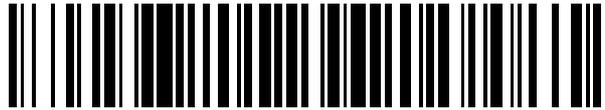


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 523 502**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/28**

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.09.2010 E 10762632 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.08.2014 EP 2480574**

54 Título: **Anticuerpos anti-CD33 y su aplicación para el inmunotargeting en el tratamiento de enfermedades asociadas a CD33**

30 Prioridad:

**25.09.2009 DE 102009045006**

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

**26.11.2014**

73 Titular/es:

**GEMOAB MONOCLONALS GMBH (100.0%)  
Fiedlerstrasse 36  
01307 Dresden, DE**

72 Inventor/es:

**BACHMANN, MICHAEL y  
STAMOVA, SLAVA**

74 Agente/Representante:

**ARPE FERNÁNDEZ, Manuel**

**ES 2 523 502 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Anticuerpos anti-CD33 y su aplicación para el immunotargeting en el tratamiento de enfermedades asociadas a CD33.

5 **[0001]** La invención se refiere a anticuerpos contra el antígeno asociado a tumores CD33 y a su aplicación para el *immunotargeting* de células positivas para CD33. Los anticuerpos según la invención son adecuados para la aplicación en el campo de la medicina, la farmacia y la investigación biomédica.

10 **[0002]** El cáncer (neoplasia maligna) es una clase de enfermedad en la que un grupo de células se distingue por una división celular incontrolada, por una invasión y destrucción de tejidos contiguos y a veces por una metastatización. Estas características malignas del cáncer lo diferencian de los tumores benignos, que, si bien desplazan con su crecimiento el tejido adyacente, no se infiltran en éste y no metastatizan. La mayoría de los tipos de cáncer forman tumores, pero algunos no, como las leucemias, que afectan al sistema hematopoyético. En el sentido de la invención, el término 'cáncer' designa tanto tumores malignos como hemoblastosis.

15 **[0003]** En las células cancerosas está inactivada la armonización de crecimiento, división y destrucción en el complejo celular. Surgen cuando se alteran determinados genes y estas alteraciones ya no pueden repararse, lo que lleva a la falta de funcionalidad de determinadas zonas de los genes, de manera que las células cancerosas se estimulan a sí mismas a dividirse e ignoran las señales inhibitoras del crecimiento procedentes del entorno de la célula.

20 **[0004]** El sistema inmunitario intenta fundamentalmente combatir las células que crecen de manera incontrolada. Un problema para ello es el hecho de que las células cancerosas son en muchos aspectos iguales que las células normales del cuerpo, ya que proceden de las mismas. Por lo tanto, en la mayoría de los casos las medidas de defensa del sistema inmunitario son insuficientes para controlar el crecimiento del tumor.

25 **[0005]** En la leucemia mieloide aguda (LMA) se ve afectada la mielopoyesis, o sea la parte del sistema hematopoyético responsable de la formación de granulocitos y monocitos. En la hematopoyesis, los mieloblastos representan una etapa previa inmadura de los leucocitos mieloides. En la LMA, diversas alteraciones genéticas que afectan a los genes relevantes para la división celular tienen como resultado un mieloblasto individual para la formación de una célula que permanece en un estado inmaduro y se multiplica masivamente. Esta multiplicación de las etapas previas inmaduras en la médula ósea y también en la sangre caracteriza la LMA.

30 **[0006]** Las alteraciones pueden producirse en una serie de diferentes puntos del ciclo celular, de manera que la LMA presenta distintas características fenotípicas, genotípicas y clínicas. La clasificación moderna de la LMA se basa en la tesis de que las características y el comportamiento de las células tumorales dependen de en qué etapa del ciclo celular se ha detenido la proliferación. En muchos pacientes de LMA pueden detectarse determinadas características citogenéticas específicas distintivas que, a menudo, son significativas en cuanto al pronóstico. Las alteraciones genéticas codifican proteínas de fusión anormales, en la mayoría de los casos factores de transcripción, que causan la proliferación incontrolada.

35 **[0007]** Las células tumorales se diferencian de las células sanas en la expresión de antígenos tumorales, o sea de proteínas que expresan sólo las células tumorales. Éstas se forman como consecuencia del genoma alterado en las células cancerosas, o a causa de una expresión genética alterada. Los antígenos tumorales se hallan en la membrana celular exterior de las células tumorales, en el plasma celular y en el núcleo celular. Los antígenos tumorales son, como estructura diana, la base de la mayoría de los conceptos de la inmunoterapia del cáncer. Hasta 40 la fecha se conocen más de 2.000 antígenos tumorales.

45 **[0008]** Como diana para la terapia del cáncer resultan ideales los antígenos específicos de tumores (TSA), o sea antígenos que son producidos sólo por células cancerosas y no por células sanas. Sin embargo, la mayoría de los antígenos tumorales no son específicos de tumores, sino asociados a tumores (TAA), es decir que son expresados también por células sanas. No obstante, en muchos tumores los antígenos tumorales están sobre-expresados. Debido a mutaciones en el genoma pueden aparecer también alteraciones estructurales en la secuencia de proteínas. Muchos antígenos tumorales aparecen sólo en determinados tipos de tumor y, dentro de éstos, frecuentemente incluso sólo en determinados casos.

50 **[0009]** Los antígenos tumorales presentes en la LMA comprenden, entre otros, TAA asociados a una serie de otras enfermedades tumorales, como por ejemplo la telomerasa transcriptasa inversa, la proteína del tumor de Wilms 1 (WT1) y la survivina. Además se conocen también TAA asociados a otras enfermedades leucémicas, como el CD168 y la fosfoproteína de fase M. También existen TAA que aparecen especialmente en conexión con la LMA, como el CD33, el CD45 y los mHAGs (*minor histocompatibility antigens*).

55 **[0010]** El CD33 es una proteína transmembrana glicosilada compuesta de 364 aminoácidos, que pertenece a la familia de las lectinas similares a Ig de unión a ácido siálico (SIGLECs). Se expresa también en células precursoras hematopoyéticas en fase temprana, precursores mielomonocíticos y células mieloides, mientras que no está presente en células madre de la médula ósea pluripotentes normales. Aproximadamente de un 85 a un 90% de los

pacientes de LMA dan positivo para CD33. Por lo tanto, el CD33 constituye una diana particularmente atractiva para una inmunoterapia y se utiliza ya como diana en una inmunoterapia dirigida.

5 [0011] La terapia convencional de la LMA es una quimioterapia para la inducción de una remisión, a la que pueden seguir otras quimioterapias o el trasplante de células madre hematopoyéticas. En los Estados Unidos se conjugó en el año 2000 un anticuerpo monoclonal con un citostático, gemtuzumab ozogamicina, para pacientes con LMA recidivante que no son candidatos para la quimioterapia estándar.

10 [0012] Los anticuerpos son proteínas de la clase de las globulinas, que en los vertebrados se forman como reacción a determinadas sustancias, los antígenos. En la lucha contra las células cancerosas, los anticuerpos policlonales endógenos desempeñan sólo un papel muy pequeño. Esto es debido a que la mayoría de las células tumorales no presentan antígenos suficientemente alterados que sean reconocidos como extraños por el propio sistema inmunitario, de manera que los anticuerpos endógenos no se enlazan a las células tumorales en cantidad suficiente. Los anticuerpos monoclonales son completamente idénticos en su estructura y están dirigidos sólo contra un epítipo de un antígeno.

15 [0013] Los anticuerpos monoclonales empleados para la terapia del cáncer actúan casi exclusivamente a través de la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (antibody dependent cellular cytotoxicity, ADCC). En este caso, los anticuerpos reclutan mediante su parte Fc células efectoras citotóxicas, como por ejemplo células NK, macrófagos, linfocitos o granulocitos, que no presentan por sí mismas ninguna especificidad antigénica, con respecto a la célula tumoral. El daño producido directamente en la célula por anticuerpos monoclonales ligados, como el desencadenamiento de determinadas cascadas de señales intracelulares que inician la apoptosis por la reticulación cruzada de los antígenos tumorales debido a la unión del anticuerpo, es una rara excepción.

20 [0014] Para reforzar el efecto de los anticuerpos monoclonales en las enfermedades cancerosas se han desarrollado distintas estrategias de vectorización de medicamentos (*drug targeting*), con el fin de utilizar los anticuerpos como portadores de principios activos más potentes, los así llamados inmunoconjugados o derivados de anticuerpos. Para ello se han ligado (conjugado) a los anticuerpos correspondientes principios activos como radionúclidos, toxinas (por ejemplo la toxina diftérica), citoquinas o también citostáticos.

25 [0015] En principio es posible ligar a anticuerpos principios activos de gran potencia, que en caso de una administración sistémica libre causarían efectos colaterales injustificables debido a su toxicidad. Los derivados de anticuerpos constan de tres componentes: un anticuerpo o fragmento de anticuerpo, un principio activo y un elemento de unión (*linker*) entre el anticuerpo y el principio activo.

30 [0016] El documento WO 2004/043344 A2 da a conocer el anticuerpo anti-CD33 "My9-6" y procedimientos para el tratamiento de la leucemia mieloide aguda (LMA) empleando este anticuerpo. Se revela que el anti-CD33 para el uso terapéutico se halla preferentemente en forma alterada. Así, se dan a conocer derivados de anticuerpos humanizados o sólo los fragmentos de unión a epítipo del anticuerpo My9-6. Además se revela que el anticuerpo My9-6 puede estar conjugado con una sustancia terapéuticamente activa.

35 [0017] El primer anticuerpo dirigido contra CD33 sometido a estudios clínicos es M195 (US 5.730.982, EP1656950 A1). La variante humanizada de este anticuerpo del isotipo IgG1, también conocida por el nombre de lintuzumab, se ensayó en estudios clínicos, no pudiendo constatarse sin embargo en la fase III ninguna ventaja del lintuzumab combinado con quimioterapia en comparación con la quimioterapia sola (E. J. Feldman et. al., Phase III Randomized Multicenter Study of a Humanized Anti-CD33 Monoclonal Antibody, Lintuzumab, in Combination With Chemotherapy, Versus Chemotherapy Alone in Patients With Refractory or First-Relapsed Acute Myeloid Leukemia. J. Clin. Oncol. 23 (18), 2005, pág. 4110-4116).

40 [0018] El gemtuzumab ozogamicina es un inmunoconjugado de un anticuerpo monoclonal dirigido contra CD33 del tipo IgG4, que se empleó hasta el 2010 en los EE.UU. para el tratamiento de la LMA, pero que entretanto se ha retirado del mercado. Consta de un anticuerpo monoclonal humanizado contra CD33, que está conjugado con un citostático: calicheamicina. El mecanismo de acción se basa en la endocitosis del derivado de anticuerpo, de manera que el citostático acoplado al mismo puede desarrollar su efecto tóxico tras la absorción en la célula (Walter R et al. Blood. 105 (3), 2005, pág. 1295-1302). En Europa no se aprobó el gemtuzumab ozogamicina, ya que, en opinión de las autoridades reguladoras europeas EMEA, la eficacia no está suficientemente probada.

