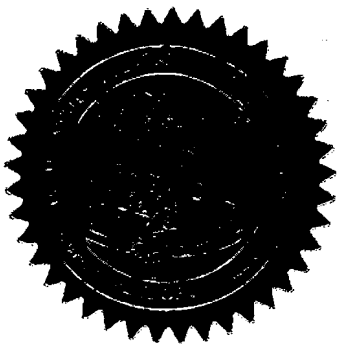
TO ALL TO WHOM THESE PRESENTS SHALL COME:

UNITED STATES DEPARTMENT OF COMMERCE
United States Patent and Trademark Office

November 13, 2008

THIS IS TO CERTIFY THAT ANNEXED IS A TRUE COPY FROM THE
RECORDS OF THIS OFFICE OF A DOCUMENT RECORDED ON
November 01, 2006.

By Authority of the
Under Secretary of Commerce for Intellectual Property
and Director of the United States Patent and Trademark Office



T. Wallace
T. WALLACE
Certifying Officer

373

PATENT ASSIGNMENT

lic Version v1.1
eet Version v1.1

MISSION TYPE: NEW ASSIGNMENT

RE OF CONVEYANCE: ASSIGNMENT

VEYING PARTY DATA

Name	Execution Date
n Ebens	10/25/2006
ine Gray	10/30/2006
ei-Ching Liang	10/23/2006
n Wu	10/23/2006

RECEIVING PARTY DATA

Name:	Genentech, Inc.
Street Address:	1 DNA Way
City:	So. San Francisco
State/Country:	CALIFORNIA
Postal Code:	94080-4990

PROPERTY NUMBERS Total: 1

Property Type	Number
Application Number:	06080932

CORRESPONDENCE DATA

Fax Number: (650)952-9881
Correspondence will be sent via US Mail when the fax attempt is unsuccessful.
Phone: 650-225-2066
Email: hebert.barbara@gene.com
Correspondent Name: Deirdre L. Conley
Address Line 1: 1 DNA Way
Address Line 2: M/S49
Address Line 4: So. San Francisco, CALIFORNIA 94080-4990

ATTORNEY DOCKET NUMBER: PR2262

NAME OF SUBMITTER: Deirdre L. Conley

500172665

PATENT
REEL: 018464 FRAME: 0050

CH \$40.00 06080932

ments: 5

2262_Assignment#page1.tif

2262_Assignment#page2.tif

2262_Assignment#page3.tif

2262_Assignment#page4.tif

2262_Assignment#page5.tif

PATENT
REEL: 018464 FRAME: 0051

374

Docket No. PR2262

ASSIGNMENT

WHEREAS, Allen Ebens, a citizen of US, residing at 1932 Arroyo Ave, San Carlos, CA 94070, and Alane Gray, a citizen of US, residing at 122 Kestrel Court, Brisbane, CA 94005, and Wei-Ching Liang, a citizen of TW, residing at 840 Sea Spray Lane #112, Foster City, CA 94404, and Yan Wu, a citizen of US, residing at 846 Andromeda Lane, Foster City, CA 94404, and , a citizen of , residing at (hereinafter "ASSIGNORS"), have invented a new and useful invention in

ANTIBODIES AND IMMUNOCONJUGATES AND USES THEREFOR

for which a provisional application Serial No. 60/809,328 (Docket No. PR2262) has been filed by them on May 30, 2006; and

WHEREAS, GENENTECH, INC., a corporation organized and existing under and by virtue of the laws of the State of Delaware, having a place of business at 1 DNA Way, South San Francisco, California 94080-4990, is desirous of acquiring an interest in and to said invention, and in and to the Letters Patents to be obtained therefor;

NOW, THEREFORE, be it known by all whom it may concern;

That for good and valuable consideration the receipt of which is hereby acknowledged, the said ASSIGNORS have and do hereby sell, assign, transfer and set over unto the said GENENTECH, INC., its successors and assigns, the full and exclusive right, title and interest including all rights under the Paris Convention for the Protection of Industrial Property, in and to said invention, and in and to any and all Letters Patents to be granted and issued therefor or any continuation, division, renewal, or substitute thereof, and as to Letters Patents any reissue or re-examination thereof, not only for, to, and in the United States of America, its territories and possessions, but for, to and in all other countries; and it has been and is hereby authorized and requested that the appropriate government agencies issue said Letters Patents to said GENENTECH, INC., in accordance with this Assignment.