45 [0019] La tabla siguiente muestra las secuencias de aminoácidos de las CDR (complementarity determining regions [regiones determinantes de complementariedad] , los sitios de unión a antígeno de un anticuerpo) del anticuerpo anti-CD33 conocido por los documentos correspondientes:

Documento	V <sub>H</sub> CDR1	SEQ ID n°	V <sub>H</sub> CDR2	SEQ ID n°	V <sub>H</sub> CDR3	SEQ ID n°
US 7.557.189	SYIYH	37	VIYPGNDDISYNQKFXG	38	EVLRYFDV	39
US 5.730.982	DYNMH	43	YIYPYNGGTGYNQKFKS	44	GRPAMDY	45
CN101210048	DYNMY	49	YIDPYKGGTIYNQKFKG	50	QMITAYYFDY	51
	V <sub>L</sub> CDR1		V <sub>L</sub> CDR2		V <sub>L</sub> CDR3	
US 7.557.189	KSSQSVFFSSQKNYLA	40	WASTRES	41	HQYLSSRT	42
US 5.730.982	RASEVDNYGISFMN	46	ASNQGS	47	QQSKEVPWT	48
CN101210048	KASQDINKYIA	52	TSTLQP	53	LQYDNLTT	54

- 5 [0020] Una problemática general para la eficacia terapéutica de los anticuerpos monoclonales es la capacidad de enlace de los anticuerpos a las células cancerosas, o sea la afinidad de los anticuerpos. Incluso en las células cancerosas que presentan suficientes antígenos tumorales, la tasa de enlace es con frecuencia insuficientemente alta. Con una masa molecular de aproximadamente 150 kDa, los anticuerpos están además por lo general limitados en su penetración en los tejidos. En este caso, los fragmentos de anticuerpo, como Fab, F(ab)<sub>2</sub> o scFv (single chain variable fragments [fragmentos variables de cadena sencilla]) tienen considerables ventajas debido a su tamaño ostensiblemente menor.
- 10 [0021] Los anticuerpos biespecíficos, o sea derivados de anticuerpos que constan de componentes de dos anticuerpos monoclonales diferentes, ofrecen nuevas posibilidades para conceptos terapéuticos en la inmunoterapia del cáncer.
- 15 [0022] Los *quadroma* son anticuerpos biespecíficos de la primera generación y constan respectivamente de una cadena pesada y una cadena ligera de dos anticuerpos monoclonales distintos. Los dos brazos del anticuerpo están dirigidos contra, respectivos, antígenos diferentes. La parte Fc se forma conjuntamente a partir de las dos cadenas pesadas del anticuerpo. Mediante esta estructura es posible, por ejemplo, colocar el paratopo de un anticuerpo dirigido contra un antígeno tumoral y el paratopo de otro anticuerpo dirigido contra un antígeno linfocitario en, respectivamente, un brazo del anticuerpo biespecífico. De este modo es posible formar un complejo tricelular, que resulta de las células enlazadas en cada caso por los distintos paratopos y la célula efectora enlazada a la parte Fc. Por regla general se logra así una activación mejorada de los linfocitos endógenos frente a las células tumorales.
- 20 [0023] Los anticuerpos biespecíficos de última generación están contruidos a partir de dos fragmentos scFv distintos. Éstos están unidos entre sí con un conector (*linker*). De este modo, un anticuerpo biespecífico puede, por ejemplo, enlazarse con un scFv a células tumorales y con el otro scFv a células efectoras.
- 25 [0024] Si se dirige un paratopo contra células T, también pueden activarse estas células. Con los anticuerpos monoclonales normales esto no es posible, ya que las células T no disponen de receptores Fc. Los anticuerpos biespecíficos presentan además un mayor potencial citotóxico. Se enlazan también a antígenos que se expresan de manera relativamente débil.
- [0025] Hasta la fecha no se ha aprobado ningún anticuerpo biespecífico para la aplicación clínica en humanos.
- [0026] Se conocen anticuerpos biespecíficos en los que un scFv se enlaza al complejo CD3 en células T, que se denominan también BiTE (bispecific T-cell engager [enlazador de células T biespecífico]) (P. A. Baeuerle et. al., BiTE: Teaching antibodies to engage T cells for cancer therapy. *Curr Opin Mol Ther* 11, 2009, pág. 22-30).
- 30 [0027] De momento se hallan en estudio clínico dos anticuerpos BiTE distintos. El blinatumomab, un anticuerpo dirigido contra CD3 y CD19, se ensaya en pacientes en fases tardías del linfoma no Hodgkiniano y en pacientes con leucemia linfoblástica aguda de la línea celular B (B-ALL). El MT110 es un anticuerpo que está dirigido contra CD3 y EpCAM (epithelial cell adhesion molecule [molécula de adhesión de célula epitelial]) y se ensaya en pacientes con carcinoma bronquial y pacientes con enfermedades cancerosas gastrointestinales (R. Bargou et. al., Tumor regression in cancer patients by very low doses of a T cell-engaging antibody. *Science* 321, 2008, pág. 974-977; K. Brischwein et.al., MT110: a novel bispecific single-chain antibody construct with high efficacy in eradicating established tumors. *Mol Immunol* 43, 2006, pág. 1129-1143).
- 35 [0028] No todos los anticuerpos monoclonales son adecuados en forma de fragmentos scFv o para la construcción de estructuras biespecíficas. Aquí es especialmente decisiva la afinidad de los anticuerpos, que está determinada por las regiones variables. Como fragmentos scFv resultan adecuados sólo los anticuerpos de muy alta afinidad, ya que el enlace al antígeno respectivo se realiza sólo con un par de regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras, al contrario que en los anticuerpos IgG completos, que tienen dos pares de regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras.
- 40 [0029] Existe una necesidad de nuevos conceptos terapéuticos para el tratamiento de la LMA y otros carcinomas. Los anticuerpos conocidos hasta la fecha tienen una afinidad demasiado baja con respecto a los antígenos asociados a tumores, como el CD33, para poder emplearse con fines terapéuticos. Por consiguiente, existe la necesidad de desarrollar anticuerpos específicos para antígenos asociados a tumores, por ejemplo CD33, que tengan una alta afinidad y por lo tanto sean adecuados para su uso en la terapia del cáncer.
- 45 [0030] El objetivo de la invención es por tanto la puesta a disposición de nuevos anticuerpos anti-CD33, especialmente con una gran afinidad con respecto a CD33, que permita utilizar los anticuerpos como fragmentos recombinantes para el *immunotargeting*.
- 50 [0031] Según la invención, el objetivo se consigue mediante nuevos anticuerpos anti-CD33 que contienen regiones determinantes de complementariedad (complementarity determining regions, CDR) y que están caracterizados porque las CDR de la región variable de la cadena pesada (V<sub>H</sub>) comprenden las siguientes secuencias:
- 55 CDR1 DYVVH (SEQ ID n° 01),

CDR2 YINPYNDGTTYNEKFKG (SEQ ID nº 02),

CDR3 DYRYEVYGMDDY (SEQ ID nº 03),

y porque las CDR de la región variable de la cadena ligera ( $V_L$ ) comprenden las siguientes secuencias:

CDR1 TASSSVNYIH (SEQ ID nº 04),

5 CDR2 TSKVAS (SEQ ID nº 05),

CDR3 QQWRSYPLT (SEQ ID nº 06).

**[0032]** Los anticuerpos anti-CD33 según la invención, también denominados aquí "anti-CD33DRB2", están caracterizados en sus secuencias de aminoácidos de las cadenas pesadas y las cadenas ligeras, sus CDR y en métodos para la expresión del anticuerpo en forma recombinante.

10 **[0033]** Los anticuerpos anti-CD33DRB2 están además caracterizados funcionalmente y se ha demostrado que se distinguen por una alta afinidad con el CD33 humano (figura 3). Por consiguiente, los anticuerpos según la invención presentan ventajosamente una alta afinidad con el CD33 humano. Las afinidades de los anticuerpos nativos son del orden de  $10^{-10}$  moles/l. Las afinidades de los derivados recombinantes alcanzan  $10^{-7}$  a  $10^{-8}$  moles/l. Se ha podido demostrar que, en su mayoría, los anticuerpos no son absorbidos en las células positivas para CD33 a través de una  
15 endocitosis y permanecen en la superficie celular un largo espacio de tiempo. Esto los hace especialmente adecuados para un uso terapéutico con el fin de un *immunotargeting* de células efectoras en células positivas para CD33. Gracias a la alta afinidad, las secuencias CDR según la invención resultan particularmente adecuadas para producir fragmentos recombinantes (como scFv) y para el *immunotargeting*.

20 **[0034]** En el sentido según la invención, el término "anticuerpo" comprende todos los anticuerpos, fragmentos de anticuerpo y derivados de los mismos que son capaces de enlazarse al antígeno, en este caso CD33, y presentan las CDR según la invención completas. Entre éstos se incluyen los anticuerpos monoclonales completos y también los fragmentos de unión a epítipo de estos anticuerpos. Los fragmentos de unión a epítipo (también denominados aquí fragmentos de anticuerpo o derivados de anticuerpos) comprenden todas las partes del anticuerpo capaces de enlazarse al antígeno, en este caso CD33. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo preferidos según la invención incluyen, pero de modo expreso no están limitados a, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fd, fragmentos variables de cadena sencilla (*single-chain*) (scFv), anticuerpos de cadena sencilla, fragmentos variables con enlace de disulfuro (sdFv) y fragmentos que contienen bien una región variable de la cadena ligera ( $V_L$ ) o bien una región variable de la cadena pesada ( $V_H$ ). Se incluyen además anticuerpos de producción recombinante, como *diabodies*, *triabodies* y *tetrabodies*.

30 **[0035]** El anticuerpo lleva preferentemente una molécula marcadora, como por ejemplo biotina, dioxigenina, un radionúclido o un colorante fluorescente. Con especial preferencia, el anticuerpo está conjugado con un grupo efector.

35 **[0036]** Los fragmentos de anticuerpo contienen las regiones variables bien solas o bien en combinación con otras regiones, seleccionadas entre la región bisagra y la primera, segunda y tercera zona de la región constante ( $C_{H1}$ ,  $C_{H2}$ ,  $C_{H3}$ ). También están comprendidos en el término "anticuerpo" los anticuerpos quiméricos, en los que distintas partes del anticuerpo proceden de diferentes especies, como por ejemplo anticuerpos con una región variable murina combinada con una región constante humana.

40 **[0037]** Los fragmentos de anticuerpo están en caso dado enlazados entre sí mediante un conector (*linker*). El conector comprende una secuencia de péptidos flexible y corta (preferentemente de 10 a 20 residuos de aminoácido de longitud), que se elige de manera que el fragmento de anticuerpo tenga un plegamiento tridimensional de  $V_L$  y  $V_H$  tal que presente la especificidad antigénica del anticuerpo completo. Los conectores preferidos, pero no exclusivamente, son un conector de glicina-serina con la estructura (Gly<sub>x</sub>Ser)<sub>y</sub>, con x e y seleccionadas entre 1 a 10, preferentemente 3 a 5. Además se prefieren conectores consistentes en una secuencia de péptidos, que pueden aumentar la resistencia a la proteasa de los derivados de anticuerpos.

45 **[0038]** La designación "región variable" se define según la invención como las partes de las cadenas pesadas y ligeras de los anticuerpos que se diferencian en su secuencia entre anticuerpos y que determinan la especificidad del anticuerpo y el enlace a su antígeno. La variabilidad no está aquí distribuida uniformemente en la región variable. Habitualmente se concentra dentro de tres segmentos definidos de la región variable, que se denominan regiones determinantes de complementariedad (CDR) o también regiones hipervariables y que están presentes en las  
50 regiones variables tanto de las cadenas ligeras como de las pesadas. Las partes más conservadas de las regiones variables se denominan regiones marco (*framework regions*). Las regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras contienen cuatro regiones marco, que en su mayoría adoptan una estructura de hoja plegada beta, estando cada región marco unida a tres CDR que forman bucles que unen las estructuras de hoja plegada beta y, en algunos casos, forman parte de la estructura de hoja plegada beta. Las CDR de la cadena respectiva se llevan a una cercanía inmediata mediante las regiones marco y, junto con las CDR de la otra cadena, contribuyen a la formación  
55 de la región de unión a antígeno de los anticuerpos.

**[0039]** La región constante (Fc) de los anticuerpos no participa en la unión a antígeno, sino que en lugar de ello ofrece múltiples funciones de efector que se disparan mediante el enlace a los receptores de unión a Fc correspondientes, como por ejemplo la inducción de la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC).

5 **[0040]** Los anticuerpos según la invención comprenden preferentemente al menos una región variable de la cadena pesada (V<sub>H</sub>) y una región variable de la cadena ligera (V<sub>L</sub>) en forma de un scFv. Al mismo tiempo, la región variable de la cadena pesada (V<sub>H</sub>) y la región variable de la cadena ligera (V<sub>L</sub>) contienen respectivamente, al menos, una de las secuencias de CDR según la invención.