Said ASSIGNORS covenant and agree to cooperate with GENENTECH, INC., to enable said GENENTECH, INC. to enjoy to the fullest extent the right, title and interest herein conveyed in the United States and foreign countries. Such cooperation by said ASSIGNORS includes prompt production of pertinent facts and documents, giving of testimony, execution of petitions, oaths, specifications, declarations or other papers, and other assistance all to the extent deemed necessary or desirable by said GENENTECH, INC., (a) for perfecting the right, title and interest herein conveyed; (b) for prosecuting any of said applications; (c) for filing and prosecuting applications for reissuance of any of said patents; (d) for interference or other priority proceedings involving said invention; and (e) for legal proceedings involving said invention and any applications therefor and any patents granted thereon, including without limitation opposition proceedings, cancellation proceedings, priority contests, public use proceedings, infringement actions and court actions; provided, however, that the expense incurred by said ASSIGNORS in providing such cooperation shall be paid for by said GENENTECH, INC.

The terms and covenants of this assignment shall inure to the benefit of said GENENTECH, INC., its successors, assigns and other legal representatives, and shall be binding upon said ASSIGNORS, their respective heirs, legal representatives and assigns.

Said ASSIGNORS hereby warrant and represent that they have not entered and will not enter into any assignment, contract, or understanding in conflict herewith.

PATENT
REEL: 018464 FRAME: 0052

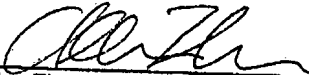
Application No. 60/809,328

Docket No. PR2262

IN WITNESS WHEREOF we undersign as follows;

South San Francisco

Dated: 10/25/2006


Allen Ebens

South San Francisco

Dated: _____

Alane Gray

South San Francisco

Dated: _____

Wei-Ching Liang

South San Francisco

Dated: _____

Yan Wu

PATENT
REEL: 018464 FRAME: 0053

374

Application No. 60/809,328

Docket No. PR2262

IN WITNESS WHEREOF we undersign as follows;

South San Francisco

Dated: _____

Allen Ebens

South San Francisco

Dated: 10.30.2006

Alane Gray
Alane Gray

South San Francisco

Dated: _____

Wei-Ching Liang

South San Francisco

Dated: _____

Yan Wu

PATENT

REEL: 018464 FRAME: 0054

Application No. 60/809,328

Docket No. PR2262

IN WITNESS WHEREOF we undersign as follows;

South San Francisco

Dated: _____

Allen Ebens

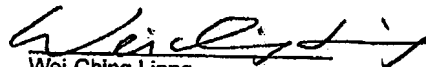
South San Francisco

Dated: _____

Alane Gray

South San Francisco

Dated: 10/23/06



Wei-Ching Liang

South San Francisco

Dated: _____

Yan Wu

PATENT
REEL: 018464 FRAME: 0055-

376

Application No. 60/809,328

Docket No. PR2262

IN WITNESS WHEREOF we undersign as follows;

South San Francisco

Dated: _____

Allen Ebens

South San Francisco

Dated: _____

Alane Gray

South San Francisco

Dated: _____

Wei-Ching Liang

South San Francisco

Dated: 10/23/2006.

Yan Wu
Yan Wu

RECORDED: 11/01/2006

PATENT
REEL: 018464 FRAME: 0056

TRADUCCIÓN AL ESPAÑOL DEL DOCUMENTO DE CESIÓN A
GENENTECH, INC firmado por los cedentes y el cesionario.

APOSTILLA
(Convención de la Haya del 5 de octubre de 1961)

1. País: Estados Unidos de América

Este documento público

2. ha sido firmado por T. Wallace
3. actuando en capacidad de Funcionario que Certifica
4. lleva el sello/timbre de la Oficina de Marcas y Patentes de E.U.