**[0041]** Según la invención se prefieren anticuerpos que contienen las siguientes estructuras, en caso dado humanizadas:

10 - una región variable de la cadena pesada según la secuencia SEQ ID n° 13 y una región variable de la cadena ligera según la secuencia SEQ ID n° 14.

15 **[0042]** En los anticuerpos, determinados aminoácidos de las secuencias de aminoácidos específicas pueden estar intercambiados de tal manera que conserven las propiedades de unión del anticuerpo CD33, pero que se diferencien en su secuencia mediante intercambio, delección o adición de uno o varios aminoácidos. Por consiguiente, se describen también anticuerpos que contienen estructuras cuyas secuencias de aminoácidos presentan, con respecto a las secuencias de aminoácidos según la invención de las regiones variables según SEQ ID n° 13 y 14, una identidad de secuencia de preferentemente al menos un 70%, con especial preferencia, al menos, un 80% y particularmente, al menos, un 90% y que enlazan el antígeno CD33, presentando estas secuencias, al menos, una de las CDR según la invención de acuerdo con SEQ ID n° 1 a 6.

20 **[0043]** En configuraciones especiales de la invención, el anticuerpo comprende las siguientes estructuras:

- una región variable de la cadena pesada con la secuencia según SEQ ID n° 13 y una región variable de la cadena ligera con la secuencia según SEQ ID n° 14; y

- una región constante de una cadena pesada de una IgG humana,

- una región C<sub>L</sub> de la cadena ligera kappa humana

25 - y una región bisagra IgG3 humana.

**[0044]** En caso dado, el anticuerpo se presenta en forma de un fragmento F(ab')<sub>2</sub>.

30 **[0045]** En una configuración particularmente preferida de la invención, se utilizan anticuerpos en forma de fragmentos scFv que comprenden, al menos, una región variable de la cadena pesada (V<sub>H</sub>) y una región variable de la cadena ligera (V<sub>L</sub>), que contienen las regiones CDR según la invención. Además se prefieren especialmente los anticuerpos en forma de fragmentos scFv que comprenden, al menos, una de las regiones variables según la invención de la cadena pesada y de la cadena ligera.

**[0046]** La invención comprende anticuerpos anti-CD33 murinos y versiones humanizadas de estos anticuerpos.

35 **[0047]** El objetivo de la humanización de anticuerpos consiste en la reducción de la inmunogenicidad de un anticuerpo xenógeno, como en este caso del anticuerpo murino, para la utilización en el sistema humano, conservándose toda la afinidad de unión y la especificidad antigénica. Los anticuerpos humanizados pueden producirse por distintos métodos, como por ejemplo mediante *resurfacing* (remodelación de superficie) e injerto de CDR. En el *resurfacing* se modifican, mediante una combinación de modelización molecular (*molecular modelling*), análisis estadísticos y mutagénesis, todas las regiones no CDR de la superficie del anticuerpo, de manera que éstas se asemejen a la superficie de anticuerpos del organismo diana. En el injerto de CDR se introducen las regiones CDR según la invención en regiones variables humanas.

40

**[0048]** Los anticuerpos humanizados que contienen las regiones CDR según la invención forman expresamente parte de la invención.

45 **[0049]** También forman parte de la invención anticuerpos conjugados con un grupo efector. Aquí debe entenderse por conjugación el acoplamiento de una sustancia a un anticuerpo. La unión del anticuerpo al grupo efector se produce preferentemente mediante una expresión como proteína de fusión o mediante métodos *in vitro*, enlazándose el grupo efector al anticuerpo preferentemente mediante grupos conectores (por ejemplo mediante enlaces tioéter o enlaces disulfuro). También pueden estar unidos al anticuerpo mediante una molécula portadora intermedia, por ejemplo albúmina sérica. En caso dado, un anticuerpo contiene también varios grupos efectores.

50 **[0050]** Los grupos efectores son aquí preferentemente sustancias farmacológicamente activas (principios activos). Los principios activos preferidos comprenden, pero no están limitados a, toxinas, como citostáticos, por ejemplo maitansinoides y análogos de maitansinoide, taxoides, CC-1065 y análogos de CC-1065, dolastatina y análogos de dolastatina, metotrexato, daunorrubicina, doxorubicina, vincristina, vinblastina, melfalán, mitomicina C, clorambucil y calicheamicina. La invención comprende también anticuerpos conjugados con radionúclidos como grupos efectores

y su utilización para la terapia y la diagnosis, especialmente de tumores. Los radionúclidos adecuados son preferentemente los isótopos radioactivos de tecnecio, renio, itrio, cobre, galio, indio, bismuto y platino, como por ejemplo  $^{99m}\text{Tc}$ ,  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{186}\text{Re}$ ,  $^{188}\text{Re}$ ,  $^{68}\text{Ga}$  y  $^{111}\text{In}$ .

5 **[0051]** Los grupos efectores según la invención comprenden además enzimas (especialmente enzimas adecuadas para el sistema ADEPT), moléculas co-estimulantes (por ejemplo CpG) o también ácidos nucleicos. El anticuerpo conjugado con un grupo efector puede presentarse en caso dado en forma de una proteína de fusión.

10 **[0052]** También forman parte de la invención anticuerpos conjugados con otro anticuerpo o fragmento de anticuerpo, dirigido contra un antígeno distinto de CD33. En este caso, el anticuerpo es un anticuerpo biespecífico. El anticuerpo es preferentemente un *single chain bispecific diabody* (scBsDb) (*diabody* biespecífico de cadena sencilla). En este caso, dos fragmentos scFv están unidos entre sí mediante un conector corto (preferentemente de 10 a 20 residuos de aminoácido de longitud). El anticuerpo es con especial preferencia un *single chain bispecific tandem antibody* (scBsTaFv) (anticuerpo en tándem biespecífico de cadena sencilla). En este caso, los dos fragmentos scFv están unidos mediante un conector más largo (preferentemente de 18 a 50 residuos de aminoácido de longitud), lo que tiene como resultado una estructura particularmente flexible.

15 **[0053]** Estos anticuerpos biespecíficos contienen preferentemente, además de los anticuerpos CD33 según la invención, un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo dirigido contra antígenos de superficie de células efectoras, como por ejemplo células T, especialmente células T citotóxicas, células NK, monocitos, macrófagos, células dendríticas o granulocitos. En el sentido según la invención, la definición de células efectoras comprende todas las células del sistema inmunitario innato y adaptativo que median en respuestas inmunitarias o participan activamente  
20 en las mismas. Con especial preferencia, estos anticuerpos están dirigidos contra las siguientes estructuras de superficie en células efectoras: CD3, CD8, CD4, CD25, CD28, CD16, NKG2D, NKp46, NKp44, receptores KIR activadores (*activating Killer Cell Imminoglobulin-like Receptors*) (receptores tipo inmunoglobulina de células K activadores).

25 **[0054]** También forman parte de la invención anticuerpos conjugados con un ligando, que influye en la actividad de las células efectoras mediante un enlace a la superficie de las células efectoras. El ligando se elige aquí de manera que se enlace específicamente a estructuras de superficie de las células efectoras y mediante el enlace desencadene cascadas de señales para la activación de las células efectoras. Como ligando se prefiere una estructura proteínica o un glucano, que se enlace específicamente a un receptor que se exprese específicamente en la superficie de las células efectoras, provocando el ligando mediante su enlace al receptor una activación de la  
30 célula efectora. Se prefieren especialmente las estructuras proteínicas seleccionadas entre ULB-Ps (por ejemplo ULB-P2), MICA, MICB, así como citoquinas (como por ejemplo IL2 e IL 15) y sus proteínas de fusión.

35 **[0055]** La unión del anticuerpo al otro anticuerpo o fragmento de anticuerpo o a la estructura proteínica se realiza preferentemente mediante una expresión como proteína de fusión o mediante métodos *in vitro*, enlazándose los otros anticuerpos, anticuerpos o estructuras proteínicas al anticuerpo preferentemente mediante conectores, como conectores peptídicos.

**[0056]** La invención comprende además secuencias de ácidos nucleicos que codifican para un anticuerpo según la invención, así como vectores que contienen las secuencias de ácidos nucleicos.

40 **[0057]** El vector (vector de expresión) es de manera respectiva, preferentemente, un plásmido, un cromosoma artificial o también una partícula vírica u otro vector que contenga un casete de expresión que se incorpore de manera estable al genoma del huésped (célula huésped u organismo huésped).

**[0058]** Las secuencias de ácidos nucleicos que codifican para un anticuerpo según la invención contienen preferentemente las siguientes secuencias, que codifican para las regiones CDR de las regiones variables de las cadenas pesadas:

- CDR1 SEQ ID n° 17,

45 - CDR2 SEQ ID n° 18,

- CDR3 SEQ ID n° 19 y

las siguientes secuencias, que codifican para las regiones CDR de las regiones variables de las cadenas ligeras:

- CDR1 SEQ ID n° 20,

- CDR2 SEQ ID n° 21 y

50 - CDR3 SEQ ID n° 22.

**[0059]** En otra configuración preferida de la invención, las secuencias de ácidos nucleicos que codifican para un anticuerpo según la invención contienen la siguiente secuencia, que codifica para la región variable de la cadena

pesada: SEQ ID nº 29 y/o la siguiente secuencia, que codifica para la región variable de la cadena ligera: SEQ ID nº 30.

**[0060]** También forman parte de la invención células huésped u organismos huésped no humanos que contienen una secuencia de ácidos nucleicos según la invención.

5 **[0061]** Una célula huésped es una célula presente de forma natural o una línea celular transformada o genéticamente modificada o un organismo huésped no humano (multicelular), que contenga el sistema de expresión (es decir al menos un vector de expresión) según la invención. La invención comprende al mismo tiempo transfectantes transitorios (por ejemplo mediante inyección de ARNm), o sea huéspedes (células u organismos huésped) en los que el sistema de expresión está contenido como plásmido o como cromosoma artificial, así como  
10 huéspedes en los que el sistema de expresión está integrado de manera estable en el genoma del huésped (o de células individuales del huésped). La célula huésped se selecciona preferentemente entre procariotas o eucariotas. Los procariotas preferidos se seleccionan entre *Escherichia coli* y *Bacillus subtilis*. Los eucariotas preferidos son células de levadura (por ejemplo, *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*), células de insectos, células de anfibios o células de mamíferos, como por ejemplo CHO, HeLa, Hek293T, Hek293A. Los organismos huésped preferidos son plantas, como por ejemplo maíz o tabaco, invertebrados o vertebrados, en particular *Bovidae*, *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans*, *Xenopus laevis*, *Medaka*, pez cebra o *Mus musculus*, o células o embriones de los organismos mencionados.

**[0062]** La invención comprende además una composición farmacéutica que contiene uno o varios anticuerpos según la invención en asociación con un excipiente o diluyente farmacológicamente aceptable. La composición  
20 farmacéutica se presenta preferentemente en una forma adecuada para la administración intravenosa.

**[0063]** La composición comprende preferentemente un anticuerpo quimérico o humanizado, con una inmunogenicidad reducida, que contiene las regiones CDR según la invención.

**[0064]** Las composiciones farmacéuticas según la invención comprenden distintas formas de dosificación. Las composiciones farmacéuticas se administran preferentemente por vía parenteral y con especial preferencia por vía  
25 intravenosa. En una configuración de la invención, la composición farmacéutica parenteral se presenta en una forma farmacéutica adecuada para la inyección. Por lo tanto, las composiciones especialmente preferidas son soluciones, emulsiones o suspensiones del anticuerpo, que se halla en un excipiente o diluyente farmacológicamente aceptable.

**[0065]** Como excipientes se emplean preferentemente agua, agua tamponada, solución salina al 0,4%, glicina al 0,3% y disolventes similares. Las soluciones son estériles. Las composiciones farmacéuticas se esterilizan mediante técnicas usuales, bien conocidas. Las composiciones contienen preferentemente coadyuvantes farmacológicamente  
30 aceptables, como por ejemplo los necesarios para conseguir condiciones aproximadamente fisiológicas y/o aumentar la estabilidad del anticuerpo, como por ejemplo agentes para el ajuste del valor pH y amortiguadores, agentes para ajustar la toxicidad y similares, preferentemente seleccionados entre acetato sódico, cloruro sódico, cloruro potásico, cloruro cálcico y lactato sódico. Las concentraciones de los anticuerpos según la invención en estas formulaciones pueden variar en función de la aplicación, preferentemente son menores que un 0,01% en peso, con preferencia son al menos de un 0,1% en peso, con mayor preferencia están entre un 1 y un 5% en peso, y se seleccionan principalmente a partir de volúmenes de fluido, viscosidad y similares o de acuerdo con el modo de administración respectivo.

**[0066]** Los anticuerpos según la invención se recogen preferentemente en una composición adecuada para una  
40 administración parenteral. La composición farmacéutica es preferentemente una solución tamponada inyectable que contiene entre 0,1 y 500 mg/ml de anticuerpos, con especial preferencia entre 0,1 y 250 mg/ml de anticuerpos, en particular junto con 1 a 500 mmoles/l (mM) de tampón. La solución inyectable puede presentarse tanto en una forma farmacéutica líquida como en una forma farmacéutica liofilizada. El tampón puede ser preferentemente histidina (preferentemente 1 a 50 mM, con especial preferencia 5 a 10 mM), con un valor pH de 5,0 a 7,0 (con especial  
45 preferencia con un valor pH de 6,0).

**[0067]** Otros tampones adecuados comprenden, pero de modo expreso no están limitados a, succinato sódico, citrato sódico, fosfato sódico o fosfato de potasio. Preferentemente se emplea cloruro sódico entre 0 y 300 mM y con especial preferencia 150 mM para una forma farmacéutica líquida. Para una forma farmacéutica liofilizada, la  
50 composición farmacéutica contiene preferentemente agentes protectores contra el frío, preferentemente sacarosa al 0 - 10% (con especial preferencia al 0,5 - 1,0%). Otros agentes protectores contra el frío comprenden trealosa y lactosa. Para una forma farmacéutica liofilizada, la composición farmacéutica contiene preferentemente agentes hinchantes, preferentemente manitol al 1 - 10%. Otros agentes hinchantes comprenden glicina y arginina. Tanto en las formas farmacológicas líquidas como en las liofilizadas se emplean preferentemente estabilizantes, con especial preferencia L-metionina entre 1 y 50 mM (con especial preferencia entre 5 y 10 mM).

**[0068]** En una forma de realización preferida, la composición farmacéutica comprende el anticuerpo en una  
55 cantidad de dosificación de 0,1 mg/kg a 10 mg/kg por aplicación. Las cantidades de dosificación especialmente preferidas comprenden 1 mg/kg de peso corporal.

- 5 [0069] Las composiciones farmacéuticas han de ser estériles, y ser estables en las condiciones de preparación y conservación. La composición puede formularse como una solución, microemulsión, dispersión, en liposomas o en otra estructura ordenada adecuada para altas concentraciones de anticuerpos. Pueden prepararse soluciones inyectables estériles recogiendo el anticuerpo en la cantidad necesaria en un disolvente adecuado, con uno o con una combinación de los ingredientes arriba detallados según sea necesario, y realizando después una esterilización por filtración. Para polvos liofilizados estériles destinados a la preparación de soluciones inyectables estériles, los procedimientos de preparación preferidos son el secado al vacío y el secado por pulverización, lo que da como resultado un polvo del anticuerpo más eventuales ingredientes adicionales deseados a partir de una solución de los mismos previamente sometida a una filtración estéril.
- 10 [0070] La invención comprende los anticuerpos según la invención para la utilización como fármaco.
- [0071] La invención comprende además la utilización de un anticuerpo según la invención para la preparación de un fármaco para la aplicación terapéutica y/o con fines de diagnóstico en enfermedades asociadas a la expresión de CD33, en particular en la leucemia mieloide aguda (LMA).
- 15 [0072] Las enfermedades asociadas a la expresión de CD33 comprenden enfermedades cancerosas, como la leucemia mieloide aguda (LMA), la leucemia mieloide crónica (LMC) y la leucemia promieloide (LPM), y otras enfermedades, como el síndrome mielodisplásico (SMD). La aplicación como medicamento comprende también otras enfermedades no mencionadas explícitamente, asociadas a la expresión de CD33.
- [0073] Para las aplicaciones terapéuticas se administra a un paciente una composición farmacéutica estéril que contiene una cantidad de dosificación farmacológicamente activa de uno o varios anticuerpos según la invención, con el fin de tratar las enfermedades antes descritas.
- 20 [0074] Según la invención se prefiere especialmente una utilización de los anticuerpos que conduzca a un *targeting* de células que expresen CD33. Para ello, mediante la administración del anticuerpo, se logra un enlace a través de CD33 a las células diana y, mediante la parte Fc o mediante los grupos efectores en los anticuerpos, se consigue una destrucción de la célula diana. Esto se realiza bien mediante el reclutamiento de células efectoras o bien mediante el transporte selectivo de principios activos farmacológicos (por ejemplo toxinas) a la célula positiva para CD33 y la liberación en la misma.
- 25 [0075] En una configuración especial de la invención se utiliza un anticuerpo en forma de un anticuerpo biespecífico para el tratamiento de enfermedades asociadas a CD33. En una configuración especialmente preferida de la invención, el anticuerpo biespecífico contiene un fragmento scFv según la invención y un fragmento scFv que está dirigido contra una estructura de superficie en células NK, preferentemente contra ULB-P2. El anticuerpo biespecífico se utiliza preferentemente para el tratamiento de LMA.
- 30 [0076] En otra configuración especialmente preferida de la invención, el anticuerpo biespecífico contiene un fragmento scFv según la invención y un fragmento scFv que está dirigido contra una estructura de superficie en células T, preferentemente contra CD3 o CD8. El anticuerpo biespecífico se utiliza preferentemente para el tratamiento de LMA.
- 35 [0077] Además del empleo en la medicina con fines terapéuticos, los anticuerpos según la invención son adecuados para el diagnóstico, la investigación biológica y otras aplicaciones en las que resulta interesante detectar el CD33. Tales aplicaciones son, en particular, la transferencia *western*, inmunotinciones de células (por ejemplo para la citometría de flujo y la microscopía) y el ELISA.
- 40 [0078] La invención incluye también un procedimiento para la producción de un anticuerpo según la invención, en el que se expone una célula huésped o un organismo huésped no humano a unas condiciones beneficiosas para la expresión y en caso dado la secreción del anticuerpo y, dado el caso, se depura el anticuerpo al menos parcialmente. Para ello se cultivan preferentemente células huésped en un medio selectivo que selecciona el crecimiento de las células que contienen un vector de expresión. La expresión de las secuencias génicas del vector de expresión tiene como resultado la producción de los anticuerpos o las proteínas de fusión. A continuación, los anticuerpos o las proteínas de fusión expresados se aíslan y se depuran mediante cualquier procedimiento convencional, incluyendo la extracción, precipitación, cromatografía, electroforesis, o también mediante cromatografía de afinidad.
- 45 [0079] Los anticuerpos según la invención son endocitados sólo lentamente por células positivas para CD33 (figura 7). Esto tiene la ventaja de que, en una aplicación terapéutica, los anticuerpos o fragmentos de anticuerpo según la invención permanecen un intervalo de tiempo mayor en la superficie de las células positivas para CD33. De este modo están mucho tiempo accesibles para las células efectoras, que a su vez median en la respuesta inmune contra las células positivas para CD33 (células diana). Esto aumenta la eficacia de una terapia. Los anticuerpos que son endocitados rápidamente no son adecuados para tal aplicación. Los anticuerpos según la invención se diferencian por estas características especiales de los anticuerpos ya conocidos en el estado actual de la técnica.
- 50 Adicionalmente a su gran afinidad con CD33, ofrecen la posibilidad de una aplicación terapéutica eficaz, cuyo mecanismo de acción se basa en el reclutamiento de células efectoras.
- 55

**[0080]** La invención se explica más detalladamente por medio de las figuras y los ejemplos de realización siguientes, sin limitarla a éstas/éstos:

#### Figuras

#### **[0081]**

5 Figura 1: La figura 1 muestra una comparación de secuencias de las regiones CDR del anticuerpo anti-CD33DRB2 según la invención con las regiones CDR de las regiones variables de las cadenas ligeras y pesadas de anticuerpos anti-CD33 ya conocidos en el estado actual de la técnica. También está representada la identidad porcentual de secuencia (%SI) de las secuencias de aminoácidos con respecto a las secuencias según la invención.

10 Figura 2: La figura 2 muestra el enlace del anticuerpo anti-CD33DRB del sobrenadante de los hibridomas a células CD33<sup>+</sup>-Hek293T. Aquí, la figura 2 muestra el enlace de un anticuerpo con las regiones CDR del anti-CD33DRB2. Está representada la intensidad de fluorescencia media (MFI) del análisis por citometría de flujo, mostrándose a la izquierda el enlace a células Hek293T de tipo salvaje (wt) y a la derecha el enlace a células CD33<sup>+</sup>-Hek293T (Hek293T-CD33).

15 Figura 3: La figura 3 muestra el enlace de anticuerpos anti-CD33 a células HL60. Aquí, (A) muestra el enlace de un anticuerpo anti-CD33 comercial y (B) muestra el enlace del anticuerpo con las regiones CDR de anti-CD33DRB2. Está representada la intensidad de fluorescencia media (MFI) del análisis por citometría de flujo.

Figura 4: La figura 4 muestra la comparación del enlace de un fragmento scFv con las regiones CDR del anti-CD33DRB2 a células CD33<sup>+</sup>-Hek293T. Está representada la intensidad de fluorescencia media (MFI) del análisis por citometría de flujo.

20 Figura 5: La figura 5 muestra la lisis específica mediada por células T de células CD33<sup>+</sup>-Hek293T, controlada mediante dos scBsTaFv diferentes dirigidos contra CD33 (con las regiones CDR del anti-CD33DRB2) y CD3. Está representada la proporción de células CD33<sup>+</sup>-Hek293T afectadas por la lisis específica mediada por células T.

25 Figura 6: La figura 6 muestra la lisis específica mediada por células NK de células CD33<sup>+</sup>-P815, controlada mediante una proteína recombinante biespecífica de ULB-P2 y scFv CD33 (con las regiones CDR del anti-CD33DRB2). Está representada la proporción de células CD33<sup>+</sup>-Hek293T afectadas por la lisis específica mediada por células NK. Los experimentos se realizaron en distintas relaciones entre células efectoras (células NK) y células diana (células CD33<sup>+</sup>-P815) (relación E:T, relación de células efectoras con respecto a células diana).

30 Figura 7: La figura 7 muestra el tiempo de permanencia de anticuerpos anti-CD33 según la invención en la superficie de blastos positivos para CD33 de un paciente de leucemia con LMA. Arriba: Enlace de anti-CD33DRB2 (del ejemplo 1) respectivo 1, 6, 24 y 48 h después de una incubación con blastos positivos para CD33 (negro). La detección se realizó mediante una tinción con anticuerpo IgG antimúrido marcado con PE (blanco: control negativo sin anticuerpo anti-CD33). Abajo: Enlace de scBsTaFv CD3xCD33 (del ejemplo 4) en cada caso 1, 6, 24 y 48 h después de una incubación con blastos positivos para CD33 (negro). La detección se realizó mediante una tinción con anticuerpo anti-myc marcado con PE (blanco: control negativo sin scBsTaFv CD3xCD33).

#### 35 Ejemplo 1: Producción y caracterización de anticuerpos anti-CD33DRB múridos monoclonales

**[0082]** Para producir nuevos anticuerpos anti-CD33 se sometió la línea celular de fibroblastos múridos A9 (ATCC CCL-1.4, American Type Culture Collection, Rockville, Md., USA) a una transducción estable con CD33 humano. Con las células así obtenidas se inmunizaron tres ratones. Tras la inmunización se aplicaron sueros de los ratones inmunizados con células Hek293T (ATCC CRL-11268), que también se habían sometido a una transducción con CD33 humano (células CD33<sup>+</sup>-Hek293T), en distintas diluciones y se realizó una inmunotinción de fluorescencia. El suero del ratón #3 mostró con la dilución máxima de 1:1.000 significativamente la mayor reactividad, de manera que para la fusión de hibridoma se emplearon los esplenocitos de este ratón. Para ello se fusionó la línea celular de mieloma múrido X63Ag8.653 (ATCC CRL 1580) en la fase de crecimiento logarítmico con esplenocitos del ratón #3 y a continuación se cultivó en un medio selectivo (medio HAT). Después de dos semanas de cultivo se ensayó la producción de anticuerpos de los hibridomas. Se identificó un hibridoma que se distinguía por una afinidad particularmente alta con CD33 (anti-CD33DRB2).