Certificado

5. en Washington, D.C.
6. el veintiocho de noviembre de 2008
7. por el Funcionario de Autenticación Asistente, Departamento de Estado de los Estados Unidos.
8. No. 09006307-6
9. Sello/timbre

10. Firma

(Firma)
Patrick O. Hatchett

[Sello]

377

LOS ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA
A TODO AQUEL QUE PUEDA LLEGAR LA PRESENTE:

DEPARTAMENTO DE COMERCIO DE ESTADOS UNIDOS
Oficina de Marcas y Patentes

13 de Noviembre de 2008

LA PRESENTE CERTIFICA QUE EL ANEXO ES UNA COPIA VERDADERA
DE LOS ARCHIVOS DE ESTA OFICINA DE UN DOCUMENTO
ARCHIVADO EL 1 DE NOVIEMBRE DE 2006.

Por la autoridad del
Subsecretario de Comercio para la Propiedad Intelectual
y Director de la Oficina de Marcas y Patentes de los Estados Unidos

(Firma)
T. WALLACE
Funcionario que certifica

Hay un sello que dice::
Oficina de Marcas y Patentes de Estados Unidos
Departamento de Comercio

CESIÓN DE PATENTE

Versión electrónica v1.1

Versión de la hoja v1.1

TIPO DE PRESENTACIÓN:	CESIÓN NUEVA
NATURALEZA DEL ACUERDO:	CESIÓN

DATOS DE LA PARTE CEDENTE

Nombre	Fecha de ejecución
Allen Ebens	10/25/2006
Alane Gray	10/30/2006
Wei-Ching Liang	10/23/2006
Yan Wu	10/23/2006

DATOS DE LA PARTE QUE RECIBE

Nombre:	Genentech, Inc.
Dirección:	1 DNA Way
Dirección Interna:	MS-49
Ciudad:	South San Francisco
Estado/Pais:	CALIFORNIA
Código Postal:	94080

NÚMERO DE PROPIETARIOS Total: 1

Tipo de Propiedad	Número
Número de solicitud:	06080932

DATOS DE CORRESPONDENCIA

Número de Fax: (650)952-9881

La correspondencia será enviada por Correo de Estados Unidos cuando los intentos de hacerlo por fax no sean exitosos.

Teléfono: 650 225 2066

Correo electrónico: hebert.barbara@gene.com

Nombre del destinatario: Deirdre L. Conley

Dirección Línea 1: 1 DNA Way

Dirección Línea 2: MS49

Dirección Línea 4: South San Francisco, CALIFORNIA 94080-4990

NÚMERO DE EXPEDIENTE DE ABOGADO:	PR2262
NOMBRE DEL REMITENTE:	Deirdre L. Conley

500172665

PATENTE

ROLLO: 018464 CUADRO: 0050

378

Anexos totales: 5 Fuente=PR2262_Assignmēt#page1.tif Fuente=PR2262_Assignmēt#page2.tif Fuente=PR2262_Assignmēt#page3.tif Fuente=PR2262_Assignmēt#page4.tif Fuente=PR2262_Assignmēt#page5.tif

PATENTE
ROLLO: 018464 CUADRO: 0051

CESIÓN

CONSIDERANDO QUE, Allen Ebens, un ciudadano de los E.U.A., residente en 1932 Arroyo Ave., San Carlos, CA 94070, y Alane Gray, un ciudadano de los E.U.A., residente en 122 Kestrel Court, Brisbane, CA 94005, y Wei-Ching Liang, una ciudadana de Taiwan, residente en 840 Sea Spray Lane #112, Foster City, CA 94404, y Yan Wu, un ciudadano de U.S.A., residente en 846 Andromeda Lane, Foster City, CA 94404, (en adelante denominados como "CEDENTES"), han inventado una invención nueva y útil

ANTICUERPOS E INMUNOCONJUGADOS Y SUS USOS

para la cual se presentó una solicitud provisional con Serie No. 60/809,328 (Expediente No. PR2262) por ella el 30 de mayo de 2006; y

CONSIDERANDO QUE, GENENTECH, INC., una corporación organizada y existente bajo y por virtud de las leyes del Estado de Delaware, que tiene oficinas en 1 DNA Way, South San Francisco, California 94080-4990, está deseosa de adquirir un interés en y para dicha invención, y en y para las patentes que se obtendrán de la misma;

AHORA, POR LO TANTO, téngase por sabido por todo aquel que le concierna:

Que por una consideración buena y valiosa el recibo de la cual se reconoce por la presente, dichos CEDENTES han y por la presente venden, ceden, transfieren y traspasan a dicha GENENTECH, INC. sus sucesores y cesionarios, el derecho, título e interés completo y exclusivo incluyendo todos los derechos bajo la Convención de París para la Protección de la Propiedad Industrial, en y para dicha invención, y en y para cualquiera y todas las patentes que se concedan y emitan para la misma o cualquier continuación, división, renovación, o sustitución de la misma, y en cuanto a patentes cualquier reemisión o reexaminación de las mismas, no solo para, por y en los Estados Unidos de América, sus territorios y posesiones, sin para, por y en todos los otros países; y se ha y por la presente se autoriza y solicita que las agencias gubernamentales respectivas emitan dichas patentes a GENENTECH, INC. de acuerdo con esta cesión.