**[0083]** La secuenciación de las regiones variables de las cadenas ligeras y pesadas muestra las siguientes secuencias:

50 - anti-CD33DRB2: V<sub>H</sub> una secuencia según SEQ ID nº 29, V<sub>L</sub> una secuencia según SEQ ID nº 30. Las regiones CDR de las regiones variables de las cadenas ligeras y pesadas presentan las siguientes secuencias génicas:

- anti-CD33DRB2: V<sub>H</sub>: CDR1 una secuencia según SEQ ID nº 17, CDR2 una secuencia según SEQ ID nº 18, CDR3 una secuencia según SEQ ID nº 19; V<sub>L</sub>: CDR1 una secuencia según SEQ ID nº 20, CDR2 una secuencia según SEQ ID nº 21, CDR3 una secuencia según SEQ ID nº 22.

**[0084]** Éstas codifican para las siguientes secuencias de aminoácidos, que contienen las regiones CDR específicas:

- anti-CD33DRB2: V<sub>H</sub> una secuencia según SEQ ID n° 13, V<sub>L</sub> una secuencia según SEQ ID n° 14  
- y las regiones CDR de

5 - antiCD33-DRB2: V<sub>H</sub>: CDR1 una secuencia según SEQ ID n° 1, CDR2 una secuencia según SEQ ID n° 2, CDR3 una secuencia según SEQ ID n° 3; V<sub>L</sub>: CDR1 una secuencia según SEQ ID n° 4, CDR2 una secuencia según SEQ ID n° 5, CDR3 una secuencia según SEQ ID n° 6.

**[0085]** Las secuencias de aminoácidos de las regiones CDR del anticuerpo según la invención se diferencian ostensiblemente de los anticuerpos anti-CD33 conocidos hasta la fecha (figura 1).

10 **[0086]** El enlace de los anticuerpos de los sobrenadantes de hibridoma a células CD33<sup>+</sup>-Hek293T y a la línea celular humana de CD33<sup>+</sup> HL60 se detectó en análisis por FACS (clasificación celular activada por fluorescencia) (figuras 2 y 3).

**[0087]** Para la puesta a disposición de anticuerpos monoclonales a partir de las células de hibridoma se reclonaron éstas.

15 Ejemplo 2: Producción de una estructura scFv de anti-CD33DRB2

**[0088]** Las zonas codificantes de las cadenas pesadas y ligeras de las regiones variables del anticuerpo anti-CD33DRB2 del ejemplo 1 se amplificaron con cebadores específicos y se clonaron en un vector pSecTag2B para la expresión en células eucariotas. Con el fin de comprobar la fuerza de enlace de los scFv (*single chain variable fragments [fragmentos variable de cadena sencilla]*) se expresaron éstos en células Hek293T. Para ello se transformó el vector (pSecTag2B que contenía las zonas codificantes) en bacterias *E. coli Top10F* y se prepararon los plásmidos. Los vectores de expresión obtenidos, que codifican para los anticuerpos scFv, se introdujeron en células Hek293T mediante una transfección con polietilimina (PEI). Después de cinco días de cultivo de las células transfectadas, se retiró el sobrenadante y se depuraron los anticuerpos.

25 **[0089]** Los anticuerpos scFv obtenidos, en lo que sigue denominados scFv anti-CD33DRB2, se ensayaron en una inmunotinción de fluorescencia en cuanto a su enlace a células CD33<sup>+</sup>-Hek293T y se compararon con los anti-CD33DRB2 monoclonales (figura 4). El anticuerpo monoclonal y los anticuerpos scFv presentaron un enlace a células CD33<sup>+</sup>-Hek293T comparable, siendo igual el número de células enlazadas y estando la fuerza de enlace, que se manifiesta en la intensidad de fluorescencia media, ligeramente reducida en el anticuerpo scFv. Esto se explica porque el anticuerpo scFv se enlaza al antígeno sólo con un par de regiones variables de la cadena ligera y la cadena pesada.

Ejemplo 3: Producción de distintos anticuerpos biespecíficos CD3xCD33 e *immunotargeting* de células T

35 **[0090]** Para el empleo como estructura de *targeting* para el *targeting* de células CD33<sup>+</sup> se produjo un anticuerpo biespecífico (*single chain bispecific diabody*, scBsDb), que se enlaza con un brazo a CD33 y con el otro brazo a CD3. El dominio que se enlaza a CD33 contiene la región variable del anti-CD33DRB2 de los ejemplos 1 y 2 y sirve para el enlace a las células diana, por ejemplo células tumorales. El otro dominio se enlaza a CD3, un componente del complejo receptor de células T, y sirve para activar células T. De este modo se hace posible el reclutamiento de células T en las células diana y se permite la lucha contra las células diana por parte de las células T.

40 **[0091]** Para producir el anticuerpo se utilizó un casete externo para el primer anticuerpo, que contenía la región variable de la cadena pesada (V<sub>H</sub>) que se hallaba en posición proximal con respecto a la región variable de la cadena ligera (V<sub>L</sub>), estando V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> unidas mediante un conector de glicina-serina (Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>3</sub>. El casete interno contenía la sucesión de las regiones variables de la cadena ligera y la cadena pesada del segundo anticuerpo en forma inversa y un conector de glicina-serina de (Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>5</sub>, para garantizar un plegamiento correcto del scBsDb. Así se produjeron dos anticuerpos biespecíficos distintos, que se diferencian en la disposición de las regiones variables de los anticuerpos anti-CD33 y anti-CD3:

45 scBsDb CD33xCD3 (casete externo CD33 - casete interno CD3):

V<sub>H</sub>CD33-(Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>3</sub>-V<sub>L</sub>CD3-(Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>5</sub>-V<sub>H</sub>CD3-(Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>3</sub>-V<sub>L</sub>CD3

scBsDb CD33xCD3 (casete externo CD3 - casete interno CD33):

V<sub>H</sub>CD3-(Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>5</sub>-V<sub>L</sub>CD33-(Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>3</sub>-V<sub>H</sub>CD33-(Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>3</sub>-V<sub>L</sub>CD3.

50 **[0092]** Las secuencias codificantes de los scBsDb CD33xCD3 y scBsDb CD3xCD33 se clonaron en un vector retroviral pcz-CFG 5.1. Las dos estructuras se introdujeron en una línea celular de encapsidación y las partículas víricas obtenidas se introdujeron en células Hek293T, donde su secuencia codificante se introdujo de manera estable en el genoma, con lo que se obtuvieron líneas celulares estables que expresan los dos anticuerpos scBsDb CD33xCD3 y scBsDb CD3xCD33. Éstos se depuraron mediante una columna de Ni-NTA.

55 **[0093]** Los anticuerpos biespecíficos así obtenidos contenían, además de la forma completa, otro producto de 37 kDa de tamaño, que probablemente se había producido por proteólisis y que influía de manera considerablemente

negativa en la citotoxicidad. La citotoxicidad se determinó mediante un ensayo de liberación de  $^{51}\text{Cr}$  con células  $^{51}\text{Cr}$ -CD33<sup>+</sup>-Hek293T. ScBsDb CD33xCD3 y scBsDb CD3xCD33 alcanzaron, en cocultivos *in vitro* de células CD33<sup>+</sup>-Hek293T y PBMC, una lisis específica mediada por células T de las células CD33<sup>+</sup>-Hek293T de un 27% o un 23%.

Ejemplo 4: Producción de anticuerpos en tándem (scBsTaFv) CD3xCD33 e *immunotargeting* de células T

5 **[0094]** Con el fin de aumentar aun más la citotoxicidad mediada por células T, se construyeron anticuerpos en tándem con estructuras de conector de mayor tamaño, para evitar la proteólisis. En los anticuerpos en tándem biespecíficos (scBsTaFv), las regiones variables del anticuerpo anti-CD33 y del anticuerpo anti-CD3 están dispuestas en una cadena polipeptídica, estando los dos fragmentos scFv ligados con un conector L18 de 18 aminoácidos de longitud para un plegamiento correcto. Otra estructura contenía, además de L18, la proteína verde fluorescente (GFP). Ambas estructuras, CD33-L18-CD3 y CD33-L18-GFP-L18-CD3 se expresaron y depuraron análogamente al ejemplo 3. La citotoxicidad también se determinó análogamente al ejemplo 3 con un ensayo de liberación de  $^{51}\text{Cr}$  (figura 5). En estas estructuras de anticuerpos, la lisis específica de las células CD33<sup>+</sup>-Hek293T es de hasta un 86% con 20 horas de cultivo *in vitro*.

Ejemplo 5: Producción de anticuerpos en tándem (scBsTaFv) ULB-P2xCD33 e *immunotargeting* de células NK

15 **[0095]** Con el fin de lograr un *immunotargeting* de células NK se construyeron anticuerpos en tándem que contenían CD33 y ULB-P2. ULB-P2 es el ligando del receptor de células NK activador NKG2D. A través de la combinación de un ligando activador y un anticuerpo scFv anti-CD33 en un anticuerpo en tándem se media un *immunotargeting* de células NK en células diana CD33<sup>+</sup>. La estructura del anticuerpo en tándem contiene ULB-P2, un conector corto (Gly<sub>4</sub>Ser) y la región V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> del anti-CD33DRB2, que están ligados mediante una estructura de conector larga (Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>3</sub>, así como una etiqueta myc y seis etiquetas his para la depuración. Los anticuerpos se introdujeron en un vector de expresión, se expresaron y se depuraron análogamente a los ejemplos 3 y 4.

**[0096]** La citotoxicidad mediada por células NK se determinó con un ensayo de liberación de  $^{51}\text{Cr}$  en células CD33<sup>+</sup>-P815 (ATCC TIB-6) (figura 6). En presencia del anticuerpo en tándem se detectó una citotoxicidad mediada por células NK significativamente elevada.

25 Ejemplo 6: Los anticuerpos anti-CD33 según la invención son endocitados sólo débilmente por células cancerosas

**[0097]** Es deseable que, en un tratamiento terapéutico de enfermedades asociadas a CD33, por ejemplo la leucemia mieloide aguda (LMA), el tiempo de permanencia de los anticuerpos empleados para la terapia en la superficie celular sea largo. Esto hace que las células efectoras puedan reclutarse eficazmente en las células cancerosas. En caso de una endocitosis rápida de los anticuerpos por parte de las células cancerosas, después de poco tiempo ya no estarían accesibles los puntos de enlace para las células efectoras y, por consiguiente, el *targeting* de las células efectoras sería menor eficaz.

**[0098]** Para demostrar que los anticuerpos según la invención son endocitados por las células cancerosas positivas para CD33 sólo a baja velocidad, se incubaron blastos positivos para CD33 de pacientes de leucemia con un anticuerpo anti-CD33DRB2 monoclonal (como se describe en el ejemplo de realización 1) o con un anticuerpo en tándem scBsTaFv CD3xCD33 (como se describe en el ejemplo de realización 4) a 4 °C durante 1 h. Mediante análisis por FACS se detectó la presencia de los anticuerpos anti-CD33 en la superficie de los blastos positivos para CD33, realizando una tinción de los anticuerpos anti-CD33 con un anticuerpo IgG antirratón marcado con PE (para el anti-CD33DRB2 monoclonal, figura 7 arriba, histograma negro) o con un anticuerpo anti-myc marcado con PE (para el anticuerpo en tándem, figura 7 abajo, histograma negro). Paralelamente, como control negativo, sin incubación con anticuerpos anti-CD33, se tiñeron blastos positivos para CD33 del mismo paciente con, respectivamente, los mismos anticuerpos, (figura 7, en cada caso histograma blanco).

**[0099]** Los anticuerpos pudieron detectarse en la superficie incluso 48 h después de la puesta en contacto con los blastos positivos para CD33. Durante este tiempo, la mayor parte de los anticuerpos – tanto de los anticuerpos monoclonales como del derivado de anticuerpo biespecífico – no fueron endocitados por los blastos positivos para CD33. Así pues, durante 48 h está asegurado que los anticuerpos se hallarán durante 48 h en la superficie de las células a destruir y, por lo tanto, están durante un largo intervalo de tiempo en situación de servir para un reclutamiento y un enlace de células efectoras (en el caso de los anticuerpos monoclonales por ejemplo mediante receptores Fc; en el caso de los derivados de anticuerpos biespecíficos mediante un enlace específico de los demás anticuerpos).

50 LISTADO DE SECUENCIAS

**[0100]**

<110> Technische Universität Dresden

<120> Anti-CD33 Antikörper und ihre Anwendung zum Immunotargeting bei der Behandlung von CD33-assoziierten Erkrankungen

<130> 00017P0138DEWO

<160> 54

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 5

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 1

**Asp Tyr Val Val His**  
**1 5**

<210> 2

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 2

**Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Lys**  
**1 5 10 15**

**Gly**

<210> 3

<211> 11

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 3

**Asp Tyr Arg Tyr Glu Val Tyr Gly Met Asp Tyr**  
**1 5 10**

<210> 4

<211> 10

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 4

**Thr Ala Ser Ser Ser Val Asn Tyr Ile His**  
**1 5 10**

<210> 5

<211> 6

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 5

ES 2 523 502 T3

Thr Ser Lys Val Ala Ser  
1 5

<210> 6  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Mus musculus  
  
<400> 6

Gln Gln Trp Arg Ser Tyr Pro Leu Thr  
1 5

<210> 7  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> Mus musculus  
  
<400> 7

Asp Tyr Val Leu His  
1 5

<210> 8  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> Mus musculus  
  
<400> 8

Leu Ile Asn Thr Tyr Asn Gly Asp Val Arg Tyr Asn Gln Lys Phe Met  
1 5 10 15

Gly

<210> 9  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> Mus musculus  
  
<400> 9

Asp Tyr Arg Tyr Glu Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr  
1 5 10

<210> 10  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Mus musculus  
  
<400> 10

Ser Ala Asn Ser Ser Val Ser Tyr Ile His  
1 5 10

ES 2 523 502 T3

<210> 11  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 11

Thr Ser Lys Leu Ala Ser  
 1 5

<210> 12  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 12

Gln Gln Trp Thr Ser His Pro Leu Thr  
 1 5

<210> 13  
 <211> 120  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 13

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

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Lys Phe Thr Asp Tyr  
 20 25 30

Val Val His Trp Leu Lys Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile  
 35 40 45

Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe  
 50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ser Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80

Met Glu Val Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

Ala Arg Asp Tyr Arg Tyr Glu Val Tyr Gly Met Asp Tyr Trp Gly Gln  
 100 105 110

Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

<210> 14  
 <211> 115

ES 2 523 502 T3

<212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 14

```

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Thr Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly
1           5           10           15

Glu Arg Val Thr Met Thr Cys Thr Ala Ser Ser Ser Val Asn Tyr Ile
20           25           30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Asp Ser Pro Lys Arg Trp Ile Phe
35           40           45

Asp Thr Ser Lys Val Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
50           55           60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Thr Met Glu Ala Glu
65           70           75           80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Arg Ser Tyr Pro Leu Thr
85           90           95

Phe Gly Asp Gly Thr Arg Leu Glu Leu Lys Arg Ala Asp Ala Ala Pro
100          105          110

Thr Val Ser
115
  
```

<210> 15  
 <211> 120  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 15

ES 2 523 502 T3

Glu Val Lys Leu Gln Glu Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Val  
 1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr  
 20 25 30

Val Leu His Trp Val Lys Gln Ser His Ala Lys Ser Leu Glu Trp Ile  
 35 40 45

Gly Leu Ile Asn Thr Tyr Asn Gly Asp Val Arg Tyr Asn Gln Lys Phe  
 50 55 60

Met Gly Lys Ala Thr Met Thr Ile Glu Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80

Met Glu Leu Val Arg Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Ile Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

Ala Arg Asp Tyr Arg Tyr Glu Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln  
 100 105 110

Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

<210> 16

<211> 115

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 16

ES 2 523 502 T3

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly  
 1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Asn Ser Ser Val Ser Tyr Ile  
 20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile Phe  
 35 40 45

Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser  
 50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Thr Met Glu Ala Glu  
 65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Thr Ser His Pro Leu Thr  
 85 90 95

Phe Gly Thr Gly Thr Lys Leu Gln Leu Lys Arg Ala Asp Ala Ala Pro  
 100 105 110

Thr Val Ser  
 115

<210> 17  
 <211> 15  
 <212> DNA  
 <213> Mus musculus

<400> 17  
 gactatgttg tgcac 15

<210> 18  
 <211> 51  
 <212> DNA  
 <213> Mus musculus

<400> 18  
 tatattaatc cttacaatga tggactaag tacaatgaga agttcaaagg c 51

<210> 19  
 <211> 33  
 <212> DNA  
 <213> Mus musculus

<400> 19  
 gactataggt acgaggctca tggatggac tac 33

<210> 20  
 <211> 30  
 <212> DNA  
 <213> Mus musculus

## ES 2 523 502 T3

<400> 20  
actgccagct caagtgtaaa ttacatacac 30

<210> 21  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> Mus musculus

<400> 21  
gacacatcca aagtggttc t 21

<210> 22  
<211> 27  
<212> DNA  
<213> Mus musculus

<400> 22  
cagcagtggc gaagttacc tctcacg 27

<210> 23  
<211> 15  
<212> DNA  
<213> Mus musculus

<400> 23  
gattatggtt tacac 15

<210> 24  
<211> 51  
<212> DNA  
<213> Mus musculus

<400> 24  
cttattaata ctataatgg tgacgttagg tacaaccaga agttcatggg c 51

<210> 25  
<211> 33  
<212> DNA  
<213> Mus musculus

<400> 25  
gactataggt acgaatacta tgctatggac tac 33

<210> 26  
<211> 30  
<212> DNA  
<213> Mus musculus

<400> 26  
agtgccaact caaggtcag ttacatacac 30

<210> 27  
<211> 18  
<212> DNA  
<213> Mus musculus

<400> 27  
acatccaaac tggcttct 18

ES 2 523 502 T3

<210> 28  
 <211> 27  
 <212> DNA  
 <213> Mus musculus

<400> 28  
 cagcagtgga ctagtcacc actcagc 27

<210> 29  
 <211> 360  
 <212> DNA  
 <213> Mus musculus

<400> 29

**gagggtcaagc tgcaggagtc aggacctgag ctggtaaagc ctggggcttc agtgaagatg 60**  
**tcctgcaagg cttctggata caaattcact gactatgttg tgcactggct gaagcagaag 120**  
**cctgggcagg gccttgagtg gattggatat attaatcctt acaatgatgg tactaagtac 180**  
**aatgagaagt tcaaaggcaa ggccacactg acttcagaca aatcctccag cacagcctac 240**  
**atggagggtca gcagcctgac ctctgaggac tctgcggtct attattgtgc aagagactat 300**  
**aggtacgagg tctatggtat ggactactgg ggtcaaggaa cctcagtcac cgtctcctca 360**

<210> 30  
 <211> 345  
 <212> DNA  
 <213> Mus musculus

<400> 30

**gacattgtgc tgaccagtc tccaacaatc atgtctgcat ctccagggga gagggtcacc 60**  
**atgacctgca ctgccagctc aagtgtaaat tacatacact ggtaccagca gaagtcaggc 120**  
**gactccccca aaagatggat tttcgacaca tccaaagtgg cttctggagt ccctgctcgc 180**  
**ttcagtggca gtgggtcagg gacctcttac tctctcacia tcagtaccat ggaggctgaa 240**  
**gatgctgccca cttattactg ccagcagtg ggaagttacc ctctcacggt cggatgatggg 300**  
**accaggctgg agctgaaacg ggctgatgct gcaccaactg tatcc 345**

<210> 31  
 <211> 360  
 <212> DNA  
 <213> Mus musculus

<400> 31

ES 2 523 502 T3

gaggtcaagc tgcaggagtc aggggctgag ctggtgaggc ctggggctctc agtgaagatc 60  
 tcctgcaagc gttctggcta cacattcact gattatgttt tacactgggt gaagcagagt 120  
 catgcaaaga gtctagagtg gattggactt attaatactt ataatgggtga cgtaggttac 180  
 aaccagaagt tcatgggcaa ggccacaatg accatagaga aatcctccag cacagcctat 240  
 atggaacttg tcagactgac atctgaggat tctgccatct attactgtgc aagagactat 300  
 aggtacgaat actatgctat ggactactgg ggtcaaggaa cttcagtcac cgtctcctca 360

<210> 32  
 <211> 345  
 <212> DNA  
 <213> Mus musculus

<400> 32

gacattgtgc tgaccagtc tccagcaatc atgtctgcat ctccagggga gaaggtcacc 60  
 atgacctgca gtgccaactc aagtgtcagt tacatacact ggtaccagca gaagtcaggc 120  
 acttccccca aaagatggat ttttgacaca tccaaactgg cttctggagt ccctgctcgc 180  
 ttcagtggca gtgggtctgg gacctcttac tctctcacia tcagcaccat ggaggctgaa 240  
 gatgctgcca cttattactg ccagcagtgg actagtcacc cactcacggt cggtagctggg 300  
 accaagctgc agctgaaacg ggctgatgct gcaccaactg tatcc 345

<210> 33  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 33

**Gly Leu Ile Asn Thr Tyr Asn Gly Asp Val Arg Tyr Asn Gln Lys Phe**  
 1 5 10 15

**Met Gly**

<210> 34  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 34

**Leu Ile Asn Thr Tyr Asn Gly Asp Val Arg Tyr Asn Gln Lys Phe Met**  
 1 5 10 15

**Gly Lys**

<210> 35

ES 2 523 502 T3

<211> 19  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<400> 35

**Gly Leu Ile Asn Thr Tyr Asn Gly Asp Val Arg Tyr Asn Gln Lys Phe**  
**1 5 10 15**

**Met Gly Lys**

<210> 36  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<400> 36

**Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser**  
**1 5**

<210> 37  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<400> 37

**Ser Tyr Tyr Ile His**  
**1 5**

<210> 38  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (16)..(16)  
<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 38