Dichos CEDENTES garantizan y acuerdan cooperar con GENENTECH, INC., para posibilitar a dicha GENENTECH, INC., a disfrutar hasta su máxima extensión el derecho, título e interés aquí cedido en Estados Unidos y los países extranjeros. Tal cooperación por dichos CEDENTES incluye la pronta producción de hechos y documentos pertinentes, dando testimonio, ejecutando peticiones, juramentos, especificaciones, declaraciones u otros documentos, y otra ayuda todas hasta el punto considerado necesario o deseable por dichas GENENTECH, INC. (a) para perfeccionar el derecho, título e interés aquí cedido; (b) para procesar cualquiera de dichas solicitudes; (c) para presentar y procesar solicitudes de reemisión de cualquiera de dichas patentes; (d) para procesos de interferencia u otros procesos de prioridad que involucren dicha invención; y (e) para procedimientos legales que involucren dicha invención y cualquier solicitud de la misma y cualquier patente concedida sobre la misma, incluyendo sin limitación procedimientos de oposición, procedimientos de cancelación, disputas de prioridad, procesos de uso público, acciones de violación y acciones de la corte; con la condición que los gastos incurridos por dichos CEDENTES al proporcionar dicha cooperación deban ser pagados por GENENTECH, INC.

Los términos y garantías de esta cesión deben actuar en beneficio de dicha GENENTECH, INC. sus sucesores, cesionarios y otros representantes legales, y deberá ser obligante sobre dichos CEDENTES, sus respectivos herederos, representantes legales y cesionarios.

Dichos CEDENTES por la presente garantizan y manifiestan que no han entrado y no entrará en ninguna cesión, contrato o entendimiento en conflicto con la presente.

PATENTE
ROLLO: 018464 CUADRO: 0052

979

Solicitud No. 60/809,328

Expediente No. PR2262

EN TESTIMONIO DE LO CUAL se suscriben como sigue:

South San Francisco
Fecha: Octubre 25, 2006

(firma)
Allen Ebens

South San Francisco
Fecha: _____

Alane Gray

South San Francisco
Fecha: _____

Wei-Ching Liang

South San Francisco
Fecha: _____

Yan Wu

PATENTE
ROLLO: 018464 CUADRO: 0053

Solicitud No. 60/809,328

Expediente No. PR2262

EN TESTIMONIO DE LO CUAL se suscriben como sigue:

South San Francisco

Fecha: _____

Allen Ebens

South San Francisco

Fecha: October 30, 2006

(firma)
Alane Gray

South San Francisco

Fecha: _____

Wei-Ching Liang

South San Francisco

Fecha: _____

Yan Wu

PATENTE
ROLLO: 018464 CUADRO: 0054

380

Solicitud No. 60/809,328

Expediente No. PR2262

EN TESTIMONIO DE LO CUAL se susciben como sigue:

South San Francisco
Fecha: _____

Allen Ebens

South San Francisco
Fecha: _____

Alane Gray

South San Francisco
Fecha: Octobre 23, 2006

(firma)
Wei-Ching Liang

South San Francisco
Fecha: _____

Yan Wu

PATENTE
ROLLO: 018464 CUADRO: 0055-

Solicitud No. 60/809,328

Expediente No. PR2262

EN TESTIMONIO DE LO CUAL se suscriben como sigue:

South San Francisco

Fecha: _____

Allen Ebens

South San Francisco

Fecha: _____

Alane Gray

South San Francisco

Fecha: _____

Wei-Ching Liang

South San Francisco

Fecha: Octobre 23, 2006

(firma)

Yan Wu

ARCHIVADO: 11/01/2006

PATENTE
ROLLO: 018464 CUADRO: 0056