**Val Ile Tyr Pro Gly Asn Asp Asp Ile Ser Tyr Asn Gln Lys Phe Xaa**  
**1 5 10 15**

**Gly**

<210> 39  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<400> 39

ES 2 523 502 T3

**Glu Val Arg Leu Arg Tyr Phe Asp Val**  
1 5

<210> 40  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> Mus musculus  
  
<400> 40

**Lys Ser Ser Gln Ser Val Phe Phe Ser Ser Ser Gln Lys Asn Tyr Leu**  
1 5 10 15

**Ala**

<210> 41  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Mus musculus  
  
<400> 41

**Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser**  
1 5

<210> 42  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Mus musculus  
  
<400> 42

**His Gln Tyr Leu Ser Ser Arg Thr**  
1 5

<210> 43  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> Mus musculus  
  
<400> 43

**Asp Tyr Asn Met His**  
1 5

<210> 44  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> Mus musculus  
  
<400> 44

**Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asn Gly Gly Thr Gly Tyr Asn Gln Lys Phe Lys**  
1 5 10 15

ES 2 523 502 T3

**Ser**

<210> 45  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Mus musculus  
  
<400> 45

**Gly Arg Pro Ala Met Asp Tyr**  
**1 5**

<210> 46  
<211> 15  
<212> PRT  
<213> Mus musculus  
  
<400> 46

**Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Asn Tyr Gly Ile Ser Phe Met Asn**  
**1 5 10 15**

<210> 47  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> Mus musculus  
  
<400> 47

**Ala Ser Asn Gln Gly Ser**  
**1 5**

<210> 48  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Mus musculus  
  
<400> 48

**Gln Gln Ser Lys Glu Val Pro Trp Thr**  
**1 5**

<210> 49  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> Mus musculus  
  
<400> 49

**Asp Tyr Asn Met Tyr**  
**1 5**

<210> 50  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

ES 2 523 502 T3

<400> 50

**Tyr Ile Asp Pro Tyr Lys Gly Gly Thr Ile Tyr Asn Gln Lys Phe Lys**  
**1 5 10 15**

**Gly**

<210> 51

<211> 10

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 51

**Gln Met Ile Thr Ala Tyr Tyr Phe Asp Tyr**  
**1 5 10**

<210> 52

<211> 11

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 52

**Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Lys Tyr Ile Ala**  
**1 5 10**

<210> 53

<211> 6

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 53

**Thr Ser Thr Leu Gln Pro**  
**1 5**

<210> 54

<211> 8

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 54

**Leu Gln Tyr Asp Asn Leu Leu Thr**  
**1 5**

**REIVINDICACIONES**

1. Anticuerpo anti-CD33 que contiene regiones determinantes de complementariedad (complementarity determining regions, CDR), caracterizado porque las CDR comprenden las siguientes secuencias:
  - a) región variable de la cadena pesada ( $V_H$ )
    - 5 CDR1 DYVVH,
    - CDR2 YINPYNDGTYNEKFKG,
    - CDR3 DYRYEVYGM DY, y
  - b) región variable de la cadena ligera ( $V_L$ )
    - CDR1 TASSSVNYIH,
    - 10 CDR2 TSKVAS,
    - CDR3 QQWRSYPLT.
2. Anticuerpo según la reivindicación 1, que contiene la siguiente estructura, en caso dado humanizada:
  - una región variable de la cadena pesada con la secuencia según SEQ ID nº 13
  - y una región variable de la cadena ligera con la secuencia según SEQ ID nº 14.
- 15 3. Anticuerpo según la reivindicación 1 o 2, que contiene adicionalmente, al menos, una de las siguientes estructuras:
  - una región constante de una cadena pesada de una IgG humana,
  - una región  $C_L$  de la cadena ligera kappa humana y/o
  - una región bisagra IgG3 humana,
- 20 en caso dado en forma de un fragmento  $F(ab')_2$ .
4. Anticuerpo según una de las reivindicaciones 1 a 3 en forma de un fragmento scFv o en forma de un fragmento  $F(ab')_2$ .
5. Anticuerpo según una de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado porque está conjugado con un grupo efector u otro anticuerpo o fragmento de anticuerpo dirigido contra un antígeno distinto de CD33.
- 25 6. Anticuerpo según la reivindicación 5, estando el grupo efector seleccionado entre toxinas, enzimas, moléculas coestimulantes, radionúclidos y ácidos nucleicos, en caso dado en forma de una proteína de fusión.
7. Anticuerpo según una de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado porque está conjugado con un ligando que se enlaza específicamente a células efectoras y con ello influye en su actividad.
8. Secuencia de ácidos nucleicos que codifica para un anticuerpo según la reivindicación 1 a 7.
- 30 9. Vector que contiene una secuencia de ácidos nucleicos según la reivindicación 8.
10. Célula huésped u organismo huésped no humano que contiene una secuencia de ácidos nucleicos según la reivindicación 8 o un vector según la reivindicación 9.
11. Composición farmacéutica que contiene un anticuerpo según una de las reivindicaciones 1 a 7 en asociación con un excipiente o diluyente farmacológicamente aceptable, en caso dado en una forma adecuada para la administración intravenosa.
- 35 12. Anticuerpo según una de las reivindicaciones 1 a 7 para la utilización como fármaco.
13. Procedimiento para la producción de un anticuerpo según una de las reivindicaciones 1 a 7, en el que:
  - a. se expone una célula huésped o un organismo huésped no humano según la reivindicación 10 a unas condiciones en las que tiene lugar una expresión y en caso dado una secreción del anticuerpo y, dado el caso,
  - 40 b. se depura el anticuerpo al menos parcialmente.

	V <sub>H</sub> CDR1	%SI	V <sub>H</sub> CDR2	%SI	V <sub>H</sub> CDR3	%SI
<b>anti-CD33 DRB2</b>	DYV <sup>W</sup> H		YINPYNDGTKYNEKEFG		DYR <sup>E</sup> VEY <sup>G</sup> GMDY	
US 7,557,189	S <sup>Y</sup> X <sup>I</sup> H	40	V <sup>I</sup> Y <sup>F</sup> G <sup>N</sup> D <sup>D</sup> I <sup>S</sup> Y <sup>N</sup> Q <sup>K</sup> E <sup>X</sup> G	58	E <sup>V</sup> R <sup>L</sup> R <sup>I</sup> Y <sup>F</sup> D <sup>V</sup>	11
US 5,730,982	D <sup>Y</sup> N <sup>M</sup> H	60	Y <sup>I</sup> Y <sup>P</sup> Y <sup>N</sup> G <sup>G</sup> T <sup>G</sup> Y <sup>N</sup> Q <sup>K</sup> E <sup>F</sup> K <sup>S</sup>	75	GR <sup>P</sup> ----A <sup>M</sup> D <sup>Y</sup>	27
CN101210048	D <sup>Y</sup> N <sup>M</sup> Y	40	G <sup>Y</sup> I <sup>D</sup> P <sup>Y</sup> K <sup>G</sup> G <sup>T</sup> I <sup>Y</sup> N <sup>Q</sup> K <sup>E</sup> F <sup>G</sup>	70	Q- <sup>M</sup> I <sup>T</sup> A <sup>Y</sup> Y <sup>F</sup> D <sup>Y</sup>	27

	V <sub>L</sub> CDR1	%SI	V <sub>L</sub> CDR2	%SI	V <sub>L</sub> CDR3	%SI
<b>anti-CD33 DRB2</b>	TASSSVN-----Y <sup>I</sup> H		TSK <sup>V</sup> AS		QQ <sup>W</sup> R <sup>S</sup> Y <sup>P</sup> L <sup>T</sup>	
US 7,557,189	K <sup>S</sup> S <sup>Q</sup> S <sup>V</sup> F <sup>F</sup> S <sup>S</sup> Q <sup>K</sup> N-----Y <sup>L</sup> A	71	W <sup>A</sup> S <sup>T</sup> R <sup>E</sup> S	66	H <sup>Q</sup> Y <sup>L</sup> S <sup>S</sup> R <sup>T</sup>	25
US 5,730,982	R <sup>A</sup> S <sup>E</sup> S <sup>V</sup> D <sup>N</sup> Y <sup>G</sup> I <sup>S</sup> F <sup>M</sup> N	75	A <sup>S</sup> N <sup>Q</sup> G <sup>S</sup>	33	QQ <sup>S</sup> K <sup>E</sup> V <sup>P</sup> W <sup>T</sup>	44
CN101210048	K <sup>A</sup> S <sup>Q</sup> D <sup>I</sup> N <sup>K</sup> ----Y <sup>I</sup> A	36	T <sup>S</sup> T <sup>L</sup> Q <sup>P</sup>	33	L <sup>Q</sup> Y <sup>D</sup> N <sup>L</sup> -L <sup>T</sup>	33

Fig. 1

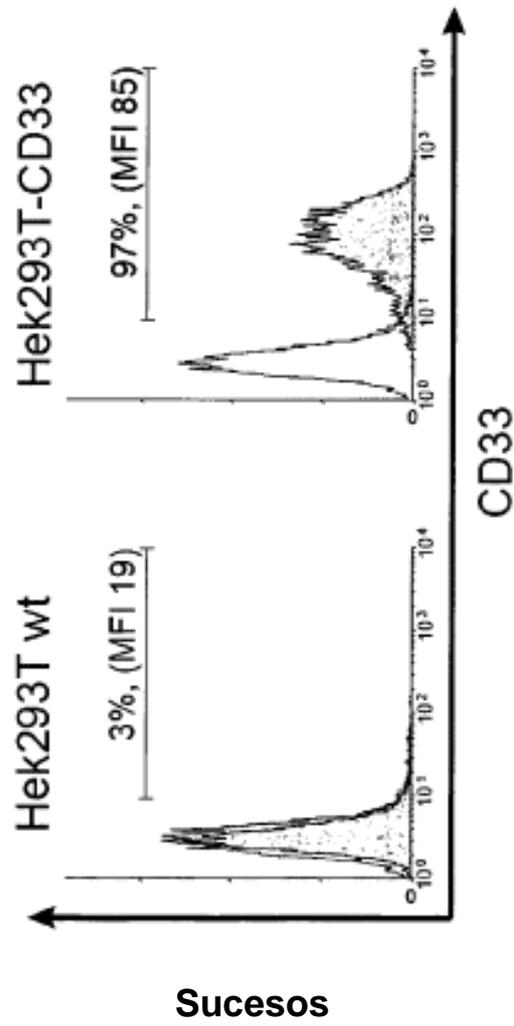


Fig. 2

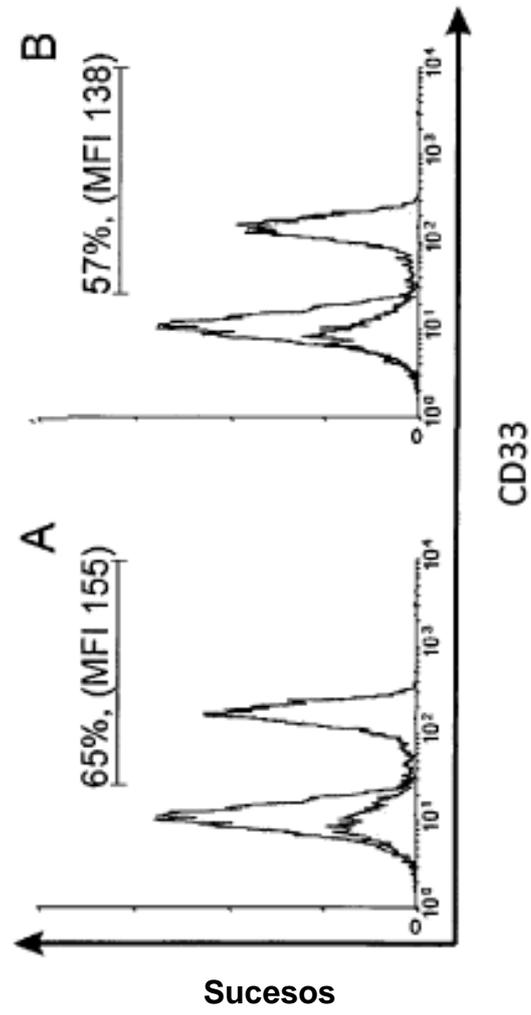


Fig. 3

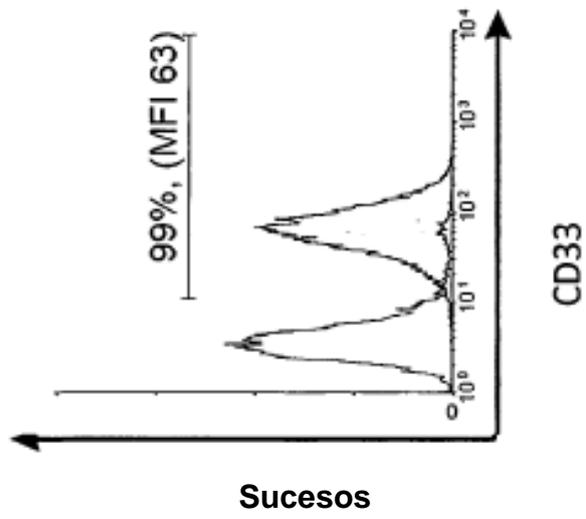


Fig. 4

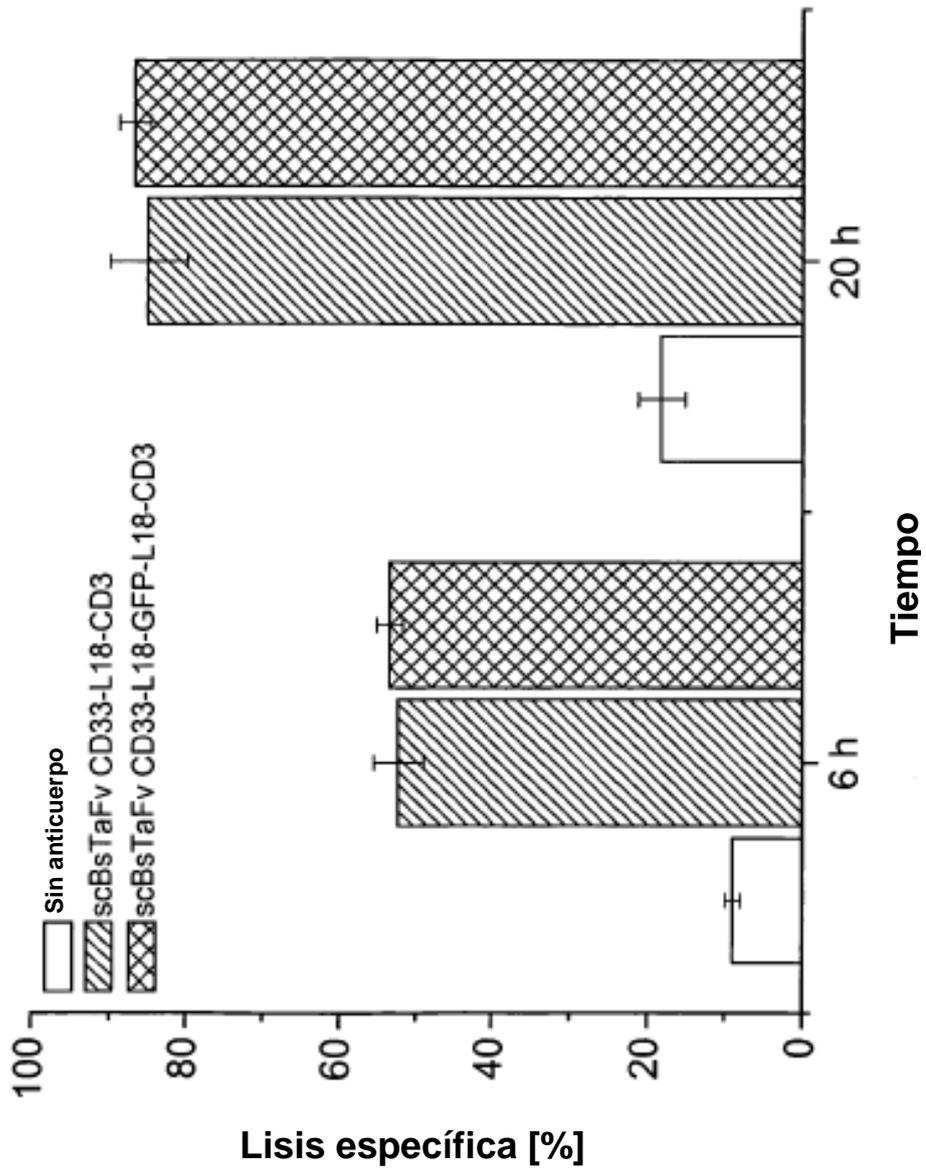


Fig. 5

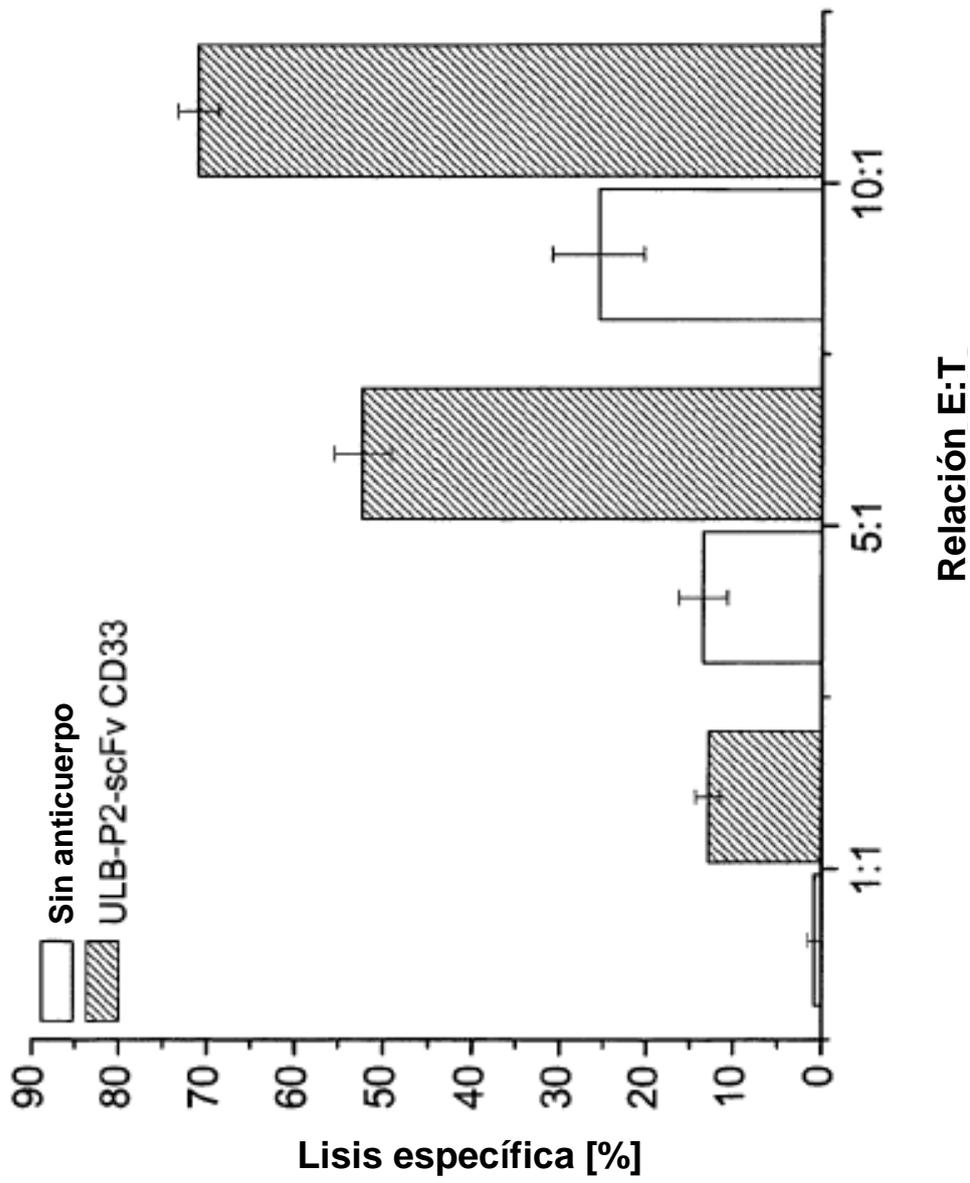


Fig. 6

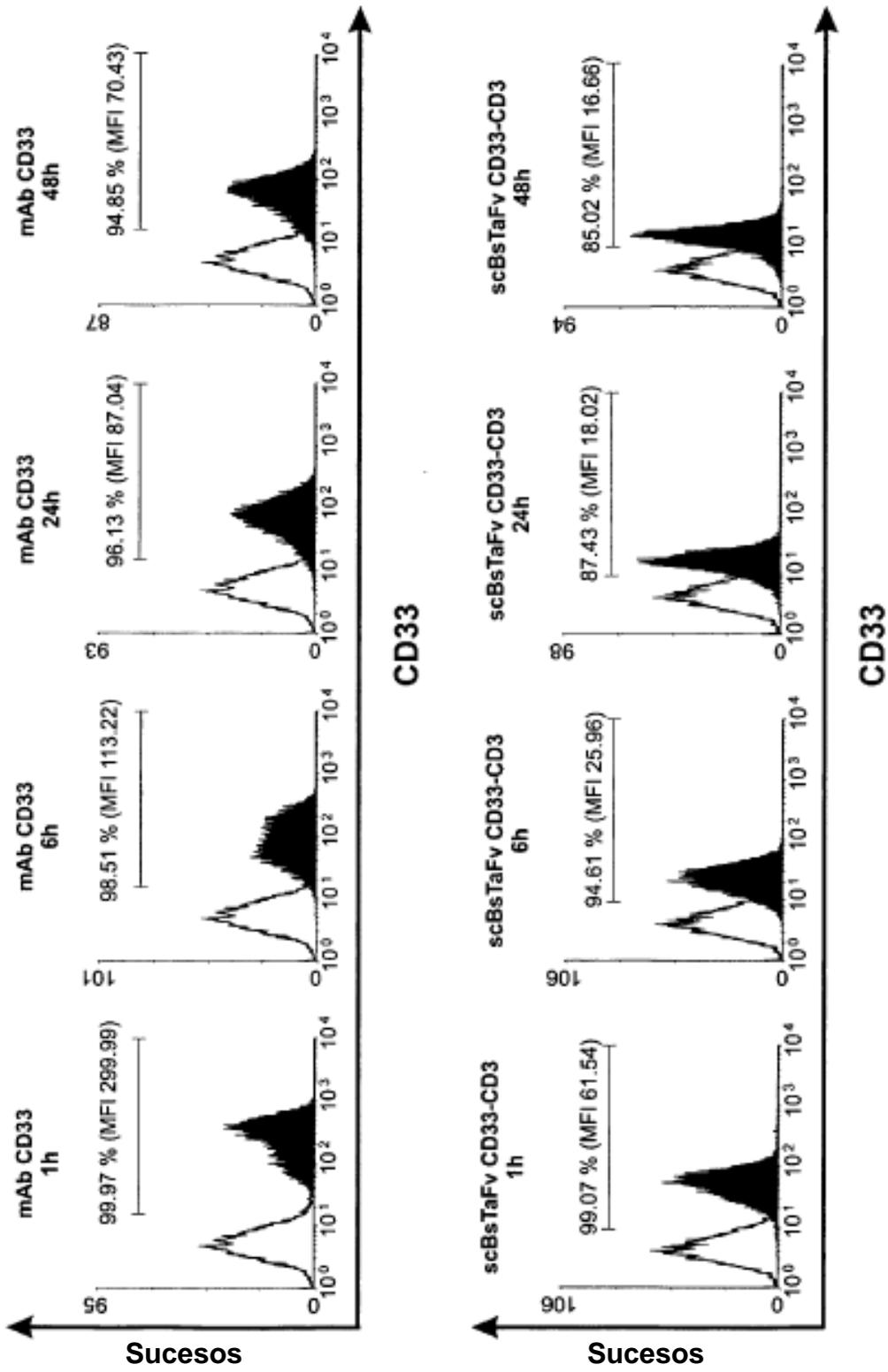


Fig. 7

**REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN**

La lista de referencias citada por el solicitante lo es solamente para utilidad del lector, no formando parte de los documentos de patente europeos. Aún cuando las referencias han sido cuidadosamente recopiladas, no pueden excluirse errores u omisiones y la OEP rechaza toda responsabilidad a este respecto.

**Documentos de patente citado en la descripción**

- WO 2004043344 A2 [0016]
- US 7557189 B [0019]
- US 5730982 A [0017] [0019]
- CN 101210048 [0019]
- EP 1656950 A1 [0017]

**Bibliografía de patentes citada en la descripción**

- **E. J. FELDMAN.** Phase III Randomized Multicenter Study of a Humanized Anti-CD33 Monoclonal Antibody, Lintuzumab, in Combination With Chemotherapy, Versus Chemotherapy Alone in Patients With Refractory or First-Relapsed Acute Myeloid Leukemia. *J. Clin. Oncol.*, 2005, vol. 23 (18), 4110-4116 [0017]
- **P. A. BAEUERLE.** BiTE: Teaching antibodies to engage T cells for cancer therapy. *Curr Opin Mol Ther*, 2009, vol. 11, 22-30 [0026]
- **R. BARGOU.** Tumor regression in cancer patients by very low doses of a T cell-engaging antibody. *Science*, 2008, vol. 321, 974-977 [0027]
- **K. BRISCHWEIN.** MT110: a novel bispecific single-chain antibody construct with high efficacy in eradicating established tumors. *Mol Immunol*, 2006, vol. 43, 1129-1143 [0027]
- **WALTER R et al.** *Blood*, 2005, vol. 105 (3), 1295-1302 [0018]